

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y
DE BIOSISTEMAS



UNIVERSIDAD
POLITÉCNICA
DE MADRID



Evaluación de estrategias de conservación para productos marinos con proteína de origen vegetal

MÁSTER EN INGENIERÍA ALIMENTARIA APLICADA A LA SALUD

Trabajo de fin de máster

Autor: Daniel Moliner Galbis
Tutor académico: M^a Carmen González Chamorro

Madrid, julio de 2023

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y
DE BIOSISTEMAS



UNIVERSIDAD
POLITÉCNICA
DE MADRID



Evaluación de estrategias de conservación para productos marinos con proteína de origen vegetal

MÁSTER EN INGENIERÍA ALIMENTARIA APLICADA A LA SALUD

Director: Antonio Dionisio Morata Barrado

Trabajo de fin de máster

Autor: Daniel Moliner Galbis

Tutor académico: M^a Carmen González Chamorro

Curso académico: 2022/2023

Madrid, julio de 2023

Agradecimientos

Estoy agradecido de poder dedicar este trabajo a todas aquellas personas que me habéis ayudado directa e indirectamente con la realización de este trabajo. A Karen por dirigir mi TFM, por aceptarme para investigar este tema del que tanto he aprendido, y por orientarme cada vez que me quedaba atascado. A la empresa Mimic SeaFood por prestarme su material y conocimientos para tener un punto de partida y estudiar las estrategias de conservación en el producto que ellos habían desarrollado. A Marina, Ana, Cristian y Jose por estar siempre dispuestos a ayudar, por animar el tiempo que pasé en sus laboratorios y por priorizar siempre los trabajos de los alumnos antes que su propio tiempo (me encantó trabajar en los campos, sois muy afortunadas chicas). Debo dedicar una mención especial a Florencia García por echarme siempre una mano cuando le pedía consejo sobre cómo seguir en mi trabajo o cuando le preguntaba sobre cómo realizaba ella el suyo en los puntos que tenía en común conmigo, no solo es una gran amiga sino también una buena compañera. También debo darle las gracias a M^a Antonia por recibirme siempre con una sonrisa sabiendo que aparecía en su despacho con un nuevo reto microbiológico cada día. Así mismo, a todos aquellos profesores de la ETSIAAB que me habéis echado un cable cuando tenía breves cuestiones que me supisteis responder por vuestra experiencia trabajando, gracias.

Me siento con el deber de agradecerse también a quienes me habéis ayudado indirectamente con el trabajo, ya sea por vuestro apoyo para seguir con el trabajo o por simplemente hacer más agradable mi estancia en Madrid. A Enrique por estar atento a todo lo que he necesitado y buscar siempre mi bienestar por encima de todo, lo aprecio mucho. A mis padres por darme la confianza y libertad de elegir lo que quería estudiar y animaros con las novedades que os iba contando. Y en especial a todos los amigos que he hecho en este máster. Llegué a Madrid estresado y preocupado por vivir en una nueva ciudad en la que no conocía a nadie, y habéis hecho de este curso uno de los mejores de mi vida. Kiko, Flo, Ivano, María, Lele, Dani, Lara, no os voy a olvidar nunca; espero encontrarnos tantas veces como nos permita la distancia.

Gracias a todos.

1.INTRODUCCIÓN	1
2.MARCO TEÓRICO	5
2.1. COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES DE LAS LEGUMBRES	5
2.2. PROTEÍNA DE GUISANTE	6
2.3. PROCESO DE EXTRUSIÓN	10
2.4. ESTADO DEL ARTE DEL ‘ATÚN VEGANO’	11
2.5. CONSERVAS ALIMENTARIAS	12
2.5.1. TRATAMIENTOS CONTRA <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i>	14
2.6. LÍQUIDOS DE GOBIERNO	16
3.OBJETIVOS.....	18
3.1. OBJETIVO GENERAL	18
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. DISEÑO DEL EXPERIMENTO.....	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1. MATERIAS PRIMAS PARA EL ‘ATÚN VEGANO’	20
5.2. PROCESO DE ELABORACIÓN DEL PRODUCTO	20
5.3. LÍQUIDOS DE GOBIERNO	21
5.4. ENLATADO	22
5.5. TRATAMIENTOS PARA LA CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO	23
5.6. DILUCIÓN	24
5.7. RECuentos MICROBIOLÓGICOS	24
5.7.1. MEDIOS DE CULTIVO	24
5.7.2. TINCIÓN DE GRAM	26
5.8. PARÁMETROS FISIQUÍMICOS	27
5.8.1. ESTUDIO DE PH	27
5.8.2. ESTUDIO DE COLOR	28

5.8.3.	ESTUDIO DE TEXTURA.....	29
5.9.	ANÁLISIS SENSORIAL.....	29
5.10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
6.RESULTADOS Y DISCUSIÓN		31
6.1.	MEDIOS DE CULTIVO PARA EL RECuento MICROBIANO	31
6.2.	RECuento MICROBIANO DEL PRODUCTO SIN TRATAR.....	32
6.2.1.	OBSERVACIÓN <i>IN VIVO</i>	33
6.2.2.	TINCIÓN DE GRAM	34
6.3.	PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS SEGÚN EL TRATAMIENTO	36
6.3.1.	NATURAL, ACEITE Y ESCABECHE	36
6.3.1.1.	ESTUDIO DE PH.....	36
6.3.1.2.	ESTUDIO DE COLOR.....	37
6.3.1.3.	ESTUDIO DE TEXTURA.....	40
6.3.2.	ACEITE COMO LÍQUIDO DE GOBIERNO	42
6.3.2.1.	ESTUDIO DE PH EN ACEITE.....	42
6.3.2.2.	ESTUDIO DE COLOR EN ACEITE	43
6.3.2.3.	ESTUDIO DE TEXTURA EN ACEITE	45
6.4.	CRECIMIENTO MICROBIANO DEL PRODUCTO TRATADO EN ACEITE.....	47
6.5.	ANÁLISIS SENSORIAL.....	49
7.PERSPECTIVAS DE FUTURO		53
8.CONCLUSIONES		53
9.BIBLIOGRAFÍA		54

Índice de figuras

Figura 1. Micrografía electrónica de barrido de <i>Clostridium botulinum</i>	15
Figura 2. Tres réplicas de cada enlatado de ‘atún vegano’ en tres líquidos de gobierno.....	17
Figura 3. Placas de extrusionado de guisante y aditivos.....	20
Figura 4. Dimensiones de los botes de cristal utilizados.....	23
Figura 5. Steam Sterilizer.....	23
Figura 6. Bolsas estériles para uso en el homogeneizador y Stomacher® 400 Circulator.....	24
Figura 7. Equipo productor de anaerobiosis GasPak Anaerobic System.....	26
Figura 8. Aceite de inmersión y tintes utilizados para realizar la tinción de Gram.....	27
Figura 9. pH-metro Crison, pH Indicator Strips y tiras con escala de color.....	27
Figura 10. Colorímetro digital de superficie y espacio colorimétrico CIELab.....	28
Figura 11. Texturómetro.....	29
Figura 12. Cultivo de la dilución extraída del ‘atún vegano’ en profundidad en medio PCA y en Reinforced Clostridial Medium en anaerobiosis tras 72h a 28°C.....	32
Figura 13. Observación <i>in vivo</i> de los microorganismos presentes en la muestra sin tratar...	33
Figura 14. Siembra por estrías y microorganismos tras la tinción de Gram.....	35
Figura 15. Producto según su líquido de gobierno y su tratamiento tras 8 días de conserva..	37
Figura 16. Gráfica del análisis de perfil de textura.....	41
Figura 17. Gráfica de medias con intervalos para el pH de la muestra tratada en aceite.....	43
Figura 18. Producto enlatado en aceite según su tratamiento, tras 8 días de conserva.....	44
Figura 19. Crecimiento microbiano del ‘atún vegano’ enlatado tras un tratamiento de 2’30’’ a 121°C y del mismo sin tratar crecidos en medio PCA.....	47
Figura 20. Crecimiento microbiano del ‘atún vegano’ enlatado tras un tratamiento de 2’30’’ a 121°C y del mismo sin tratar crecidos en anaerobiosis en Reinforced Clostridial Medium....	48
Figura 21. Gráficos de dispersión radial de las medias obtenidas por el análisis sensorial....	52

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de la proteína del guisante y sus características moleculares.....	8
Tabla 2. Comparación de los perfiles de aminoácidos esenciales en guisante, soja, arroz y trigo	9
Tabla 3. Concentraciones para la preparación del ‘atún vegano’	21
Tabla 4. Concentraciones para la preparación del líquido de gobierno de escabeche	22
Tabla 5. Concentraciones para la preparación del medio Play Count Agar.....	25
Tabla 6. Concentraciones para la preparación del Reinforced Clostridial Medium	25
Tabla 7. Promedios de pH de cada producto según su líquido de gobierno y su tratamiento.	36
Tabla 8. Promedios de valores L*, a* y b* de cada producto enlatado según su líquido de gobierno y su tratamiento.....	38
Tabla 9. Colores de cada producto enlatado según su líquido de gobierno y su tratamiento..	38
Tabla 10. Promedios de textura de cada producto según líquido de gobierno y tratamiento..	40
Tabla 11. Promedios de pH de cada producto enlatado en aceite según su tratamiento	42
Tabla 12. Promedios de L*, a* y b* de cada producto en aceite según su tratamiento	44
Tabla 13. Colores de cada producto enlatado en aceite según su tratamiento	45
Tabla 14. Valores de textura para cada producto enlatado en aceite según su tratamiento	46
Tabla 15. Evaluación sensorial del aspecto exterior del producto enlatado en aceite.....	49
Tabla 16. Evaluación sensorial del aroma del producto enlatado en aceite	50
Tabla 17. Evaluación sensorial del sabor del producto enlatado en aceite	50
Tabla 18. Evaluación sensorial de la textura en boca del producto enlatado en aceite.....	51

Título: Evaluación de estrategias de conservación para productos marinos con proteína de origen vegetal.

Resumen:

El cambio de productos de origen animal hacia alternativas con base de proteína vegetal es un tema que preocupa desde hace tiempo a la sociedad actual. Cada vez hay más propuestas de productos veganos que deben cumplir la función de ser sanos, económicos y funcionales, en una sociedad cada vez más restrictiva a nivel legislativo, y donde la carne y pescado cada vez tienen un precio más alto por los costes derivados de la explotación animal. En este trabajo se probó a enlatar en botes de cristal un producto marino con proteína de origen vegetal al vacío ('atún vegano'), con diferentes líquidos de gobierno (agua con ácido cítrico, aceite de oliva y escabeche) y se trató de distintas formas con el autoclave variando el tiempo de exposición a las altas temperaturas y presión. Se realizaron mediciones de pH, color y textura con cada variante del producto y se realizó un análisis sensorial con el producto con las características definitivas seleccionadas. Se consiguió encontrar que un tratamiento de 2 minutos y 30 segundos a 121°C en autoclave, con aceite de oliva como líquido de gobierno, era el óptimo para la conservación a largo plazo de un producto con las características propuestas manteniendo sus propiedades organolépticas y eliminar la posible viabilidad de la vida microbiológica presente.

Palabras clave: Guisante; proteína vegetal; autoclave; atún vegano; aceite de oliva; escabeche; ácido cítrico; legumbre; enlatado; microbiología; conservación.

Autor: Daniel Moliner Galbis

Tutor académico: M^a Carmen González Chamorro

Madrid, julio de 2023

Title: Evaluation of preservation strategies for seafood products with vegetable-based protein.

Abstract:

The shift from animal-based products to plant-based alternatives has long been an issue of concern in today's society. There are more and more proposals for vegan products that must fulfil the function of being healthy, economical and functional, in a society that is increasingly restrictive at a legislative level, and where meat and fish are increasingly expensive due to the costs derived from animal exploitation. In this study, a seafood product with vegetable protein ('vegan tuna') was vacuum canned in glass jars with different liquids (water with citric acid, olive oil and marinade) and treated in different ways with the autoclave, varying the time of exposure to high temperatures and pressure. Measurements of pH, colour and texture were made with each product variant and a sensory analysis was carried out with the product with the final selected characteristics. It was found that a treatment of 2 minutes and 30 seconds at 121°C in the autoclave, with olive oil as the governing liquid, was the optimum for the long-term preservation of a product with the proposed characteristics, maintaining its organoleptic properties and eliminating the possible microbiological life present.

Keywords: Pea; vegetable protein; autoclave; vegan tuna; olive oil; pickling; citric acid; legume; canning; microbiology; preservation.

Author: Daniel Moliner Galbis

Academic tutor: M^a Carmen González Chamorro

Madrid, july of 2023

1. INTRODUCCIÓN

Como bien es sabido, nuestro planeta está sufriendo el rápido crecimiento de la población humana con los cambios derivados de nuestra propia evolución, los cuales en muchas ocasiones han resultado ser perjudiciales para la Tierra. Entre otros problemas, el descontrol poblacional está relacionado con el agotamiento de los recursos naturales, así como la excesiva generación de desechos (muchas veces contaminantes), por lo que es necesario encontrar e incrementar la producción de nuevas fuentes proteicas alimentarias para garantizar la seguridad alimentaria de todas las personas con una dieta equilibrada e introducir medidas para reducir la resultante desnutrición, teniendo en cuenta que se debe minimizar el impacto medioambiental.

Cada vez, las personas como consumidores se encuentran más concienciadas sobre algunos de los problemas que pueden derivar de la excesiva producción de alimentos cárnicos tradicionales, en los que la base proteica está fundamentada en su origen animal. Esta concienciación no se debe únicamente a la preocupación por la salud y el bienestar de los animales (lo cual también conlleva su importancia) sino más bien en la peligrosidad medioambiental de agotar los recursos naturales (agua, suelo, energía), tanto en la falta de proteína animal para abastecer a la población como en el extenso cultivo y uso de granos para la alimentación animal en piensos. Bien es conocida la contaminación derivada de la industria cárnica además de la agricultura (Poore & Nemecek, 2018). Según la estimación derivada de MAGRAMA (2014), la mayor parte de las emisiones de amonio en Europa procede de los sectores agrícola y ganadero, puesto que representan el 94% de las emisiones totales.

Por ello, la industria alimentaria ha experimentado cambios paradigmáticos en el desarrollo y producción de nuevos alimentos a lo largo de los últimos años, gracias a la mayor concienciación ambiental del público, el bienestar y la salud animal, las cuales son la razón principal del crecimiento. Con la idea de obtener fuentes proteicas útiles para la población mundial, además de reducir el consumo de proteína animal, se está investigando cada vez en más centros nuevas fuentes de proteína con orígenes alternativos (Poore & Nemecek, 2018). La tendencia que se ve reflejada en la sociedad, es pasar de una dieta rica en carne a una dieta con más vegetales. Las organizaciones mundiales coinciden en los beneficios que esto conlleva (Argel, 2022). Según Lantern (2021) en España actualmente hay un porcentaje de 1,4% personas vegetarianas, un 0,8% veganas y un 10,8% flexitarianas, por lo que son muchas las

personas en busca de nuevos productos con base de proteína vegetal que imiten los productos tradicionales con base cárnica para incorporar a sus dietas.

El consumo de pescado está recomendado por instituciones como la FAO y la OMS, debido a su alto valor nutritivo (Morales & Higuchi, 2018). Tiene muchos beneficios para la salud debido en parte a las altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 presentes en muchas especies. Alrededor del 20% de la población mundial obtiene al menos una quinta parte de su ingesta de proteínas animales del pescado, que aporta hasta 180 kcal per cápita al día en algunos estados insulares como Islandia y Japón (World Health Organization, 2003).

Sin embargo, un consumo excesivo apoyado por la sobrepesca tiene consecuencias negativas sobre el ecosistema, como la pérdida de biodiversidad de las especies, el daño medioambiental y las enfermedades de las especies marinas (Lima *et al.*, 2022). Además, el pescado también contiene metilmercurio (MeHg), un neurotóxico ambiental muy conocido y extendido. La mayor parte de la exposición humana al MeHg se produce a través del consumo de pescado, del atún en particular (Levenson & Axelrad 2006; World Health Organization, 1990). Los fetos son un grupo de alto riesgo porque el cerebro en desarrollo es particularmente susceptible a los efectos nocivos de la exposición al MeHg (Oken *et al.*, 2005). Por lo tanto, el efecto de la ingesta de pescado y marisco en la dieta de las mujeres embarazadas sigue siendo un tema importante, especialmente en poblaciones que consumen pescado con frecuencia. Por ello, la presencia de metales pesados en el pescado debido a la contaminación marina es un factor añadido que lleva a desarrollar esfuerzos para encontrar soluciones alternativas (Kazir, & Livney, 2021).

Los respectivos incentivos motivan la búsqueda de soluciones basadas en ingredientes vegetales que aspiran a imitar las características de los productos pesqueros. El consumidor mantiene una relación de fidelidad con los productos convencionales y, por lo tanto, la imitación de las propiedades sensoriales se considera esencial. Para lograrlo, es necesario poder imitar las características intrínsecas de los productos de la pesca, lo que requiere la simulación de la estructura nanométrica de gel fibroso, resultante de los tejidos celulares y de la organización de las cadenas de proteínas (Kazir, & Livney, 2021). La práctica habitual para ello es la utilización de proteínas aisladas o concentrados proteicos de origen vegetal, como guisantes y soja, transformados en geles de "surimi", mediante la sustitución parcial o total de la materia prima

del pescado o de las proteínas miofibrilares del pescado (Kudre *et al.*, 2013). Sin embargo, también existen registros del uso de otras legumbres (garbanzos), pseudocereales (quinoa, trigo sarraceno), trigo (gluten), arroz, tubérculos (patatas), semillas y frutos secos en la formulación de análogos de pescado (Kumar *et al.*, 2017).

Derivado de esta situación, ponemos el punto de mira en las legumbres, las cuales parecen una buena fuente alternativa gracias a sus cualidades a nivel nutricional, funcional, por los beneficios que conlleva en la salud y porque se ha demostrado que son sostenibles medioambientalmente.

Cuando nos referimos a legumbres hacemos referencia a todas aquellas semillas que son comestibles, se encuentran secas y limpias, y suelen ser separadas de las vainas de las plantas leguminosas. Es usual encontrarlas formando parte de la nutrición humana y animal. La definición que nos da el Codex Alimentarius (2007) para las legumbres es, a las semillas secas de plantas leguminosas las cuales se distinguen de las semillas oleaginosas por su bajo contenido de grasa. Esta falta de materia grasa la compensan con un alto contenido en proteínas.

Se considera que las legumbres son sostenibles para el medioambiente gracias a que las plantas leguminosas de las que proceden tienen la capacidad de fijar el nitrógeno. Ello ayuda a disminuir la cantidad de fertilizantes sintéticos con nitratos adicionados, los cuales son perjudiciales a largo plazo ecológicamente (Calles *et al.*, 2019). Esto lo realizan gracias a sus asociaciones de simbiosis entre las raíces de la planta y bacterias del género *rhizobium*. Juntas forman las micorrizas, el órgano donde las bacterias realizan la fijación biológica del nitrógeno y la hacen disponible para que la utilice la planta. Una vez este nitrógeno ha pasado de su forma inorgánica a orgánica, pasa a ser utilizable por la biomasa, ya sea para la propia planta o para los microorganismos que la consuman en su descomposición.

No solo tiene como beneficio la fijación del nitrógeno el hecho de aumentar el consumo de legumbres, sino que obtener proteínas de legumbres también conlleva una mayor eficiencia hídrica en relación a las proteínas con origen animal. Es decir, producir un kilogramo de proteína vegetal (de legumbres en este caso) necesita una menor utilización de agua que obtener un kilogramo de proteína animal (FAO, 2016). Para ver algunos ejemplos de ello, la cantidad de agua que se necesita para obtener 1 kg de proteína de carne de cerdo es el doble que la que necesitan las legumbres. De la misma forma, la cantidad de agua que se utiliza para producir

un gramo de proteína para la leche, para los huevos o la carne de pollo es 1,5 veces más alta que la que necesitan las legumbres. Estos datos pueden variar dependiendo del origen de los animales, ya que aquellos que son criados en sistemas industriales van a necesitar un mayor consumo de agua, además de que tienen una mayor contaminación de las aguas subterráneas y superficiales que aquellos animales que se crían en sistemas de pastoreo (González et al., 2020). Pero bien sabemos que, para abastecer las necesidades poblacionales, no es suficiente la proteína animal obtenida de productos procedentes de animales de pastoreo, por lo que se demuestra una vez más que el cambio hacia proteínas vegetales de legumbres es un método más favorable para el medioambiente.

Por todo lo mencionado, introducir leguminosas en los cultivos promoverá el aumento de la biodiversidad en el suelo mejorando el ciclo de los nutrientes y permitiendo tener un cultivo más sostenible (Argel, 2022).

Este trabajo se centrará en buscar un tratamiento de conservación a largo plazo basado en tratamientos térmicos para un producto análogo a un producto marino (de ahora en adelante 'atún vegano') pero con base de proteína de guisante, apoyando así la sostenibilidad mencionada del medioambiente gracias al aumento de consumo vegetal y reducción del consumo animal.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Composición y propiedades de las legumbres

Según encontramos en OCDE, 2020; se estima que el consumo de legumbres experimentará un aumento significativo en las dietas pertenecientes a la Unión Europea llegando a tener un consumo de 8,3 kilogramos por persona al año. Se deduce que se alcanzará este consumo en el 2029.

Las legumbres tienen como característica el hecho de que su contenido en proteínas es mucho mayor al resto de los alimentos vegetales. Los niveles medios de concentración proteica son el doble en leguminosas que en cereales. Esta característica probablemente se haya dado gracias a la capacidad fijadora del nitrógeno de las leguminosas, el cual es un elemento necesario para la formación de todos los aminoácidos (Maphosa & Jideani, 2017). Los altramuces, garbanzos, guisantes, habas, judías, lentejas, algarroba y soja tienen su contenido en proteína bruta variando entre el 17 y el 48%, siendo la soja la que tiene el contenido más alto (Boza López, 1991). Entre estas proteínas las que más abundan son las globulinas (siendo estas las mayoritarias al estar entre el 45 y el 70% del conjunto de proteínas) y las albúminas (que se encuentran entre el 8 y el 30%). A parte de estas también se encuentran otras proteínas menores como las vicilinas, prolaminas y gluteninas (Liang & Tang, 2013).

La digestibilidad de la proteína de legumbres es muy alta ya que oscila entre el 73% y el 90%, indicando así que la proporción de proteínas que son absorbidas por el organismo de todas las que son ingeridas son muy altas aunque no tanto como las derivadas de la carne. Los datos que se deducen del valor biológico nos indican cuál es el porcentaje de la proteína que, una vez ha sido absorbida, también es retenida por el organismo y no se desecha. Estos valores en las legumbres se encuentran entre el 45 y el 73%. Estos datos no son tan altos como los encontrados en proteínas animales como las del huevo o la caseína de la leche, las cuales tienen un valor biológico entre el 80 y el 94% debido principalmente a su contenido en aminoácidos azufrados (Boza López, 1991). Sin embargo, una dieta que combine cereales y legumbres, contiene toda la gama de aminoácidos ya que las segundas suplen la falta de lisina de los primeros, haciéndola una opción destacable frente al consumo de proteína animal.

El contenido en hidratos de carbono de las legumbres suele encontrarse sobre el 70%, encontrando mayormente el almidón que constituye entre el 35 y el 45% del peso en seco de las semillas de leguminosas (a excepción de la soja que al tener tanto contenido proteico disminuye el de carbohidratos, y de los cacahuets que sustituyen este contenido en polisacáridos por lípidos) (Boza López, 1991; Argel, 2022).

Desde el punto de vista nutricional, se debe mencionar el contenido en grasas presentes en las leguminosas, ya que presentan una amplia variedad en su contenido de grasa. Estas grasas son ricas en ácidos grasos esenciales poliinsaturados, como el linoleico y linolénico, así como en ácidos grasos monoinsaturados, como el oleico, que llega a constituir el 50% del contenido de grasa en algunas leguminosas. Algunas legumbres, como el guisante, haba, judía, lenteja y veza, tienen niveles bajos de grasa, que varían entre 1,5% y 2,5%. Otras leguminosas, como el garbanzo, altramuç tienen niveles intermedios de grasa, entre 4% y 22%. Por último, algunas leguminosas, como el cacahuete y la soja, son consideradas oleaginosas, ya que tienen un alto contenido de aceite, con niveles de grasa de hasta 43,3% y 18-23%, respectivamente (Boza López, 1991).

2.2 Proteína de guisante

Según Lu *et al.*, (2019) el guisante común (*Pisum sativum L.*) es una de las leguminosas domesticadas más antiguas, se cultiva tanto para alimentación humana como animal. Es un cultivo adecuado para regiones con bajas temperaturas durante la germinación y el crecimiento, lo que lo convierte en una alternativa de temporada fría en áreas no aptas para la producción de soja o judías. El guisante de huerta se consume mayormente como una hortaliza verde con sus vainas y semillas inmaduras, mientras que el guisante forrajero se comercializa como grano seco y domina la producción mundial de guisantes y sus derivados comerciales.

Existen varias clases comerciales de guisantes forrajeros en los mercados mundiales. La producción mundial de guisantes ha aumentado constantemente en los últimos 30 años, con el cultivo en más de 10 millones de hectáreas en todo el mundo y una producción total de 12,13 millones de toneladas en 2008. Los principales países productores de guisantes son Canadá, Rusia, China, India y EE. UU., siendo Canadá el mayor productor y exportador de guisantes verdes y amarillos en grano. Se espera que el mercado mundial de proteínas de guisantes

alcance los 34,8 millones de dólares estadounidenses en 2020 debido a la creciente demanda de proteínas vegetales y al costo relativamente bajo de la producción de guisantes.

El guisante forrajero es reconocido como una fuente primaria de nutrientes y puede ser dividido en varios ingredientes y productos alimenticios enriquecidos con proteínas, almidón, fibra, entre otros (Tharanathan & Mahadevamma, 2003). En general, las semillas de guisante contienen aproximadamente un 20-25% de proteínas, un 40-50% de almidón y un 10-20% de fibra. La proteína de guisante es un tipo de proteína vegetal que está ganando popularidad en la industria alimentaria a nivel mundial debido a su disponibilidad, bajo costo, valor nutricional y beneficios para la salud.

En comparación con la soja o con otras proteínas vegetales, la proteína del guisante se caracteriza por su alta digestibilidad, respuestas alérgicas relativamente menores o por una disminución en controversias negativas para la salud (Allred *et al.*, 2004). La variación en el contenido proteico del guisante forrajero se ha asociado a diferentes genotipos y factores ambientales.

Las proteínas de guisante se pueden dividir en cuatro grupos principales: globulinas, albúminas, prolaminas y gluteninas tal como se muestra en la Tabla 1. Las globulinas son las principales proteínas de almacenamiento y representan del 55 al 65 % de la proteína total de los guisantes. Las globulinas son solubles en soluciones salinas y se pueden descomponer durante la germinación de las semillas para proporcionar nutrientes para el crecimiento de las plantas. Las globulinas se disocian en subunidades en extremos de pH y fuerza iónica. Según el coeficiente de sedimentación, las globulinas se pueden dividir en dos tipos principales (legúminas 11S y vicilinas 7S). La relación legúmina a vicilina es cercana a 2:1, y las legúminas contienen más aminoácidos azufrados por unidad de proteína que la globulina. Las diferencias de contenido, composición y estructura entre la legumina y la vicilina se manifiestan tanto en las propiedades nutricionales como en las funcionales, en las que sus propiedades de asociación-disociación (Lu *et al.*, 2019) y sus estructuras superficiales son los factores más importantes para la funcionalidad de la proteína del guisante.

Tabla 1. Clasificación de la proteína del guisante y sus características moleculares. Adaptado de Lu *et al.*, (2019).

Clase	Contenido	Proteína	MW
Globulina	55–65%	Legumina	320–410 kDa
		Vicilina	150 kDa
		Convicilina	180–210 kDa
Albúmina	18–25%	Albumina	68.5 kDa
Prolamina	4–5%	Prolamina	n/a
Glutelina	3–4%	Glutelina	n/a

La albúmina (2S) es soluble en agua y constituye del 18 al 25% de la cantidad total de proteína en las semillas de guisantes. Se le considera una proteína metabólica y enzimática con funciones citosólicas. La albúmina está compuesta por moléculas que juegan un papel funcional en la germinación de semillas. Se han caracterizado dos albúminas de bajo peso molecular a partir de semillas de guisantes, una tiene 53 aminoácidos y 6 kDa y la otra tiene 37 aminoácidos y 4 kDa. Ambas tienen un contenido de cisteína inusualmente alto (7,5 y 16,2 %, respectivamente), lo que hace que sean potencialmente útiles como insecticida en el biocontrol. La relación de globulina a albúmina en el aislado de proteína de guisante puede variar según el genotipo y/o el método de procesamiento, lo que puede afectar las propiedades fisicoquímicas de la proteína de guisante (Gressent *et al.*, 2011; Eyraud *et al.*, 2013).

La proteína de guisante tiene una estructura equilibrada de aminoácidos y es rica en lisina. En comparación con la proteína de trigo, la proteína de guisante es más alta en lisina, leucina y fenilalanina, pero relativamente baja en aminoácidos que contienen azufre (metionina y cisteína). En la Tabla 2 podemos observar estas diferencias de contenido de aminoácidos entre las proteínas del guisante y las de otras legumbres y cereales. Los perfiles de aminoácidos también difieren en la legumina, la vicilina y la convicilina de la proteína del guisante. La globulina del guisante tiende a ser alta en arginina, fenilalanina, leucina e isoleucina, mientras que la fracción de albúmina es alta en triptófano, lisina y treonina. Al igual que otras leguminosas de grano, el guisante tiene un contenido relativamente menor de metionina y, por lo tanto, su perfil de aminoácidos esenciales es complementario al de los granos de cereales (Stone *et al.*, 2015).

Tabla 2. Comparación de los perfiles de aminoácidos esenciales en guisante, soja, arroz y trigo. Los valores se presentan en g por 100 g de materias primas, en las que el contenido total de proteínas (%) de las materias primas son 80% en guisante, 72% en soja, 79% en arroz y 81% en el trigo. Adaptado de Lu *et al.*, (2019).

Aminoácido	Guisante	Soja	Arroz	Trigo
Valina (Val)	2.7	2.2	2.8	2.3
Leucina (Leu)	5.7	5.0	5.8	5.0
Isoleucina (Ile)	2.3	1.9	2.0	2.0
Metionina (Met)	0.3	0.3	2.0	0.7
Fenilalanina (Phe)	3.7	3.2	3.7	3.7
Triptófano (Trp)	0.8	1.6	1.2	1.2
Treonina (Thr)	2.5	2.3	2.3	1.8
Lisina (Lys)	4.7	3.4	1.9	1.1
Histidina (His)	1.6	1.5	1.5	1.4

El guisante es uno de los ingredientes con potencial para la producción de análogos alimenticios animales producidos con orígenes vegetales por su bajo coste, disponibilidad, baja alergenicidad, alto valor nutricional y por no estar modificado genéticamente (Lam *et al.*, 2018). Además, el cultivo de guisantes tiene una menor intensidad de gases de efecto invernadero por unidad de densidad nutricional en comparación con los alimentos de origen animal; su cultivo requiere una cantidad insignificante de fertilizantes nitrogenados, y tiene un menor impacto negativo en la biodiversidad debido al bajo uso de pesticidas (Sajib *et al.*, 2023).

En Yang *et al.* (2022) estudiaron las propiedades funcionales de los guisantes, así como las propiedades gelificantes, emulsionantes y espumantes. Según estos autores, una de las propiedades de los guisantes a nivel funcional más valiosa es la emulsificación que se da lugar gracias a sus proteínas, la cual puede verse afectada por el origen de la proteína, el método de aislamiento y las condiciones ambientales o de procesamiento (pH, fuerza iónica y temperatura). También en Gutiérrez de la Fuente (2015) demostraron que a las proteínas de guisante se les confiere las características espumantes, emulsionantes y la que es más importante en este contexto, de versatilidad para adaptarse funcionalmente a la matriz que se requiera. Por ello, se convierte en un candidato idóneo para participar en un proceso de extrusión y utilizar esta capacidad emulsificante en un análogo vegetal del pescado.

2.3 Proceso de extrusión

La extrusión es un proceso continuo en el que la proteína vegetal se funde debido a la temperatura y la fricción, y se fuerza a pasar por un estrecho espacio para adquirir una forma definida. Posteriormente, se enfría para evitar deformaciones permanentes. Durante este proceso, las propiedades termofísicas de la materia prima utilizada desempeñan un papel crucial. Estas propiedades influyen en la eficiencia del proceso, especialmente en la etapa de enfriamiento que ocurre después de que la materia prima salga del espacio que le da forma en el extrusor y pasa a la etapa final de producción del producto. En esta etapa de enfriado, la materia prima entra en la bañera de enfriamiento, que puede tener diferentes tamaños. Existen dos tipos de enfriamiento: inmersión y rociado. En el enfriamiento por inmersión o de alta humedad, el tubo pasa a través de una tina llena de agua fría, lo que permite un intercambio constante de calor. Este método se utiliza cuando se requiere un enfriamiento intenso debido a altas velocidades de extrusión. En el enfriamiento por rociado o de baja humedad, el tubo pasa por una unidad de enfriamiento que consta de una cámara con múltiples boquillas que rocían agua fría sobre la tubería. Este método se utiliza cuando las velocidades de producción son más lentas, y necesita un enfriamiento más efectivo debido al mayor tiempo de permanencia del producto en esta etapa (Jiménez *et al.*, 2019).

En Sajib *et al.* (2023) probaron a investigar la aplicabilidad de los aislados de proteína de guisante en aplicaciones análogas a la carne, y realizaron ensayos de extrusión de baja y de alta humedad. Descubrieron que el tamaño de módulos por los que pasa el extrusionado participa en la elasticidad de la red de gel y la resistencia de la estructura; es decir, cuanto mayor sea el espacio, mejor será la formación de la red de gel y la resistencia (Yang *et al.*, 2021). La reducción en la superficie durante la gelificación o enfriamiento *in situ* representa la reducción de las interacciones electrostáticas y de enlaces de hidrógeno debido al aumento de la movilidad de las cadenas de proteínas y a la agitación térmica inducida por el calor (Félix *et al.*, 2017).

Las proteínas globulares del guisante se desnaturalizan en el proceso de extrusión dando lugar a la exposición de sus regiones hidrofóbicas internas. Esto permite que la proteína desplegada interactúe mediante interacciones covalentes y/o no covalentes, como enlaces de hidrógeno, enlaces disulfuro, fuerza de van der Waals e interacciones hidrofóbicas, para formar agregados proteicos dando lugar a una red tridimensional (Sajib *et al.*, 2023). Los aminoácidos de las legumbres (en concreto del guisante) que contienen azufre, como la cisteína, pueden

formar puentes disulfuro durante la extrusión y aportan texturización. Además, otras características de las proteínas, como su solubilidad, la propiedad de gelificación, la emulsificación, la formación de espuma y la capacidad de retención de agua y aceite, son las que cumplen una función importante en la formación de la estructura de los análogos de la carne y pescado (Kyriakopoulou *et al.*, 2019;). Gracias a estas características, se consigue formar el entramado final en la etapa de enfriamiento de la extrusión. Estas propiedades son las que hacen del extrusionado de guisante un producto óptimo para simular un texturizado de ‘atún vegano’.

Los resultados de Sajib *et al.* (2023) sugieren que los aislados de proteína de guisante podrían formar geles fuertes si se aíslan a pH 11,0 (20 °C) obteniendo así la mayor dureza, cohesividad, masticabilidad y gomosidad del gel.

2.4 Estado del arte del ‘atún vegano’

Cuando comenzó a desarrollarse este trabajo en febrero de 2023, se plantearon los estudios y experimentos como un producto innovador, puesto que no existía una conserva a largo plazo de ‘atún vegano’ derivado de extrusionado de guisante, con aceite como líquido de gobierno en el mercado. En junio de 2023 encontramos que ha salido a mercado un producto con exactamente estas características. Este producto se llama TUNTUN de la marca Sol Natural (Barcelona, España) y su composición se basa en proteínas vegetales hidratadas 54% (agua, proteína de guisante y habas), aceite de girasol 38%, salsa de soja Tamari (agua, soja, sal), zumo de limón, algas marinas 1,6%, vinagre blanco, sal marina y especias (Sol Natural, s. f.).

A pesar de ello, decidimos seguir con la investigación, puesto que en el mercado deben existir varias alternativas de un mismo producto por dos razones principales: las alternativas ofrecen diferentes características organolépticas que pueden ser preferidas por distintos consumidores; y es necesario que exista competencia entre productos de distintas empresas para regular que los altos precios imposibiliten la adquisición de un producto.

Aparte de este producto, sí existen otras alternativas de atún vegano, pero no como conserva a largo plazo, de hecho muchos de ellos se venden refrigerados. Entre ellos podemos encontrar en España productos como VUNA de Garden Gourmet, Nestlé (Vevey, Vaud, Suiza). Éste está producido por agua, proteína de guisante (18%), aceite de nabina, gluten de trigo, aromas, fibra de cítricos y sal (Garden Gourmet Spain, s. f.). FUTURE TVNA de Future Farm

(Río de Janeiro, Brasil), que tiene como ingredientes agua, mezcla de proteínas vegetales (17%) concentrado de proteína de soja, 1% concentrado de proteína de guisante, 1% harina de garbanzo, aceite de oliva, aroma natural, sal, rábano en polvo, aceite de microalgas *Schizochytrium Sp* con DHA, azúcar, cebolla, acidulante (ácido ascórbico) (Future Farm, s. f.). YANTUNA de Yantén Vegan Food (Vigo, Pontevedra, España) formado por una base de proteína de soja (agua, concentrado de proteína de soja), aceite de oliva (20%), aromas, sal y fibra vegetal (Yanten Vegan Food, 2022). ATÚN VEGETAL de Avus (Murcia, España) con ingredientes de soja, aceite de girasol, aceite de oliva virgen extra, aromas, sal, especias (Happy Vegetal, s. f.). FISHLY FLAKES de Fish Peas (Riga, Latvia) cuyos ingredientes son proteína de guisante 76%, agua, aceite de colza, hoja de nori 1%, sal, especias (ajo, cebolla, pimienta blanca) y aceite de limón (F'SH PEAS, 2023).

2.5 Conservas alimentarias

En las últimas tres décadas, ha habido un creciente interés por parte de los consumidores en cuanto a la calidad y seguridad de los alimentos disponibles en el mercado (Cano, 2001). Existe una clara tendencia hacia la búsqueda de productos saludables y seguros, que además sean frescos y convenientes para el consumo. Como respuesta, surgieron inicialmente iniciativas para eliminar el uso de aditivos y conservantes a través de procesos térmicos como la pasteurización, esterilización y congelación, los cuales, aunque alarguen la vida útil de los productos, también afectan directamente a sus características iniciales, como la frescura, textura, contenido de nutrientes y color. Como resultado, se han desarrollado tecnologías de conservación que permitan preservar al máximo las propiedades naturales de los alimentos. En el caso de los vegetales, ha surgido el procesado mínimo que involucra el uso de materiales plásticos como barrera, atmósferas modificadas (pasivas y activas) y almacenamiento refrigerado. Esta tecnología permite obtener productos frescos, ya sean cortados o enteros, pero con un período de vida útil limitado de 7 a 15 días (Barbosa *et al*, 1999).

Entendemos por esterilización: *‘El proceso por el que se destruyen en los alimentos todas las formas de vida de microorganismos patógenos o no patógenos, a temperaturas adecuadas, aplicadas de una sola vez o por tindalización. En el ámbito industrial alimentario se considera también como esterilización el proceso por el que se destruyen o inactivan por un período determinado de tiempo, todas las formas de vida de los microorganismos capaces de producir alteraciones en los alimentos en condiciones normales de almacenamiento’* (Decreto

2484/1967). Por ello podemos deducir que una esterilización en la cual consigamos reducir al mínimo posible los supuestos microorganismos es un buen método de conserva de nuestros alimentos.

Los avances más recientes se centran en el uso de tecnologías no térmicas, que preserven las características y seguridad de los productos vegetales durante períodos de tiempo más prolongados. Sin embargo, también se han realizado progresos en el desarrollo de tecnologías térmicas que reduzcan los efectos negativos sobre los productos tratados. Algunas de las tecnologías no térmicas destacadas incluyen campos eléctricos pulsantes, ultrasonidos, altas presiones hidrostáticas, irradiación, campos magnéticos oscilantes, plasma frío y luz blanca de alta intensidad, entre otras (Wilches, 2015).

Puesto que el producto desarrollado en este trabajo es un análogo marino pero con base de proteína vegetal, se regula mediante el reglamento dedicado a las conservas de legumbres. Según el Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español, las conservas alimentarias deben cumplir las siguientes características:

- a) Estar en perfecto estado de consumo.*
- b) Proceder de materia prima que no esté alterada, ni presente síntomas de descomposición, con la madurez y tamaño convenientes.*
- c) Exentas de materias extrañas.*
- d) Estar envasadas, en condiciones técnicas apropiadas, con materiales que resistan al tratamiento y a la acción de los componentes del producto.*
- e) Haber sufrido esterilización, de forma que proporcione al producto la máxima estabilidad en condiciones de consumo.*
- f) Haber sufrido un tratamiento térmico tal que garantice la inactivación de esporas de «C. Botulinum» u otros esporulados.*
- g) Las materias primas a conservar satisfarán las condiciones y requisitos ordenados en este Código y reglamentaciones complementarias.*

Las conservas por lo general se clasifican o bien dependiendo de su envasado, o bien dependiendo de su pH. Según el pH de la conserva, se suelen clasificar en dos grupos: las que tienen pH menor a 4,5 y las que su pH es mayor a 4,5 (Pascual & Calderón, 2000), ya que, dependiendo de su pH, se le aplicará un tratamiento de esterilización u otro.

Para el caso de alimentos de baja acidez, el alimento se somete a una temperatura y presión de vapor suficientemente altas por un tiempo determinado como para que se consiga el efecto letal deseado. Se toma como referencia la destrucción de la bacteria *Clostridium botulinum* altamente letal y cuyas esporas son especialmente resistentes al calor. Si consigue eliminarse, siempre y cuando se conserve la hermeticidad del producto se obtienen productos con vida útil muy prolongada (Daza & Atahualpa, 2017).

En aquellas conservas cuyo pH sea inferior a 4,5 (ácidas), no se puede desarrollar ninguna especie bacteriana del género *Clostridium*, lo que incluye a *Clostridium botulinum*. Sin embargo, sí que pueden sobrevivir como formas vegetativas algunas levaduras, mohos, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, algunas *Clostridium* del grupo butírico, y algunas *Bacillus*. Por esta razón, la tecnología para la elaboración de estas conservas exige métodos de destrucción de los microorganismos acidófilos. Las conservas que tienen un pH mayor a 4,5 son más peligrosas, ya que la menor acidez no les impide a las esporas germinar y multiplicarse, por lo que se requieren baremos de esterilización muy altos para lograr la destrucción de bacterias del género *Clostridium* así como de cualquier otra bacteria patógena (p. ej. *Salmonella*) y la ausencia de toxinas (Pascual & Calderón, 2000). Las conservas con pH menor a 4,5 se someten por lo general a un tratamiento térmico que ronda los 100°C, lo cual es suficiente para producir la inviabilidad de los microorganismos acidófilos; sin embargo, aquellas con un pH mayor a 4,5 precisan de un tratamiento térmico más elevado.

2.5.1 Tratamientos contra *Clostridium botulinum*

El botulismo es una enfermedad provocada por las neurotoxinas que produce *Clostridium botulinum*; las cuales tienen un efecto paralizante progresivo que comienza en los nervios craneales y se extiende de forma caudal a las extremidades (Pérez *et al.*, 2003).

El botulismo alimentario ocurre tras la ingestión de estas neurotoxinas en caso de estar presentes en el alimento (o tras la ingestión de la bacteria una vez empieza a producir las toxinas). Se puede presentar la enfermedad después de 1 a 4 días desde que se ha absorbido la toxina. Según la cantidad ingerida y el estado físico del individuo, puede presentarse la enfermedad desde formas leves que no necesitan atención médica hasta un caso grave en el que puede causarse la muerte tras 24 horas por una parálisis que ocasiona insuficiencia respiratoria. Los síntomas comienzan con afectación de los nervios craneales (diplopía, disartria, disfagia),

aumentándose poco a poco la debilidad motora, que pasa al cuello, a los brazos, tórax y piernas (Pérez *et al.*, 2003). Pueden aparecer náuseas con vómitos y dolor abdominal antes y/o después del principio de la parálisis. También pueden ocurrir mareos, visión borrosa y el sentimiento de tener la boca seca. No aparece la fiebre ya que se produce la enfermedad por la toxina, no por la bacteria en sí; ni tampoco se altera la conciencia. Es usual encontrar las pupilas dilatadas y fijas, que estén los reflejos pupilares atenuados, tener un estreñimiento intenso después de un período de diarrea inicial y sufrir retención urinaria (Castellano, 1998; Fauci *et al.*, 1998).

La toxina botulínica tiene una LD50 (Dosis Letal para el 50% de la población) en ratones de 5,6 pg (Moritz *et al.*, 2018). Para un adulto (con un peso medio de 70 kg), aplicando una única inyección intramuscular, se estima que tiene un NOAEL (Nivel Sin Efecto Adverso Observado, por sus siglas en inglés) de 1100 U/individuo, un LOAEL (Nivel con Efecto Adverso Observado Más Bajo) de 1400 U/individuo, y un LD50 de 2800 U/individuo (Zhang *et al.*, 2022).

Son muchos los alimentos responsables del botulismo, y entre ellos se encuentran principalmente los alimentos enlatados y envasados como pueden ser las verduras (por ejemplo, palmitos, espárragos, champiñones, alcachofas, pimientos, berenjenas, ajos, encurtidos), pescado, marisco y otros, debido a que son envasados al vacío, sin oxígeno. Este ambiente favorece el crecimiento de *Clostridium botulinum* puesto que es una bacteria anaerobia con forma de bacilo o varilla (Figura 1). Sin un tratamiento adecuado del envasado, se favorece su desarrollo y por tanto, la producción de la toxina botulínica (Parrilli, 2008).



Figura 1. Micrografía electrónica de barrido coloreada de la bacteria *Clostridium botulinum*. Cada célula tiene una anchura de 0,3-1,9 μm y una longitud de 1,6-9,4 μm (Smith & Hobbs, 1974). La imagen está ampliada x13.300. Recuperado de Woudstra (2016).

Se conoce como tratamiento térmico a todos los procedimientos los cuales tienen como finalidad la destrucción de microorganismos mediante acción del calor (Casp & Abril, 2003). La toxina botulínica es termolábil, por lo que se destruye fácilmente durante la esterilización en calor en el caso de que se hubiera formado previamente en el alimento. Sin embargo hay que estudiar un mayor tratamiento para eliminar la posible viabilidad de la bacteria.

Para saber el tiempo necesario para conseguir que una espora de *Clostridium botulinum* sufra 12 reducciones decimales a 121°C, debemos partir de su tiempo de reducción decimal a 121°C, el cual es 0,21 min (Pérez-Aparicio *et al.*, s.f.). Para asegurar que el alimento va a carecer de la bacteria, se deben realizar dichas 12 reducciones decimales, por lo que mediante el cálculo:

$$0,21 \text{ min / reducción decimal} \cdot 12 \text{ reducciones decimales} = 2,52 \text{ minutos}$$

Se deduce que debemos llegar al centro del producto con una temperatura de 121°C durante 2,52 minutos. Una temperatura de 121°C durante 2,52 minutos, asegura que se han destruido todas las posibles esporas.

2.6 Líquidos de gobierno

El medio de relleno o líquido de gobierno se refiere a los ingredientes tales como agua, sal, aceite, salsa de tomate, escabeche, entre otros, que se agregan a la conserva con el propósito de mejorar su sabor, reducir el espacio vacío, facilitar la transferencia de calor al producto sólido y permitir el desplazamiento del aire hacia la parte superior del tarro o recipiente utilizado. Posteriormente a la adición del líquido de gobierno, se extrae el aire del espacio de cabeza y se crea un vacío, lo cual contribuye a la estabilidad de la conserva (Cabel, 2019).

Pueden ser muchos los tipos de líquido de gobierno encontrados en el mercado. Nos centramos, según los observados en la industria general del atún enlatado, en: natural, aceite y escabeche. Pueden observarse diferencias entre los diferentes preparados de enlatado según su líquido de gobierno en la Figura 2.



Figura 2. Tres réplicas de cada enlatado de ‘atún vegano’ en tres líquidos de gobierno; al natural (izquierda), en aceite (centro), en escabeche (derecha).

Natural:

Según el Reglamento (UE) 1129/2011 relativo a los aditivos alimentarios, en aquellos alimentos de legumbres enlatadas (entre los que se encuentra nuestro producto por ser un derivado de guisantes a pesar de emular al atún), la dosis máxima permitida de ácido cítrico para conservar es *quantum satis* por lo que utilizaremos la recomendada por Silva *et al.*, (2011), Sluka *et al.*, (2009) y por Guzmán & Pérez (1964), que establecen como óptimos de conserva de cantidad de ácido cítrico entre el 0,35% y 1 parte por mil.

Aceite:

Tras revisar la bibliografía, gracias al trabajo de Arrunátegui (2020) se deduce que la mejor concentración de aceite de oliva frente al agua corriente es de 95% frente a 5% para obtener unas mejores características físicas.

Escabeche:

El escabeche es el método de conservación de alimentos en el cual se utiliza un agente conservante (como es en este caso el vinagre por su acidez). Entendemos por Escabechado al proceso de someter los alimentos en estado crudo o cocido, entero o troceado, a la acción conservante del vinagre añadiendo condimentos para mejorar su sabor con o sin la adición de sal (Torres & Vera, 2019). Para garantizar una conserva segura sin necesidad de un tratamiento posterior al enlatado en la que no crezcan microorganismos, el líquido de gobierno de los productos en escabeche o escabechados deberá presentar, después de estabilizados, un pH (a 20°C) no mayor de 4,3 (Álvarez, 2012). En nuestro trabajo no es necesario alcanzar este pH puesto que sí vamos a realizar un tratamiento posterior al enlatado.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Encontrar un método de conservación óptimo basado en tratamientos térmicos para productos marinos con base de proteína vegetal extrusionados y enlatados ('atún vegano').

3.2 Objetivos específicos

- Utilizar y probar diferentes líquidos de gobierno para seleccionar el que mantiene mejor las propiedades del producto tras el tratamiento.
- Seleccionar las proporciones óptimas producto/líquido de gobierno en el envasado para un mejor aspecto organoléptico del producto.
- Evaluar diferentes tratamientos de temperatura y presión, para garantizar la destrucción microbiana manteniendo las características fisico-químicas y sensoriales del producto.

4. DISEÑO DEL EXPERIMENTO

En este trabajo partimos del producto de ‘atún vegano’ y utilizamos distintas muestras del mismo para realizar pruebas mediante tratamientos térmicos y, haciendo uso de instrumentos de medida de textura, color y pH, además de realizar un análisis sensorial, buscaremos el tratamiento térmico óptimo que interfiera en menor medida con las características sensoriales del producto. Asimismo, se encontrará la mejor relación de cantidad en peso de producto sólido y líquido de gobierno por cada enlatado, debido a las observaciones realizadas en el producto tras someterse al tratamiento. Simultáneamente se probarán los tratamientos con distintos líquidos de gobierno, para ver en definitiva, cuáles son las condiciones de relación sólido/líquido, tipo de líquido de gobierno, y tratamiento, que menos modifican las características fisicoquímicas del producto, eliminando su vida microbiana. Se aplican cuatro tratamientos diferentes utilizando el sistema de autoclave.

15’ 121°C: Autoclave de los productos enlatados, 15 minutos a 121°C. Tres réplicas por cada enlatado con aceite, ‘natural’ y escabeche. Asegura que se han destruido todas las posibles esporas. Comienza con una relación de 56 gramos de producto sólido con 24 gramos de líquido de gobierno en cada enlatado. Se abre tras 8 días de conserva, y se toman medidas comparando con el mismo producto sin tratar, el primer día de enlatado.

5’ 121°C: Autoclave de los productos enlatados, 5 minutos a 121°C. Tres réplicas por cada enlatado con aceite, ‘natural’ y escabeche. También es suficiente para destruir los microorganismos. Se utiliza una relación de 87 gramos de producto sólido con 27 gramos de líquido de gobierno en cada enlatado; el anterior tratamiento desmejoraba mucho el producto.

3’ 45’’ 121°C: Autoclave de los productos enlatados, 3 minutos y 45 segundos a 121°C. Tres réplicas por cada enlatado con aceite de oliva; de los enlatados con escabeche y ‘natural’ se obtienen productos inviables. Mantenemos la relación de 87:27 gramos de sólido/líquido por dar buenos resultados.

2’ 30’’ 121°C: Autoclave de los productos enlatados, 2 minutos y 30 segundos a 121°C. Tres réplicas por cada enlatado con aceite de oliva. Relación de 87:27 gramos de sólido líquido. Se compara el crecimiento microbiano de esta conserva tras 8 días con otra igual sin tratamiento.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materias primas para el ‘atún vegano’

Las materias utilizadas para elaborar el producto son las placas formadas por extrusionado de guisante (Figura 3) procedente de la empresa Dacsa Molendum (Zamora, España) y de los aditivos indicados en las proporciones del punto 4.2, que son:

- Enmascarador del sabor a guisante;
- Aceite de oliva;
- Salsa de soja;
- Aroma de atún liposoluble;
- Aceite de *Schizochytrium*;
- Potenciador de sabor a atún;
- Base de atún vegano.



Figura 3. Izquierda: Placas de extrusionado de guisante. Derecha: Aditivos (a: Enmascarador del sabor a guisante; b: Aceite de oliva; c: Salsa de soja; d: Aroma de atún liposoluble; e: Aceite de *Schizochytrium*; f: Potenciador de sabor a atún; g: Base de atún vegano).

5.2 Proceso de elaboración del producto

Para obtener el producto de atún vegano se deben seguir los siguientes pasos, propuestos por la empresa Mimic SeaFood (Tres Cantos, Madrid, España):

- Descongelar el extrusionado húmedo y cortarlo con la forma deseada.
- Cocinar 400 gramos de texturizado en 1400 mL de agua descalcificada y 100 mL de salsa de soja sin gluten. Se cocinan durante 15 min a intensidad 7 y con tapa (93,3% de agua y 6,6% de salsa de soja).
- Escurrir el texturizado cocido.
- En paralelo a los puntos 2 y 3 se prepara el saborizante: pesar y mezclar los aceites, los aromas y el agua según la Tabla 3.
- Pesar y mezclar homogéneamente del texturizado cocido con el saborizante en el envase y refrigerar y/o congelar.

El citado saborizante va a estar compuesto por los aromas, agua y aceites mencionados en la Tabla 3 en las indicadas proporciones según su porcentaje, y según su peso para 400 g de extrusionado de guisante cocido:

Tabla 3. Concentraciones para la preparación del ‘atún vegano’.

Ingredientes	%	Gramos
Texturizado húmedo de guisante cocido	82,89	400
Aceite de <i>Schizochytrium</i>	0,498	2,401
Agua	12,434	60
Aceite de Oliva	1,658	8
Potenciador de sabor a atún	0,58	2,8
Enmascarador del sabor a guisante	0,249	1,2
Aroma de atún liposoluble	0,033	0,16
Base de atún vegano	1,658	8
TOTAL	100	482,561

5.3 Líquidos de gobierno

Se separan en este trabajo tres líquidos de gobierno, ‘al natural’, aceite y escabeche; obteniendo la posibilidad de conseguir mejores resultados al modificar el producto en tres ramas.

Para la preparación del líquido de conserva que simule el ‘atún al natural’, en este trabajo se usa 1,5 gramos de ácido cítrico, y 5 gramos de NaCl por litro de líquido de gobierno, quedando en un pH igual a 2,71.

En cuanto al líquido de gobierno que simula el ‘atún en aceite de oliva’, se prepara el líquido por cada enlatado por separado de manera que en cada bote se introducen 28 g de líquido de gobierno, de los cuales 1,4 g son de agua corriente y 26,6 g de aceite de oliva virgen de la marca Hacendado, Mercadona (Tabernes Blanques, Valencia, España) con pH igual a 7.

El líquido conservante de escabeche se preparó según las cantidades de la Tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones para la preparación del líquido de gobierno de escabeche.

	Concentración (g/L)
Aceite de oliva	200
Vinagre de manzana	400
Vinagre de vino blanco	400
Sal	5
Pimienta	3
Azúcar	3
Pimentón dulce	3
Laurel	5 (hojas)
Ajo en polvo	3

El proceso de elaboración del escabeche se basa en, calentar previamente el aceite en una olla o sartén, añadir el ajo en polvo, remover 3 minutos, añadir el resto de las especias y agregar el vinagre, reposando a fuego mínimo durante 20 minutos. Debe dejarse enfriar antes de utilizarse como líquido de gobierno. Tendrá un pH final de 2,63.

5.4 Enlatado

En botes de cristal con las dimensiones indicadas en la Figura 4, introducimos 87 gramos de ‘atún vegano’ junto a 28 g de líquido de gobierno variando lo mínimo posible las proporciones del atún comercial enlatado de 56:24, adaptado a nuestras condiciones de producto. En los primeros experimentos sí se probó a mantener las proporciones de 56 gramos de producto con 24 gramos de líquido de gobierno pero se acabó descartando por la clara desmejora del producto tras el tratamiento. Las tapas son de aluminio, con 6 cm de diámetro. El enlatado se realiza poniendo los botes semiabiertos al vapor, y una vez empieza a hervir el líquido de gobierno (aproximadamente a los 4 minutos) se cierran los botes con fuerza para crear vacío en su interior.

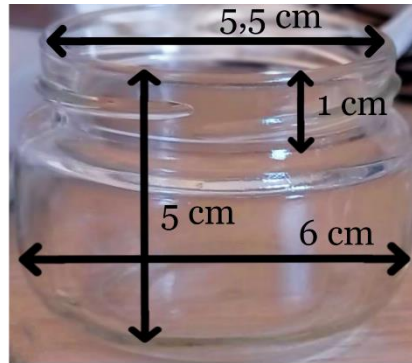


Figura 4. Dimensiones de los botes de cristal utilizados.

5.5 Tratamientos térmicos

Vamos a realizar pruebas aplicando cuatro tratamientos diferentes utilizando el sistema de autoclave Steam Sterilizer, Raypa (Barcelona, España) visualizable en la Figura 5. Siempre por triplicado:

- 15' 121°C: Autoclave de los productos enlatados, 15 minutos a 121°C.
- 5' 121°C: Autoclave de los productos enlatados, 5 minutos a 121°C.
- 3' 45'' 121°C: Autoclave de los productos enlatados, 3 minutos y 45 segundos a 121°C.
- 2' 30'' 121°C: Autoclave de los productos enlatados, 2 minutos y 30 segundos a 121°C.



Figura 5. Steam Sterilizer, Raypa (Barcelona, España).

5.6 Dilución

Para realizar el recuento microbiano en placa, se deben extraer los posibles microorganismos del producto enlatado. De cada bote extraemos 10 gramos de producto sólido, escurrido el líquido de gobierno, y lo introducimos junto a 90 mL de agua estéril en bolsas de prensado estériles preparadas para el homogeneizador, visualizables en la Figura 6. Introducimos las bolsas en el Stomacher® 400 Circulator (Seward Ltd, London, UK) y homogeneizamos el contenido a 200 rpm 30 segundos. Del líquido extraíble homogeneizado tomamos 1 mL que pipeteamos para el cultivo en profundidad en placa. Así tenemos en placa la dilución 10^{-1} . Al ser el atún vegano un producto hervido y en medio semiácido no debe tener un alto contenido en microorganismos por lo que esta dilución es suficiente.



Figura 6. Bolsas estériles para uso en el homogeneizador (izquierda). Stomacher® 400 Circulator (derecha).

5.7 Recuentos microbiológicos

5.7.1 Medios de cultivo

El medio PCA se preparó según las cantidades de la Tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones para la preparación del medio Play Count Agar.

	Concentración (g/L)
Glucosa	1
Triptona	10
Extracto de levadura	2,5
Agar	15

El Reinforced Clostridial Medium se preparó según las cantidades de la Tabla 6.

Tabla 6. Concentraciones para la preparación del Reinforced Clostridial Medium.

	Concentración (g/L)
Extracto de carne	10
Peptona	10
Glucosa (Dextrosa)	5
Cloruro de sodio	5
Extracto de levadura	3
Acetato de sodio	3
Almidón	1
L-Cisteína	0,5
Agar	15

Para el cultivo en profundidad en placa, es el mismo procedimiento para ambos métodos. Se toma 1 mL de la muestra a analizar, se inocula en la placa Petri y posteriormente se añaden 25 mL aproximadamente del medio todavía en estado líquido, autoclavado, a una temperatura cercana a 48°C para que no comprometa la viabilidad de las células. Ambos se dejan crecer al menos 72 h a 28°C desde su inoculación.

Para crear un estado de anaerobiosis para permitir el crecimiento de bacterias anaerobias como *Clostridium*, utilizamos el GasPak Anaerobic System con el paquete creador de atmósfera anaerobia BD Gaspak EZ Anaerobe Container System, visualizables en la Figura 7 según se explica en Tankeshwar & Tankeshwar (2022).



Figura 7. Equipo productor de anaerobiosis GasPak Anaerobic System.

5.7.2 Tinción de Gram

Para caracterizar las células observadas durante el recuento microbiano se utilizó el método de la tinción de Gram desarrollado por Gram (1884). Permite visualizar las diferencias en la estructura de la pared celular de las bacterias y consiste en los siguientes pasos (Rodríguez & Arenas, 2018). Los tintes utilizados pueden visualizarse en la Figura 8:

1. Hacer un frotis con la colonia sobre el portaobjetos de manera regular y dejarlo secar.
2. Fijarlo a la flama.
3. Cubrir con violeta cristal durante 1 minuto y lavar ligeramente con agua corriente.
4. Cubrir con yodopovidona (Lugol) durante 1 minuto y lavar con agua corriente.
5. Decolorar con alcohol al 96° durante 30 segundos y lavar con agua corriente.
6. Cubrir con Safranina durante 1 minuto y lavar con agua corriente.
7. Dejar secar y observar al microscopio a 100X aumentos con aceite de inmersión.



Figura 8. Aceite de inmersión (izquierda). Tintes utilizados para realizar la tinción de Gram (derecha).

5.8 Parámetros fisicoquímicos

5.8.1 Estudio de pH

Se emplearon diferentes metodologías para determinar las propiedades del producto. El pH se midió en la parte sólida del producto, utilizando un pH-metro Crison micropH 2001 (Figura 9), introduciendo el detector de pH dentro del mismo bote una vez abierto. Se realizó en las tres réplicas de ‘atún vegano’ con cada líquido de conserva y se sacó su media y desviación estándar. Para el líquido de gobierno se utilizaron dos métodos. Para el líquido al natural y el escabeche pudo utilizarse el mismo electrodo del pH-metro. Para el aceite, debido a su naturaleza química se tuvo que utilizar el método de tiras reactivas. Se utilizaron las METRIA pH Indicator Strips STPH-311-001 y las Tiras con escala de color PanReac (Barcelona, España).



Figura 9. pH-metro Crison micropH 2001 (izquierda). METRIA pH Indicator Strips STPH-311-001 (centro). Tiras con escala de color PanReac (derecha).

5.8.2 Estudio de color

La determinación del color se midió en el centro del atún, extrayendo una porción y limpiando el líquido de gobierno, utilizando el colorímetro digital de superficie (Minolta CR 400 Series, Japón) visualizable en la Figura 9, previamente calibrado con patrones estándares ($Y=93,2$, $x=0,3133$, $y=0,3192$). Para comparar objetivamente el color entre muestras se utilizó el sistema de CIE (1986) según el cual se delimita cada color según las coordenadas a^* y b^* (cromaticidad colorimétrica) y L^* (luminosidad). Se realizó en las tres réplicas de ‘atún vegano’ en cada líquido de conserva y se sacó su media y desviación estándar.

Los parámetros mencionados como L^* , a^* y b^* son adimensionales pero se pueden separar en tres ejes tal como se observa en la Figura 10 para describir el color que representan. El valor de a^* define la intensidad del color rojo por lo que, si observamos un desplazamiento sobre el eje a^* hacia valores positivos desde el punto acromático 0, se observan los tonos rojos, mientras que un desplazamiento en a^* hacia los valores negativos representa los tonos verdes. El valor b^* mide la intensidad del color amarillo, por lo que un desplazamiento sobre el eje b^* dirigido a valores positivos desde el punto acromático 0, representa los tonos amarillos; y si se obtienen valores negativos, representa tonos azules. Valores positivos de L^* describen tonos más claros, con mayor luminosidad en el color, mientras que valores negativos representan tonos oscuros, cercanos al negro desde el punto acromático 0 (Vargas, 2016).

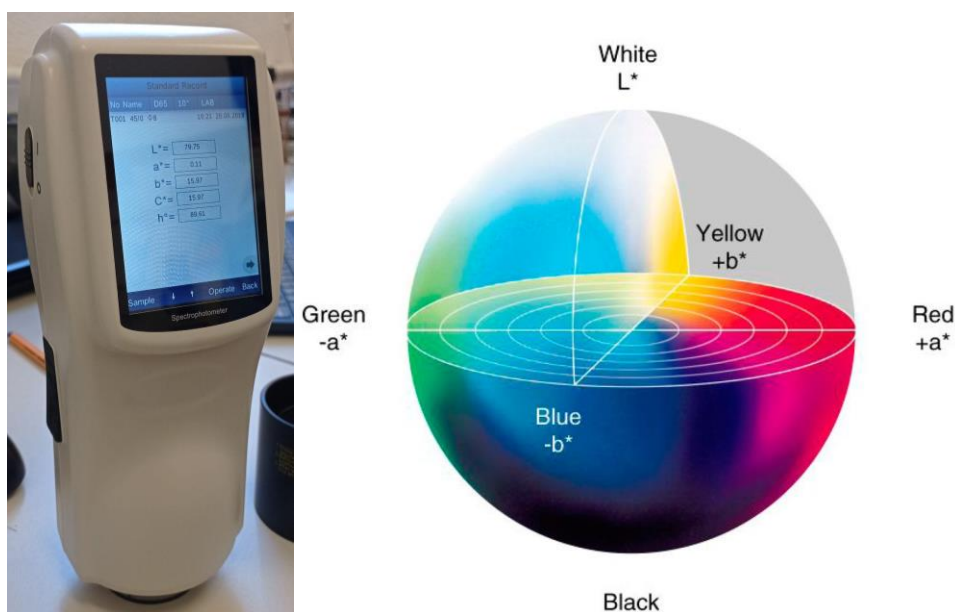


Figura 10. Izquierda: Colorímetro digital de superficie (Minolta CR 400 Series, Japón). Derecha: Representación gráfica del espacio colorimétrico CIELab. Adaptado de Fehir, Aaron. (2016).

Para obtener las tablas con los colores correspondientes a cada muestra presentes en las Tablas 9 y 13 a partir de los datos de L^* , a^* y b^* , se utilizó el programa informático Lab converter (s.f.).

5.8.3 Estudio de textura

Para determinar la textura, se utilizó el método de compresión con el texturómetro (TexVol Instruments TVT-300-XP) de la Figura 11 siguiendo el ensayo del TPA (Análisis de Perfil de Textura) basándonos en los parámetros utilizados por Pino *et al.*, (2017) para medir las características fisicoquímicas de conservas de atún al natural. Se aplicaron dos ciclos de compresión axial con 3 segundos de pausa entre ellos; cada uno hasta el 50% de su altura original (promedio de 37 mm de altura del producto), a una velocidad de test y pre-test de 1 mm/s y una fuerza de 0,05 Kg, utilizando un émbolo con un diámetro de 36 mm y un espesor de 35 mm. Se realizó en las tres réplicas de ‘atún vegano’ en cada líquido de conserva y se sacó su media y desviación estándar.

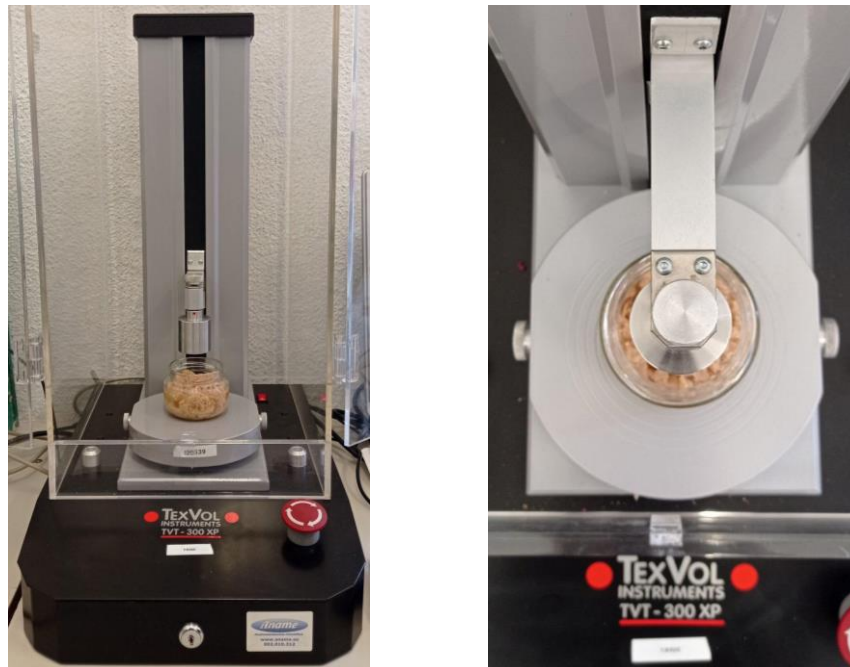


Figura 11. Texturómetro (TexVol Instruments TVT-300-XP).

5.9 Análisis sensorial

Para realizar el análisis sensorial se convocaron a 17 jueces que evaluaron las características sobre el aspecto exterior, aroma, sabor y textura en boca, completando para ello

el formulario expuesto en el ANEXO I. Por orden y por separado se les ofreció una muestra del ‘atún vegano’ en aceite sometido al tratamiento de 2’30’’ a 121°C y dejado enfriar a T^a ambiente, una muestra del ‘atún vegano’ en aceite sin tratar enfriado a T^a ambiente, y una muestra de atún claro en aceite de oliva comercial de la marca Hacendado, Mercadona (Tabernes Blanques, Valencia, España). Se les mostró en este orden para que a la hora de evaluar el ‘atún vegano’ tratado y sin tratar no estuviesen influenciados por la reciente muestra de atún claro comercial. Así se podrán encontrar diferencias significativas estadísticamente entre el ‘atún vegano’ sometido al tratamiento con el que no lo está y con el atún real.

5.10 Análisis estadístico

Para completar el análisis estadístico en cada experimento y observar si había diferencias estadísticas significativas entre cada una de las variables analizadas se utilizó el programa Statgraphics Centurion 19 - X64 Español. Se realizó un ANOVA simple para comparar las diferentes muestras entre ellas y se miró la prueba de Múltiples Rangos que separasen las muestras en grupos homogéneos según cada característica medida, con el fin de encontrar las muestras sin diferencias significativas con un rango de confianza del 95%. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es nula.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Medios de cultivo para el recuento microbiano

PCA (Play Count Agar):

El medio de cultivo Plate Count Agar también conocido como Standard Methods Agar se utiliza para el recuento de bacterias en agua, aguas residuales, alimentos y productos lácteos. El PCA fue desarrollado por Buchbinder, Baris y Goldstein en 1953, cuyos resultados mostraron que un medio deshidratado sin leche que contenía 0,25% de extracto de levadura, 0,5% de triptona, 0,1% de dextrosa y 1,5% de agar por litro se aproximaba a la productividad del agar extracto de triptona y glucosa con leche añadida (Buchbinder *et al.*, 1953). Este medio se recomienda como medio general de placas para determinar el recuento de las poblaciones de bacterias aerobias mesófilas, tanto en superficie como en profundidad certificado por la APHA, FDA y la Organización Internacional de Normalización (1991, 2004, 2019) según las normas ISO 4833, ISO 8552 e ISO 17410 (Marshall, 1992; FDA, 1995).

Reinforced Clostridial Medium:

El Reinforced Clostridial Medium es un medio sólido para cultivo en placa. Se recomienda para el cultivo y recuento de anaerobios, especialmente *Clostridium* (el cual es interesante por ser nuestro producto un alimento en conserva a largo plazo) y otros microorganismos, en alimentos y muestras clínicas. Fue formulado por Hirsch, A. & Grinsted, E. (1954), demostrando que este medio superaba a otros en el apoyo al crecimiento de *Clostridium* a partir de pequeños inóculos y producía mayores recuentos de células viables. La peptona y el extracto de carne de vacuno aportan nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El extracto de levadura es la fuente de vitaminas, especialmente del grupo B. La dextrosa es el hidrato de carbono fermentable que aporta carbono y energía. El cloruro sódico aporta electrolitos esenciales para el transporte y el equilibrio osmótico. El almidón del medio actúa como factor de crecimiento, probablemente funcionando como protector de los coloides, y neutraliza los productos tóxicos que se forman durante el desarrollo de los organismos. El clorhidrato de L-cisteína es el agente reductor y el acetato de sodio es el tampón. Dado que se trata de un medio de enriquecimiento no selectivo, permite el crecimiento

de diversos microorganismos anaerobios y bacterias facultativas cuando se incubaba en condiciones anaerobias (Laboratorios Conda, 2011).

6.2 Recuento microbiano del producto sin tratar

Tras diluir en agua y sembrar un mililitro de los microorganismos extraídos del producto de 'atún vegano' sin la aplicación de ningún tratamiento se hizo el recuento microbiano, obteniendo los resultados expuestos en la Figura 12.

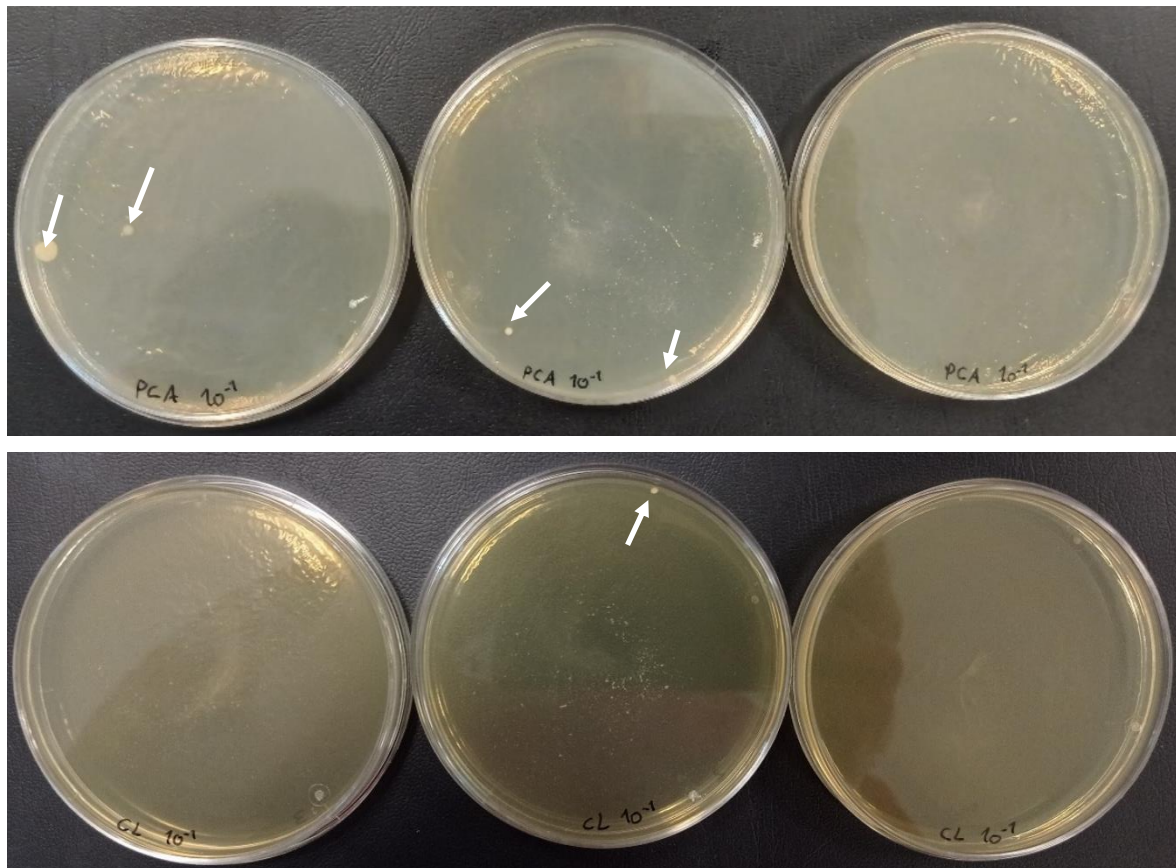


Figura 12. Cultivo de la dilución extraída del 'atún vegano' en profundidad en medio PCA (arriba) y en Reinforced Clostridial Medium en anaerobiosis (abajo) tras 72h a 28°C. Tres réplicas.

Como podemos observar, el producto del que partimos tiene una carga microbiana muy baja, posiblemente a que el extrusionado de guisante pasa por un proceso de cocción previo a la adición de los saborizantes. Este proceso podría eliminar gran parte de los microorganismos presentes. Si las condiciones en las que se acaba de preparar el producto hasta su enlatado son higiénicas, a penas debería aumentar su carga microbiana. Por ello podemos ver que tiene una carga en la dilución 10^{-1} de 0-2 unidades formadoras de colonia (u.f.c) por mililitro en aerobiosis y de 0-1 u.f.c/mL en anaerobiosis. Esto corresponde a una carga microbiana del producto sin

diluir menor a $2 \cdot 10$ u.f.c/mL en aerobiosis, y menor a $1 \cdot 10$ u.f.c/mL en anaerobiosis, probablemente adquiridas durante la manipulación en el procesamiento de enlatar el producto.

6.2.1 Observación *in vivo*

Para intentar elucidar qué tipo de microorganismos se encuentran en el producto, se hace una observación *in vivo* de los microorganismos mediante el microscopio óptico a 64X aumentos, obteniendo las imágenes presentes en la Figura 13.

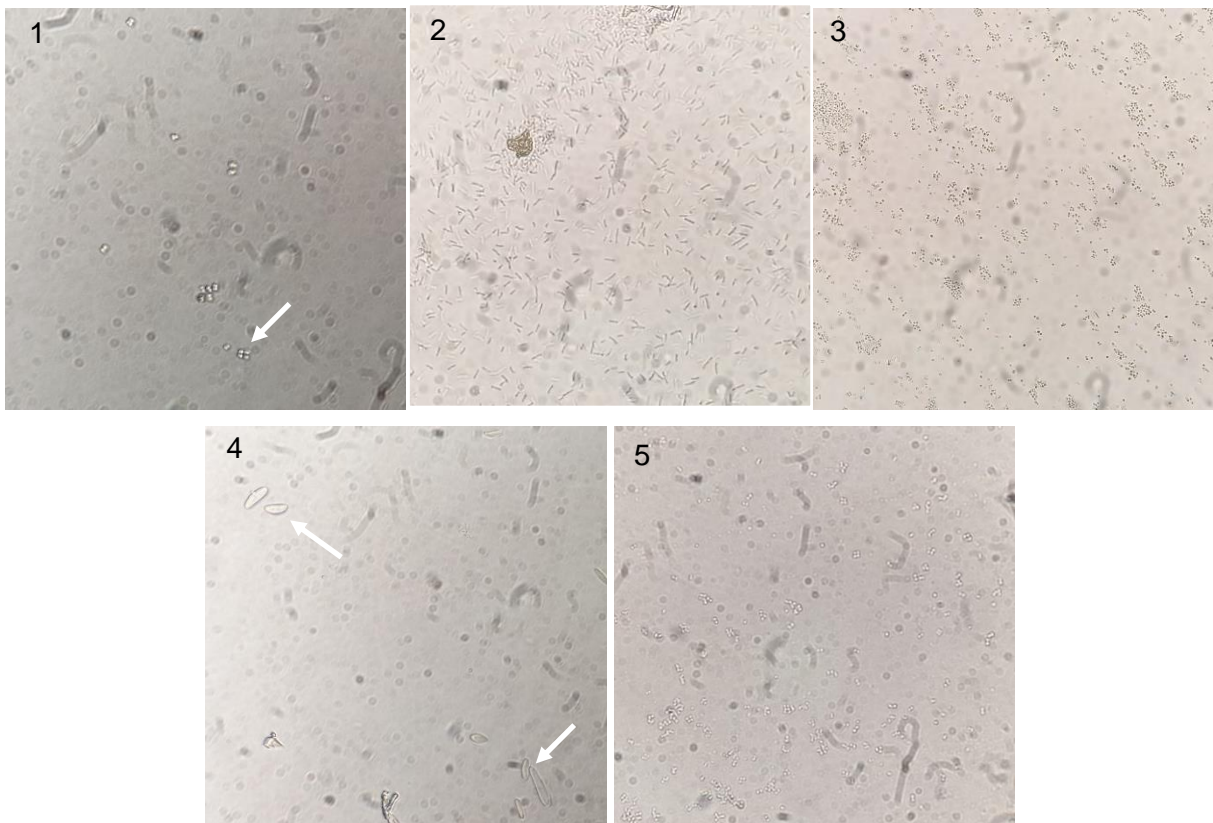


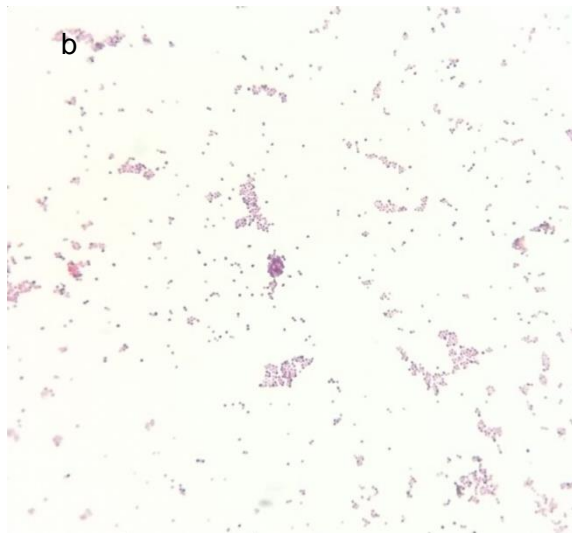
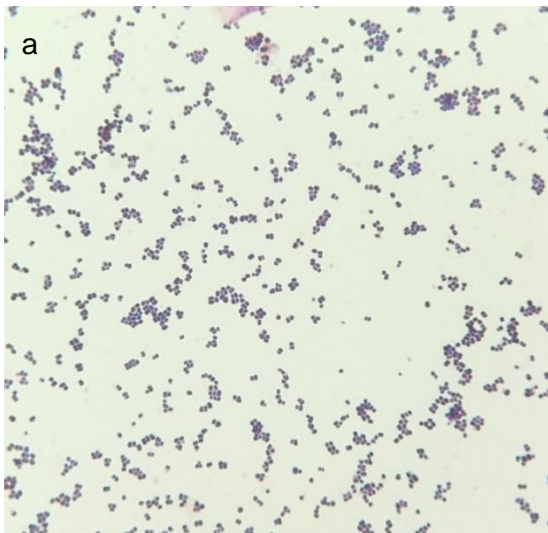
Figura 13. 1: Bacterias con forma de sarcina obtenidas a partir de una colonia en la placa de PCA. 2: Bacilos obtenidos a partir del medio PCA. 3: Micrococos obtenidos a partir del medio PCA. 4: Levaduras obtenidas a partir del medio PCA. 5: Bacterias con forma de sarcina obtenidas a partir del Reinforced Clostridial Medium en anaerobiosis.

Gracias a la observación ‘in vivo’ podemos deducir que aparentemente no hay peligro de que nuestro producto tenga esporas de *Clostridium botulinum*, ya que es una bacteria anaerobia con forma de bacilo o varilla (Parrilli, 2008), y en nuestras placas con Reinforced Clostridial Medium preparadas para favorecer su crecimiento en anaerobiosis, únicamente obtenemos una colonia a partir de las tres réplicas, la cual contiene bacterias con una forma totalmente distinta a la esperada para *C. botulinum*. De hecho, su forma y crecimiento es muy similar a las bacterias con forma de sarcina obtenidas en la placa con medio PCA, por lo que

probablemente nos encontremos ante la misma bacteria, es decir, que sea un microorganismo aerobio facultativo.

6.2.2 Tinción de Gram

Con la intención de obtener más información sobre el tipo de microorganismos presentes en el producto sin tratar, se refrescan los cultivos crecidos en aerobiosis sembrando cada una de las cuatro colonias en un nuevo medio PCA, visualizable su crecimiento tras 72h a 28°C en la Figura 14. Tras ello, se realizó una tinción de Gram a partir de cada cultivo.



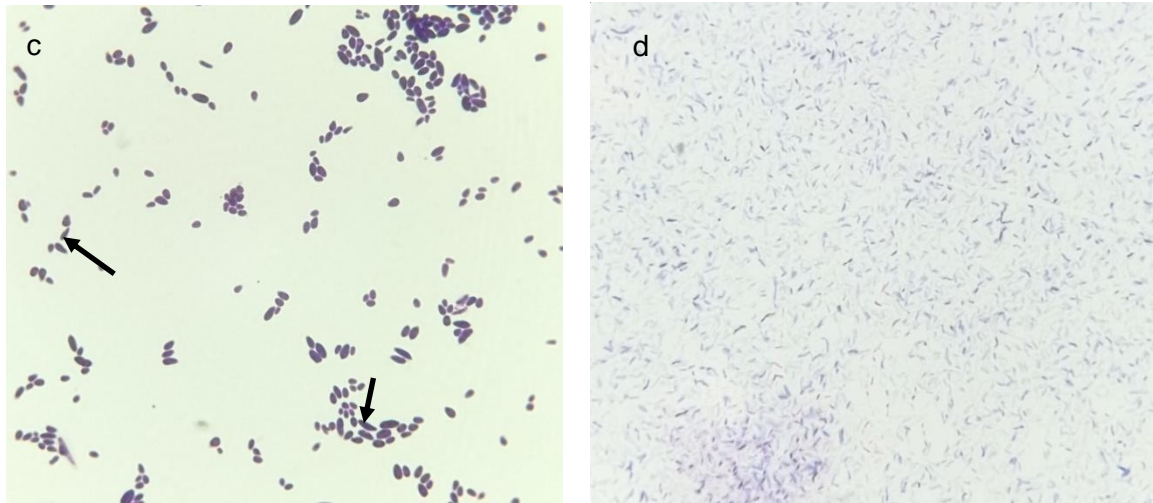


Figura 14. Siembras por estrías obtenidas a partir de cada colonia en medio PCA en la primera imagen. a: Bacterias Gram + con forma de sarcina. 2: Micrococcos Gram -. 3: Levaduras con forma ovoide y gemación. 4: Bacilos Gram +.

Sabiendo las características de estos microorganismos podemos deducir que en el producto previo al tratamiento, tenemos:

- Levaduras de forma ovoide con reproducción por gemación, señalada por flechas en la Figura 14, tal vez pertenecientes al género *Saccharomyces* (Smith *et al.*, 2000);
- Bacterias Gram+ aerobias facultativas con forma de sarcina, podrían pertenecer por su forma, crecimiento y presencia en el alimento a la especie *Staphylococcus epidermidis* (Jiménez *et al.*, 2008);
- Bacterias Gram- con forma de cocos (la mayoría de las bacterias Gram- son perjudiciales, pero algunas de ellas como *Acinetobacter calcoaceticus* y *Acinetobacter lwoffii*, las cuales son inocuas para los humanos (Berlau *et al.*, 1999; Bouvet *et al.*, 1990), se suelen encontrar en alimentos, incluyendo legumbres, y por la forma que observamos podrían ser las que aparecen en el ‘atún vegano’);
- Bacilos Gram+ presentes en el alimento (hay muchas posibilidades con estas características, entre ellas muchas del género *Bacillus* como por ejemplo *Bacillus subtilis* que suele utilizarse en la industria alimentaria para producir enzimas y como probiótico (Lee *et al.*, 2019), o *Bacillus pumilus* (Lazzari *et al.*, 2018) una bacteria inocua para humanos que suele encontrarse en vegetales).

6.3 Parámetros fisicoquímicos según el tratamiento

6.3.1 Natural, aceite y escabeche

6.3.1.1 Estudio de pH

Tras enlatar en cada bote de cristal el producto en diferentes condiciones (distintos líquidos de gobierno y diferentes proporciones en cantidad de producto / líquido de gobierno), y de someterlos a diferentes tratamientos, se analizan sus parámetros físicos y químicos para observar las posibles diferencias entre ellos y encontrar el tratamiento útil menos perjudicial para el producto. En la Tabla 7 se exponen los valores de pH obtenidos en cada uno de los enlatados.

Tabla 7. Promedios de pH y desviación estándar para las tres réplicas de cada producto enlatado según su líquido de gobierno y su tratamiento, tras 8 días de conserva.

	pH		
	Sin tratamiento*	15' 121°C	5' 121°C
Natural	5,46 ± 0,08 ^a	5,46 ± 0,03 ^a	6,89 ± 0,05 ^b
Aceite	7,03 ± 0,01 ^b	6,82 ± 0,03 ^b	6,96 ± 0,02 ^b
Escabeche	5,05 ± 0,27 ^c	4,74 ± 0,09 ^d	5,01 ± 0,04 ^c

*Las letras diferentes en toda la tabla indican que hay diferencia estadística significativa entre las muestras ($p \leq 0,05$).

*En este caso, a los enlatados Sin tratamiento se les realizaron las medidas fisicoquímicas directamente después del enlatado, en el día 0 de inicio de conserva. Los enlatados Sin tratamiento y con 15' a 121°C mantienen las proporciones de producto del atún comercial 56:24 con respecto al líquido de gobierno.

Vemos en la tabla de pH que el tratamiento de 5' a 121°C aparentemente sube mucho el pH del enlatado al natural con respecto a la muestra sin tratamiento, pero la realidad es que los tratamientos no afectan significativamente al pH del enlatado. Lo que ocurre es que en este último tratamiento se recalcularon las cantidades de producto sólido/líquido de gobierno que se introducía en el enlatado y, el producto al ser de pH neutro por estar compuesto en gran porcentaje por agua, actúa con efecto tampón sobre el líquido de gobierno que es ácido debido al ácido cítrico (Guzmán & Pérez, 1964) y mientras en los dos primeros tratamientos no llegaba a subir tanto el pH debido a que la cantidad de producto sólido era menor, en el último tratamiento sí tiene suficiente cantidad para actuar con tal efecto tampón. En el enlatado con escabeche, el líquido de gobierno es lo suficientemente ácido como para que no haya suficiente cantidad de producto sólido para actuar como tampón.

Se observa que diferentes líquidos de gobierno, aportan distintos pHs al producto. Todas tienen un pH mayor a 4,5 por lo que han de someterse a un tratamiento térmico para asegurar la destrucción de posibles esporas de *Clostridium botulinum*.

6.3.1.2 Estudio de color

En la Figura 15 se expone el aspecto exterior de los enlatados de ‘atún vegano’ tras someterse a los tratamientos respectivos y esperar 8 días de conserva antes de abrirlos.

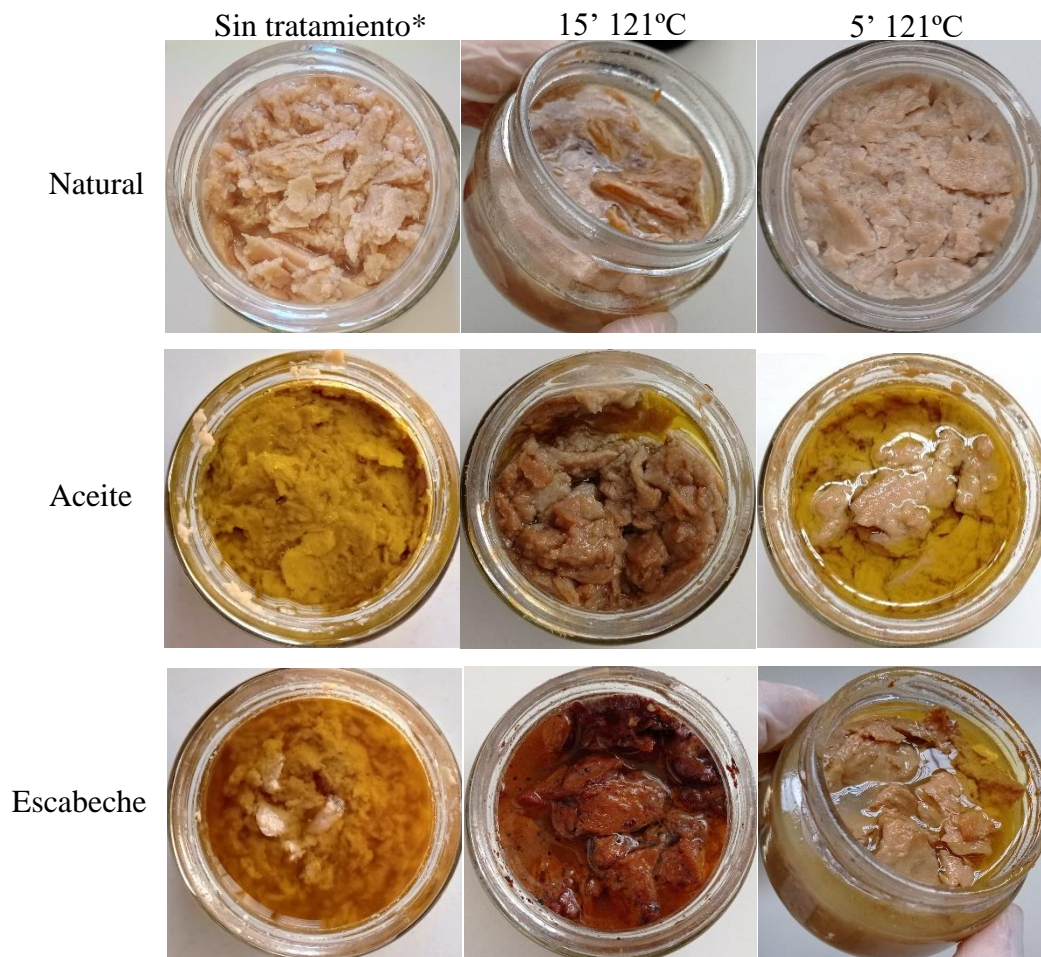


Figura 15. Imágenes obtenidas en laboratorio para cada producto enlatado al abrirlo según su líquido de gobierno y su tratamiento, tras 8 días de conserva.

*En este caso, a los enlatados sin tratamiento se les realizaron las medidas físicoquímicas directamente después del enlatado, en el día 0 de inicio de conserva.

Se observa que aplicar calor en los productos enlatados al natural y en escabeche, provocaba la gelatinización del líquido de conserva al enfriarse, probablemente debido al paso de componentes del producto al líquido de gobierno, como puede ser la solubilización de las pectinas del guisante en el calor, y su solidificación durante el enfriamiento (Castells, 2019). El

único que mantenía su viscosidad inicial era el envasado en aceite de oliva, probablemente por la incapacidad de las pectinas a solubilizarse en este medio. Asimismo son notorias las diferencias en el color y textura entre el producto recién elaborado y el sometido a los tratamientos. Se denota un claro aumento de los tonos oscuros.

La variabilidad en el color se demuestra con los datos expuestos en la Tabla 8.

Tabla 8. Promedios de valores L*, a* y b* definidos por CIE (1986) y su desviación estándar para las tres réplicas de cada producto enlatado según su líquido de gobierno y su tratamiento, tras 8 días de conserva.










		Color		
		L*	a*	b*
Sin tratamiento*	Natural	58,11 ± 3,59 ^a	7,02 ± 0,17 ^{e,f}	18,35 ± 0,65 ^{k,l}
	Aceite	60,71 ± 1,54 ^a	6,33 ± 0,41 ^{e,g}	19,47 ± 1,02 ^{l,m}
	Escabeche	50,25 ± 3,55 ^b	8,30 ± 0,87 ^f	21,03 ± 1,30 ⁿ
15' 121°C	Natural	65,61 ± 2,10 ^c	5,18 ± 0,72 ^{g,h}	19,36 ± 0,49 ^{l,m}
	Aceite	51,97 ± 1,22 ^b	5,39 ± 0,57 ^{g,h}	19,51 ± 0,53 ^{l,m}
	Escabeche	37,93 ± 0,53 ^d	12,43 ± 2,13 ^j	23,42 ± 2,88 ⁿ
5' 121°C	Natural	62,03 ± 0,25 ^{a,c}	3,3 ± 0,86 ⁱ	16,52 ± 0,98 ^k
	Aceite	52,70 ± 4,50 ^b	4,17 ± 0,22 ^{h,i}	16,60 ± 2,76 ^k
	Escabeche	61,69 ± 1,75 ^{a,c}	7,61 ± 0,47 ^{e,f}	22,99 ± 0,42 ^{m,n}

*Las letras diferentes indican que hay diferencia estadística significativa entre las muestras ($p \leq 0,05$).

*En este caso, a los enlatados sin tratamiento se les realizaron las medidas fisicoquímicas directamente después del enlatado, en el día 0 de inicio de conserva.

Trasladamos estas coordenadas del espacio colorimétrico CIELab en los colores representados en la Tabla 9.

Tabla 9. Colores obtenidos según su L*, a* y b* para cada producto enlatado dependiendo de su líquido de gobierno y su tratamiento, tras 8 días de conserva.

	Color		
	Sin tratamiento*	15' 121°C	5' 121°C
Natural			
Aceite			
Escabeche			

*En este caso, a los enlatados sin tratamiento se les realizaron las medidas fisicoquímicas directamente después del enlatado, en el día 0 de inicio de conserva.

Podemos observar que entre los propios productos enlatados sin tratamiento, el mismo día 0 en el que se inicia la conserva, ya presentan algunas diferencias en el color debido a que comienzan a absorber parte del líquido de gobierno. Como es de esperar, el enlatado en aceite presenta un tono más amarillento que al natural, y el enlatado en escabeche parece ser más oscuro. Respecto a los tratamientos, con el líquido de gobierno al natural parece que un tratamiento en calor más fuerte (más tiempo) clarea el producto. Esto puede deberse a la mayor solubilización y desnaturalización de algunas de sus proteínas, absorbiendo más agua y clareando el ‘atún vegano’.

Utilizando aceite como líquido de gobierno, un tratamiento muy fuerte actúa aportando un aspecto más seco, oscuro y rugoso (similar a una fritura) a la parte del producto en contacto con el aceite en el espacio libre de la cabeza del bote. Esto es observable en la Figura 15. En el tratamiento de 15’ a 121°C la relación sólido/líquido es 56:24, por lo que la superficie frita es mucho mayor que en el que se trata 5’ a 121°C, cuya relación es 87:28. Esto se refleja en un menor oscurecimiento de la muestra. Además, según el apartado 1.4.3 del Anejo I de la Orden de 21 de noviembre de 1984 por la que se aprueban las normas de calidad para las conservas vegetales del BOE del Gobierno de España (2013) el espacio libre de cabeza de bote debe cumplir que, en envases de formato comprendidos entre 225 y 1.700 ml, la altura del espacio libre o cabeza del bote en las conservas no debe ser superior al 10% de la altura interior del envase. Una vez acabado el tratamiento, el producto parece haber disminuido mucho su tamaño como puede comprobarse en la Figura 15, por lo que a pesar de tener un espacio libre de cabeza menor al 10% previo al enlatado, éste aumenta por encima del 10% tras el tratamiento. Por ello y por el aspecto de haberse frito, se deduce que una relación de 87 gramos de sólido con 28 gramos de líquido de gobierno es la óptima para seguir con el trabajo.

En el enlatado con escabeche se muestra claramente una tendencia al oscurecimiento con un tratamiento de 121°C durante 15 minutos, desmejorando la asociación que intencionadamente se busca entre el producto de ‘atún vegano’ con atún real comercial. Vemos que el tratamiento de 5 minutos parece clarificar el producto, pero esto se debe a que la concentración en este último tratamiento de producto sólido respecto al líquido de gobierno es 87:28 y no 56:24 como los anteriores, por lo que al disminuir la cantidad de líquido de escabeche (el cual de por sí ya es oscuro) en relación al producto sólido, aunque le demos tratamiento térmico sigue siendo más claro que el que tenía mayor porcentaje de líquido de gobierno.

6.3.1.3 Estudio de textura

Se exponen en la Tabla 10 los valores en promedio obtenidos por triplicado de cada característica de la textura:

Tabla 10. Promedios de valores característicos de la textura y su desviación estándar para las tres réplicas de cada producto enlatado según su líquido de gobierno y su tratamiento, tras 8 días de conserva.

		Textura			
		Dureza	Elasticidad	Adhesividad	Resiliencia
Natural	Sin tratamiento*	3406 ± 10 ^{a,b}	0 ± 0 ^a	20 ± 8 ^a	0,26 ± 0,03 ^a
	15' 121°C	4317 ± 274 ^{b,c}	0 ± 0 ^a	34 ± 3 ^a	0,17 ± 0,04 ^{b,c}
	5' 121°C	6019 ± 925 ^{c,d}	0 ± 0 ^a	9135 ± 792 ^b	0,1 ± 0,07 ^{c,d}
Escabeche	Sin tratamiento*	5069 ± 806 ^{b,c}	0 ± 0 ^a	19 ± 7 ^a	0,25 ± 0,06 ^a
	15' 121°C	5452 ± 564 ^{b,c}	0 ± 0 ^a	21 ± 7 ^a	0,22 ± 0,02 ^{a,b}
	5' 121°C	10260 ± 486 ^e	0 ± 0 ^a	464 ± 488 ^a	0,14 ± 0,05 ^{c,d}
Aceite	Sin tratamiento*	2230 ± 565 ^a	0 ± 0 ^a	127 ± 45 ^a	0,13 ± 0,03 ^{c,d}
	15' 121°C	4319 ± 328 ^{b,c}	0 ± 0 ^a	30 ± 20 ^a	0,12 ± 0,02 ^{c,d}
	5' 121°C	7787 ± 607 ^d	0 ± 0 ^a	3623 ± 153 ^c	0,09 ± 0,03 ^d

		Gomosidad	Masticabilidad	Flexibilidad
		Natural	Sin tratamiento*	2538 ± 719 ^a
Natural	15' 121°C	1743 ± 188 ^{a,b}	1094 ± 179 ^{a,b}	0,63 ± 0,04 ^b
	5' 121°C	21 ± 474 ^c	13 ± 77 ^b	0,14 ± 0,04 ^c
	Escabeche	Sin tratamiento*	4851 ± 773 ^d	2935 ± 219 ^c
Escabeche	15' 121°C	2508 ± 647 ^a	2191 ± 659 ^{a,c}	0,73 ± 0,03 ^a
	5' 121°C	7214 ± 892 ^e	5288 ± 12 ^d	0,78 ± 0,10 ^a
	Aceite	Sin tratamiento*	1007 ± 217 ^{b,c}	614 ± 239 ^b
Aceite	15' 121°C	1568 ± 732 ^{a,b}	1047 ± 670 ^{a,b}	0,75 ± 0,03 ^a
	5' 121°C	4042 ± 983 ^d	1443 ± 243 ^a	0,81 ± 0,17 ^a

*Las letras diferentes en la misma columna indican que hay diferencia estadística significativa entre las muestras ($p \leq 0,05$).

*En este caso, a los enlatados sin tratamiento se les realizaron las medidas fisicoquímicas directamente después del enlatado, en el día 0 de inicio de conserva.

La dureza nos explica la fuerza máxima que se aplica en el primer ciclo de compresión. La adhesividad es el trabajo que debe hacer el texturómetro para extraer el émbolo de la muestra. Podemos ver que tanto la dureza como la adhesividad son siempre mayores en la muestra tratada 5 minutos a 121°C que en las otras dos. Esto se debe a la mayor cantidad de producto sólido en esta muestra. Sin embargo, a pesar de tener diferentes cantidades de sólido

en uno de los tratamientos, también podemos sacar algunas conclusiones. La resiliencia es lo bien que un producto intenta recuperar su posición original. La gomosidad es el aspecto en textura de goma, y es función de la dureza y la cohesividad. La masticabilidad se deduce del segundo ciclo de compresión y expresa de la fuerza que se debe hacer para masticar el producto. La flexibilidad se define como lo bien que un producto se recupera tras la primera compresión, y depende de la distancia que recorra el émbolo hasta comenzar la segunda compresión (González *et al.*, 2015). Puede entenderse mejor observando la Figura 16.

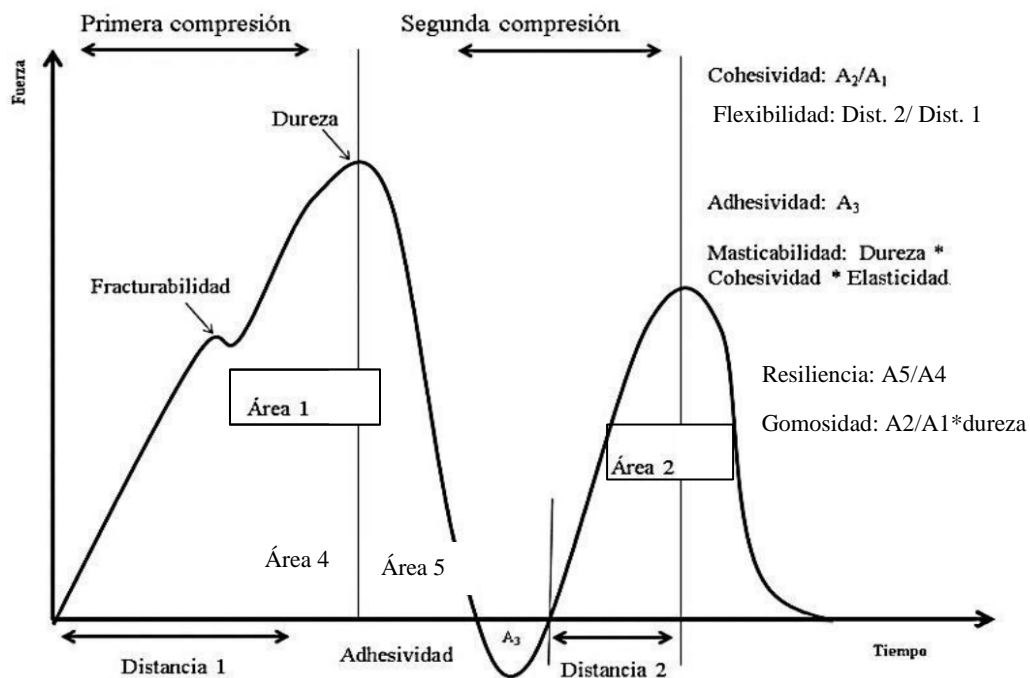


Figura 16. Gráfica del análisis de perfil de textura. Adaptado de González *et al.*, 2015.

El enlatado al natural tiene una clara menor resiliencia, gomosidad, masticabilidad y flexibilidad en los productos tratados con respecto al producto sin tratar. Esto se debe a que el producto sin tratar se ha medido en el día 0 de conserva, por lo que el tratamiento en calor más la espera de 8 días de conserva van deshaciendo el producto disminuyendo así estas cualidades y desmejorando el producto.

En los enlatados en escabeche parece variar mucho su gomosidad y masticabilidad, probablemente porque al ser un producto con base de proteína de guisante y no animal, sus proteínas en un ambiente tan ácido coagulan y precipitan (Quinga, 2017; Bonino *et al.*, 2016), expulsando parte del agua que mantiene en su interior al medio, y dando una textura más desagradable, parecida a la goma.

En el ‘atún vegano’ enlatado con aceite se observa que, para la misma cantidad de producto, el tratamiento de 15 minutos no modifica significativamente su gomosidad con respecto al producto sin tratar, ni tampoco el resto de las cualidades de textura. Únicamente se ve modificada significativamente su dureza y flexibilidad, probablemente por el efecto comentado de dar aspecto de fritura cuando su cantidad sólida es más baja que 87:27 con respecto al líquido de gobierno, por lo que mantendría una mejor textura aumentando su proporción. En el siguiente apartado se estudiarán únicamente los enlatados en aceite como líquido de gobierno por mantener mejor las características de color, textura y por no gelatinizar el medio, aportando más información sobre su variación con los distintos tratamientos.

6.3.2 Aceite como líquido de gobierno

6.3.2.1 Estudio de pH en aceite

Tras aplicar los tratamientos de 2 minutos y 30 segundos, de 3’45’’ y de 5’ a enlatados de ‘atún vegano’ en aceite de oliva en proporción sólido/líquido de gobierno 87:28, se esperaron 8 días de conserva previo a la medición de las características fisicoquímicas como se explicó en el apartado de Materiales y Métodos. Se expone en la Tabla 11 las medias y desviaciones típicas de pH de las muestras por triplicado. También se expone en la Figura 17 un ejemplo de la gráfica de medias para entender por qué son estadísticamente diferentes las muestras.

Tabla 11. Promedios de pH y desviación estándar para las tres réplicas de cada producto enlatado en aceite según su tratamiento, tras 8 días de conserva.

pH				
Día 0	Sin tratamiento	2’ 30’’ 121°C	3’ 45’’ 121°C	5’ 121°C
7,03 ± 0,01 ^a	5,62 ± 0,12 ^b	7,00 ± 0,03 ^a	7,03 ± 0,03 ^a	6,96 ± 0,02 ^a

*Las letras diferentes indican que hay diferencia estadística significativa entre las muestras ($p \leq 0,05$).

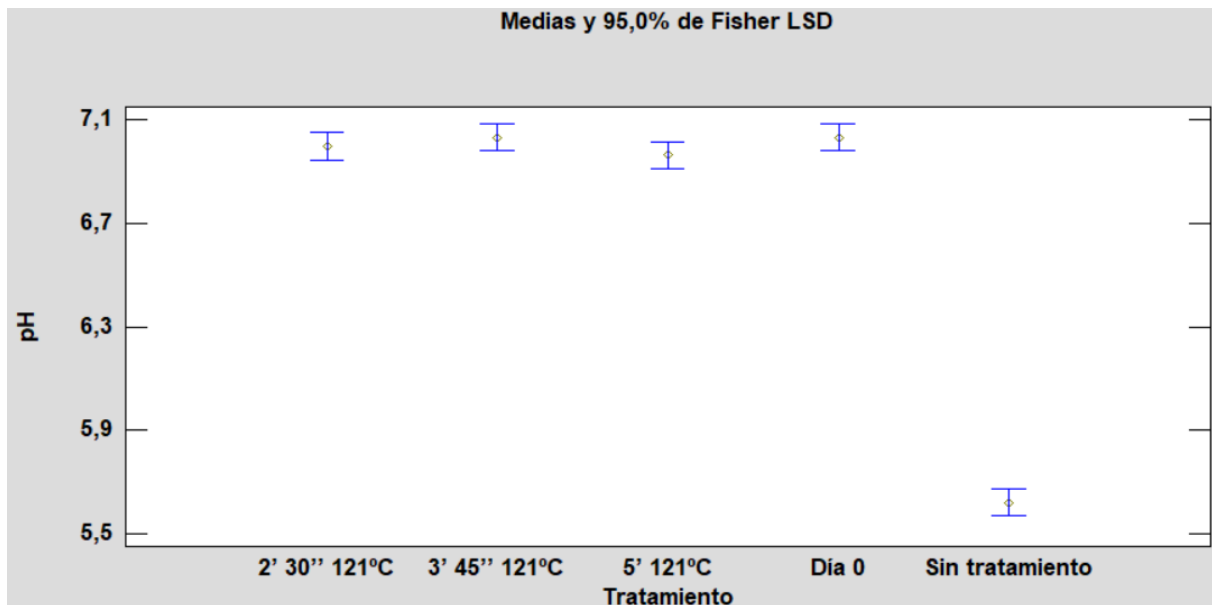


Figura 17. Gráfica que representa las medias de pH y sus intervalos de confianza para cada producto enlatado en aceite según sus réplicas, dependiendo del tratamiento al que fueron sometidos.

La Figura 17 muestra en la gráfica la media de pH para cada uno de los productos según su tratamiento y un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces. Cualquier par de intervalos que no se traslapen verticalmente corresponden a pares de medias que tienen una diferencia estadísticamente significativa.

Gracias a ello y a la prueba de Rangos Múltiples podemos deducir que los tratamientos en autoclave no afectan al pH. De hecho, únicamente en la muestra que no ha sido tratada se observa que sí aumenta significativamente su acidez, obteniendo un pH más bajo. Probablemente esto se debe a que, al no estar tratado, permanecen vivos ciertos microorganismos que acidifiquen el medio. Esto sería la primera prueba de que los tratamientos en autoclave eliminan los microorganismos presentes en el 'atún vegano', permitiendo conservar el producto mucho más tiempo.

6.3.2.2 Estudio de color en aceite

En la Figura 18 se expone el aspecto exterior de los enlatados de 'atún vegano' en aceite tras someterse a los respectivos tratamientos y esperar 8 días de conserva antes de abrirlos.

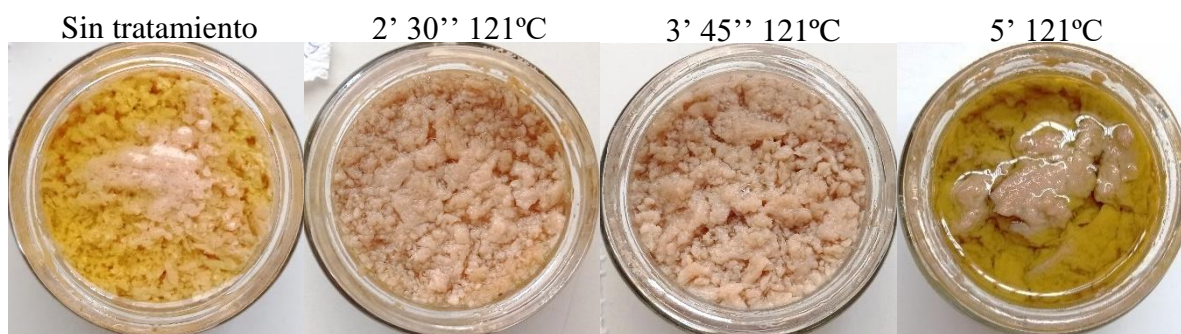


Figura 18. Imágenes obtenidas en laboratorio para cada producto enlatado en aceite al abrirlo según su tratamiento, tras 8 días de conserva.

En este caso, todos los enlatados llevan la misma proporción de aceite con respecto al producto sólido. En los dos tratamientos del centro de la Figura 18 el aceite se encuentra por debajo del sólido mientras que en las dos imágenes de los extremos se encuentra por encima. Esto se debe puramente al azar por tomar la fotografía en el momento justo en que se abrió el bote, seguramente por haber sido almacenados en posiciones diferentes. Como puede observarse, el tratamiento de 5' a 121°C, todavía parece oscurecer demasiado el producto con respecto al 'atún vegano' en aceite sin tratamiento. Sin embargo, los dos tratamientos de 2'30'' y de 3'45'' a 121°C mantienen mucho mejor el color inicial del producto. Podría incluso darse el caso de que el crecimiento de microorganismos decolore el producto en el enlatado sin tratar (Dey, 2018; Bautista *et al.*, 2011). Esto puede demostrarse con los datos obtenidos por el colorímetro expuestos en la Tabla 12.







Tabla 12. Promedios de valores L*, a* y b* definidos por CIE (1986) y su desviación estándar para las tres réplicas de cada producto enlatado en aceite según su tratamiento, tras 8 días de conserva.

	Color		
	L*	a*	b*
Día 0	60,71 ± 1,54 ^{a,b}	6,33 ± 0,41 ^a	19,47 ± 1,02 ^a
Sin tratamiento	65,07 ± 1,91 ^a	6,42 ± 1,15 ^a	20,22 ± 1,13 ^a
2' 30'' 121°C	59,34 ± 1,71 ^b	5,28 ± 0,71 ^{a,b}	17,56 ± 1,04 ^{a,b}
3' 45'' 121°C	56,79 ± 0,72 ^b	5,61 ± 0,45 ^a	18,90 ± 0,61 ^{a,b}
5' 121°C	52,70 ± 4,50 ^c	4,17 ± 0,22 ^{b,c}	16,60 ± 2,76 ^b
Atún comercial	53,92 ± 1,80 ^{b,c}	3,15 ± 0,40 ^c	22,26 ± 1,30 ^a

*Las letras diferentes en la misma columna indican que hay diferencia estadística significativa entre las muestras ($p \leq 0,05$).

Trasladamos estas coordenadas del espacio colorimétrico CIELab en los colores representados en la Tabla 13.

Tabla 13. Colores obtenidos según su L*, a* y b* para cada producto enlatado en aceite dependiendo de su tratamiento, tras 8 días de conserva.

Color					
Día 0	Sin tratamiento	2' 30'' 121°C	3' 45'' 121°C	5' 121°C	Atún comercial
					

De las anteriores Tablas 12 y 13, podemos deducir que los dos tratamientos más suaves, los de 2'30'' y de 3'45'' a 121°C tienen las mismas características de luminosidad y desplazamiento en los ejes a* y b* que el producto sin tratar en el día 0 de conserva. También vemos que el producto sin tratar sí parece estar aumentando su luminosidad tras los 8 días de conserva por lo que tal vez los microorganismos presentes se encuentren decolorando el producto (Dey, 2018; Bautista *et al.*, 2011). Para el tratamiento de 5' a 121°C parece ser demasiado fuerte porque sí oscurece notoriamente el producto. Vemos con los datos del atún real comercial que éste es estadísticamente igual a nuestras muestras de 'atún vegano' en cuanto a los ejes L* y b* pero es significativamente diferente en el eje a* lo que se refleja en unos tonos más anaranjados. Posteriormente se demostrará si los consumidores son capaces de detectar estas diferencias de color mediante un análisis sensorial.

Estos resultados coinciden con los esperados para el atún comercial; en Pino *et al.*, (2017) probaron tres tratamientos de esterilización por calor y presión y observaron que cuanto más fuerte era el tratamiento obtenían valores más bajos para L*, más bajos para a* y sin diferencias significativas en b*. Esto es equiparable con nuestros resultados donde un tratamiento más fuerte da valores más bajos en L* y en a*.

6.3.2.3 Estudio de textura en aceite

Se exponen en la Tabla 14 los valores en promedio obtenidos por triplicado de cada característica de la textura para los productos enlatados en aceite de oliva:

Tabla 14. Promedios de valores característicos de la textura y su desviación estándar para las tres réplicas de cada producto enlatado en aceite según su tratamiento, tras 8 días de conserva.

	Textura			
	Dureza	Elasticidad	Adhesividad	Resiliencia
Día 0	2230 ± 565 ^a	0 ± 0 ^a	127 ± 45 ^a	0,13 ± 0,03 ^a
Sin tratamiento	2146 ± 427 ^a	0 ± 0 ^a	3577 ± 797 ^b	0,05 ± 0,02 ^b
2' 30'' 121°C	6556 ± 634 ^b	0 ± 0 ^a	4496 ± 578 ^b	0,07 ± 0,00 ^b
3' 45'' 121°C	5925 ± 639 ^b	0 ± 0 ^a	5404 ± 342 ^b	0,07 ± 0,02 ^b
5' 121°C	7787 ± 607 ^b	0 ± 0 ^a	3623 ± 153 ^b	0,09 ± 0,03 ^b

	Gomosidad	Masticabilidad	Flexibilidad
Día 0	1007 ± 217 ^{a,b}	614 ± 239 ^a	0,60 ± 0,11 ^a
Sin tratamiento	790 ± 131 ^a	489 ± 130 ^a	0,61 ± 0,07 ^a
2' 30'' 121°C	2576 ± 993 ^{c,d}	2797 ± 107 ^{a,b}	0,97 ± 0,04 ^b
3' 45'' 121°C	2276 ± 938 ^{b,c}	1328 ± 927 ^{a,b}	0,62 ± 0,12 ^a
5' 121°C	4042 ± 983 ^d	1443 ± 243 ^b	0,81 ± 0,17 ^{a,b}

*Las letras diferentes en la misma columna indican que hay diferencia estadística significativa entre las muestras ($p \leq 0,05$).

Como podemos observar, en cuanto a dureza parece que el tratamiento en calor endurece los productos enlatados en aceite, y los diferencia estadísticamente con los que no se han sometido a tratamiento. En cuanto a adhesividad, el único que muestra una baja adhesividad es el producto analizado el día 0 de conserva, todos los demás tienen una alta adhesividad, probablemente porque el tiempo en contacto con el aceite aumenta su pegajosidad. Igual pasa con la resiliencia, donde la única que se diferencia es en el producto el día 0 de conserva, siendo ésta más alta. En la gomosisidad hay mayor dispersión, con una tendencia a aumentar en los productos tratados con autoclave con respecto a los que no han sido tratados. Sobre la masticabilidad, parece aumentar con los tratamientos en autoclave, así como su flexibilidad, pero ambas se mantienen bastante parecidos a los 'atunes veganos' sin tratar. Deberá evaluarse sensorialmente para ver si estas diferencias en textura son perceptibles.

Si comparamos estos resultados con la bibliografía existente, vemos que Pino *et al.*, (2017) aplicó tres tratamientos de autoclave distintos a muestras de atún animal, y no encontró diferencias significativas entre ellas en ninguno de los aspectos analizados. Esto coincide con nuestros datos en cuanto a dureza, adhesividad, resiliencia y masticabilidad, ya que en ninguna de estas hay variabilidad entre las muestras tratadas. Sin embargo el 'atún vegano' sí presenta leves diferencias significativas en gomosisidad y flexibilidad entre muestras autoclavadas.

Puesto que los que mantienen mejor las características a nivel de color, textura y aspecto exterior son los que se han sometido a tratamientos leves de 2'30'' y 3'45'' a 121°C en autoclave, se realiza el recuento microbiológico del que tiene un tratamiento menor (por ende si en este no hay microbios tampoco los habrá en tratamientos más fuertes).

6.4 Crecimiento microbiano del producto tratado en aceite

Se prepararon dos muestras de 'atún vegano' en aceite (por triplicado). Una de ellas se sometió al tratamiento de 2'30'' a 121°C en autoclave y la otra no se sometió a ningún tratamiento más que el envasado al vacío. Ambas reposaron a T^a ambiente durante 8 días. Tras tomar las muestras, diluir en agua como se explica en Materiales y Métodos con el Stomacher, y sembrar un mililitro de los microorganismos extraídos del producto de 'atún vegano' se hizo la observación del crecimiento microbiano, obteniendo los resultados expuestos en las Figuras 19 y 20.

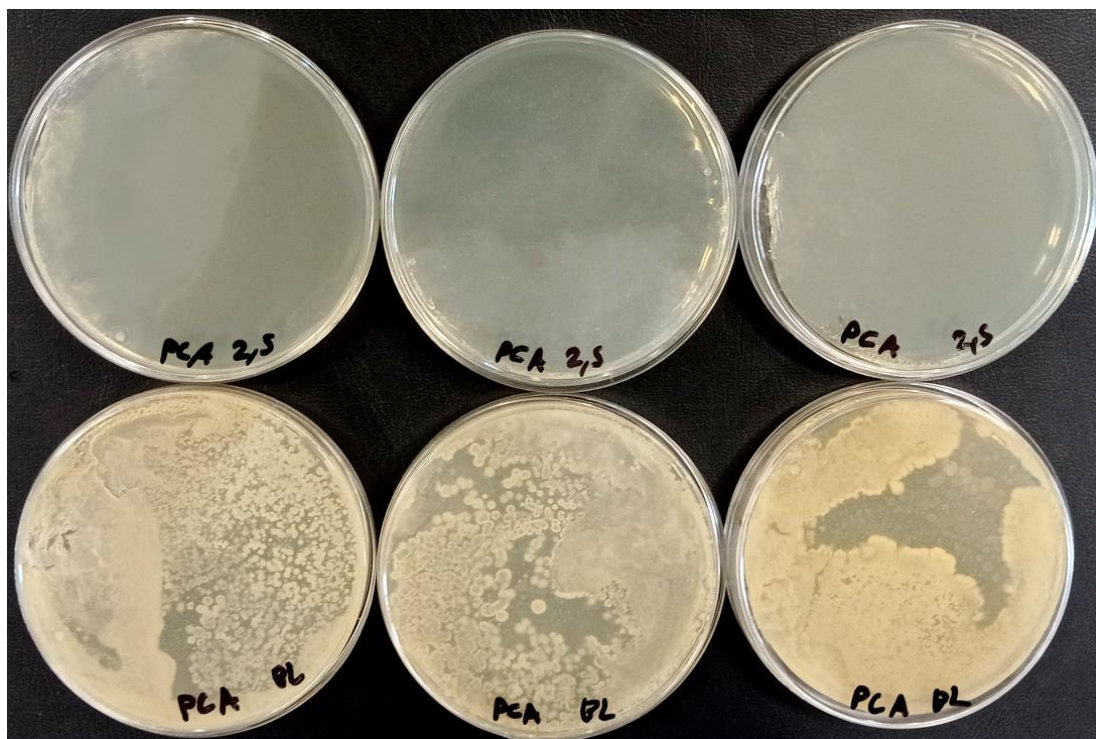


Figura 19. Tres réplicas de crecimiento microbiano obtenido del 'atún vegano' enlatado y reposado 8 días a T^a ambiente tras un tratamiento de 2'30'' a 121°C (arriba) y del mismo sin tratar (abajo), crecidos en medio PCA.

Como podemos observar, en un medio PCA aerobio han crecido una cantidad muy alta de colonias. Lo que interesa en este caso no es hacer recuento de unidades formadoras de colonias ni sus reducciones decimales, sino poder demostrar que, tras ocho días de crecimiento

de los microorganismos presentes en la conserva, debería haber al menos una colonia en los medios expuestos al producto tratado. Sin embargo, no aparece rastro de ningún organismo aerobio. Esto demuestra, que un tratamiento de 121°C durante 2 minutos y 30 segundos es suficiente para eliminar todas las posibles esporas de microorganismos aerobios presentes en el producto.

Puesto que este producto es un enlatado envasado al vacío, se debe comprobar también la ausencia de microorganismos anaerobios, por lo que se crea una situación de ambiente anaerobio y se siembran desde las mismas muestras de 'atún vegano' (tres bajo tratamiento y tres sin tratar) en medios que favorecen el crecimiento de *Clostridium* para demostrar su ausencia. Los resultados se exponen en la Figura 20.

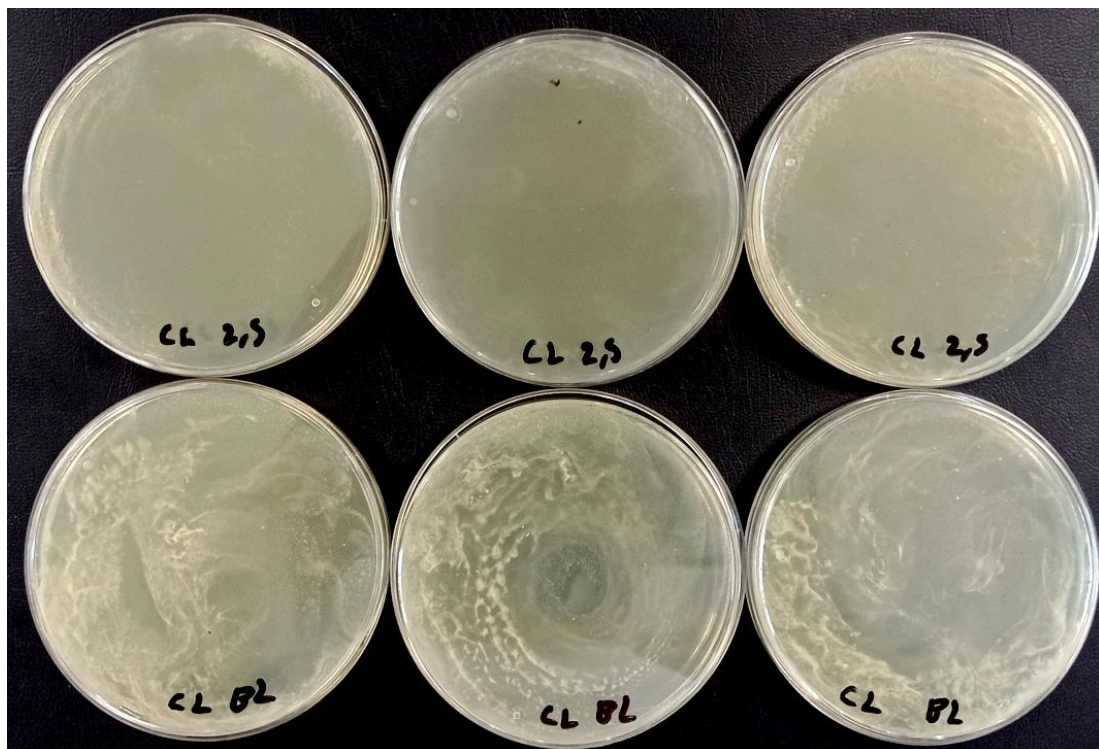


Figura 20. Tres réplicas de crecimiento microbiano obtenido del 'atún vegano' enlatado y reposado 8 días a T^a ambiente tras un tratamiento de 2'30" a 121°C (arriba) y del mismo sin tratar (abajo), crecidos en anaerobiosis en Reinforced Clostridial Medium.

Con esta imagen queda demostrado que el tratamiento ha sido suficiente para eliminar todas las posibles formas de vida microbiana anaerobia. Vemos que los medios en los que se inoculó la muestra sin tratar ha crecido una gran masa uniforme de microorganismos, mientras que en los medios en los que se inoculó la muestra sometida al tratamiento no ha crecido ningún rastro de ellos. Por ello podemos decir que éste ha pasado a ser un alimento

seguro a nivel microbiológico, y la fecha de consumo preferente dependerá únicamente de su deterioro con el tiempo y no del crecimiento de microorganismos en él. Como se explicó en la introducción, para conseguir que una espora de *Clostridium botulinum* sufra 12 reducciones decimales a 121°C, debemos partir de su tiempo de reducción decimal a 121°C, el cual es 0,21 min (Pérez-Aparicio *et al.*, s.f.). Para asegurar que el alimento va a carecer de la bacteria, se deben realizar 12 reducciones decimales, por lo que 2,52 minutos a 121°C asegura que se han destruido todas las posibles esporas.

6.5 Análisis sensorial

Se realizó una prueba piloto con 17 jueces que probaron el ‘atún vegano’ sometido al tratamiento de 2'30" a 121°C, así como el mismo sin tratar preparado el mismo día y una muestra de atún real comercial, sin decirles en ningún momento qué estaban probando, entregándoles una ficha para evaluar las muestras tal como se expone en el ANEXO I. Se hace con el fin de demostrar si los consumidores son capaces de detectar las diferencias provocadas por el tratamiento a la muestra. Tras la prueba se extraen los datos, se hacen medias y gracias al Statgraphics encontramos si aparecen diferencias significativas estadísticamente entre las muestras evaluadas en cada aspecto. Estos resultados se exponen en las siguientes Tablas 15, 16, 17 y 18.

Tabla 15. Promedios de la evaluación de cada característica del aspecto exterior del producto enlatado en aceite con y sin tratamiento y de atún real comercial, con su desviación estándar.

Producto	Aspecto exterior		
	Color del atún	Desmigado	Me recuerda al atún
2'30" 121°C	5,41 ± 1,28 ^a	4,59 ± 1,33 ^a	5,59 ± 1,28 ^a
Sin tratamiento	6,24 ± 0,66 ^b	4,71 ± 1,57 ^a	6,12 ± 0,86 ^a
Atún comercial	6,56 ± 0,51 ^b	6,31 ± 0,60 ^b	6,88 ± 0,34 ^b

*Las letras diferentes en la misma columna indican que hay diferencia estadística significativa entre las muestras ($p \leq 0,05$).

Como se expone en la anterior tabla, a pesar de que los jueces fueron capaces de encontrar diferencias en el aspecto exterior entre el producto vegano tratado y el atún real, se obtuvieron valores altos tanto para el producto de ‘atún vegano’ tratado como sin tratar. Lo que explica que a pesar de no coincidir totalmente con el atún real exteriormente, sí es agradable para los consumidores. Vemos que el tratamiento de 2'30" a 121°C, únicamente es perceptible por los consumidores a nivel del color, diferenciándolo del producto sin tratar.

Tabla 16. Promedios de la evaluación de cada característica del aroma del producto enlatado en aceite con y sin tratamiento y de atún real comercial, con su desviación estándar.

Producto	Aroma			
	Aroma a pescado	Aroma a vegetal	Aroma a aceite de oliva	Me recuerda al atún
2'30" 121°C	4,18 ± 1,85 ^a	4,29 ± 1,86 ^a	3,88 ± 1,45 ^a	3,94 ± 1,52 ^a
Sin tratamiento	3,41 ± 1,50 ^a	4,18 ± 1,07 ^a	4,88 ± 1,69 ^a	4,06 ± 1,34 ^a
Atún comercial	6,75 ± 0,45 ^b	2,31 ± 1,30 ^b	4,88 ± 1,15 ^a	6,81 ± 0,40 ^b

*Las letras diferentes en la misma columna indican que hay diferencia estadística significativa entre las muestras ($p \leq 0,05$).

Como demuestra la tabla con los datos sobre el aroma, siempre evaluaron de forma distinta el atún real del ‘atún vegano’ excepto en el aroma a aceite de oliva. Sin embargo, lo que es más interesante, en ningún caso los jueces fueron capaces de encontrar diferencias olfativas a nivel estadístico, entre el producto sometido al tratamiento y el producto que no se había tratado. Es decir, el tratamiento de 2'30" a 121°C no afecta a los valores evaluados en cuanto al aroma.

Tabla 17. Promedios de la evaluación de cada característica del sabor del producto enlatado en aceite con y sin tratamiento y de atún real comercial, con su desviación estándar.

Producto	Sabor			
	Sabor a pescado	Sabor a vegetal	Sabor a aceite de oliva	Me recuerda al atún
2'30" 121°C	3,24 ± 1,48 ^a	4,41 ± 1,77 ^a	5,06 ± 1,20 ^a	3,18 ± 1,42 ^a
Sin tratamiento	3,29 ± 1,26 ^a	4,24 ± 1,52 ^a	5,29 ± 1,31 ^a	3,94 ± 1,52 ^a
Atún comercial	6,50 ± 0,63 ^b	1,94 ± 1,00 ^b	5,19 ± 1,47 ^a	7,00 ± 0,00 ^b

*Las letras diferentes en la misma columna indican que hay diferencia estadística significativa entre las muestras ($p \leq 0,05$).

De la tabla de sabor, podemos deducir, al igual que con los datos de aroma, siempre se evalúa de forma distinta el atún real del vegano excepto en el sabor a aceite de oliva. No obstante, los jueces en ningún caso fueron capaces de diferenciar a nivel significativo estadísticamente, entre las características de sabor del producto sometido al tratamiento con el que no está tratado. Lo que implica que el tratamiento tampoco afecta a los valores evaluados de sabor.

Tabla 18. Promedios de la evaluación de cada característica del aspecto exterior del producto enlatado en aceite con y sin tratamiento y de atún real comercial, con su desviación estándar.

Producto	Textura en boca				
	Tiene buena dureza	Se deshace en la boca	Se me pega a los dientes	Aceitoso, resbaladizo	Me recuerda al atún
2'30" 121°C	5,12 ± 1,27 ^a	4,00 ± 1,84 ^a	2,29 ± 1,31 ^a	3,94 ± 1,52 ^a	3,82 ± 1,51 ^a
Sin tratamiento	5,53 ± 1,12 ^a	3,76 ± 1,75 ^a	2,76 ± 1,56 ^{a,b}	4,41 ± 1,62 ^a	4,94 ± 1,14 ^b
Atún comercial	5,88 ± 1,09 ^a	3,06 ± 1,34 ^a	3,50 ± 1,90 ^b	4,81 ± 1,28 ^a	6,88 ± 0,34 ^c

*Las letras diferentes en la misma columna indican que hay diferencia estadística significativa entre las muestras ($p \leq 0,05$).

En cuanto al análisis de la textura en boca, encontramos que para los jueces fue igual de agradable la dureza encontrada del producto vegano, tanto con tratamiento como sin él, que la derivada del atún real comercial. Por lo que a pesar de que el texturómetro sí encontró diferencias significativas estadísticamente, no son perceptibles sensorialmente. Lo mismo ocurre al preguntarles sobre la sensación de que se deshace en la boca o sensación de resbaladizo, aceitoso. Sin embargo, al preguntarles sobre la adhesividad (la cual el texturómetro sí diferenciaba entre la muestra con tratamiento y sin él), vemos que los jueces no encuentran esta diferencia sensorialmente entre el producto tratado y sin tratar, aunque sí lo encuentran entre el primero y el atún real comercial. Por lo general encuentran más adhesivo el atún animal que el producto vegano.

Vemos que la mayoría de los jueces reconocieron el atún real en cuanto a textura en boca, confirmando que les recordaba a atún, aunque estadísticamente se separan estos resultados del producto con tratamiento de 2'30" a 121°C, y sin él, acercándose éste segundo sin tratamiento más a la evaluación que dictamina que les recuerda al atún real.

Exponemos estos resultados gráficamente en la Figura 21.

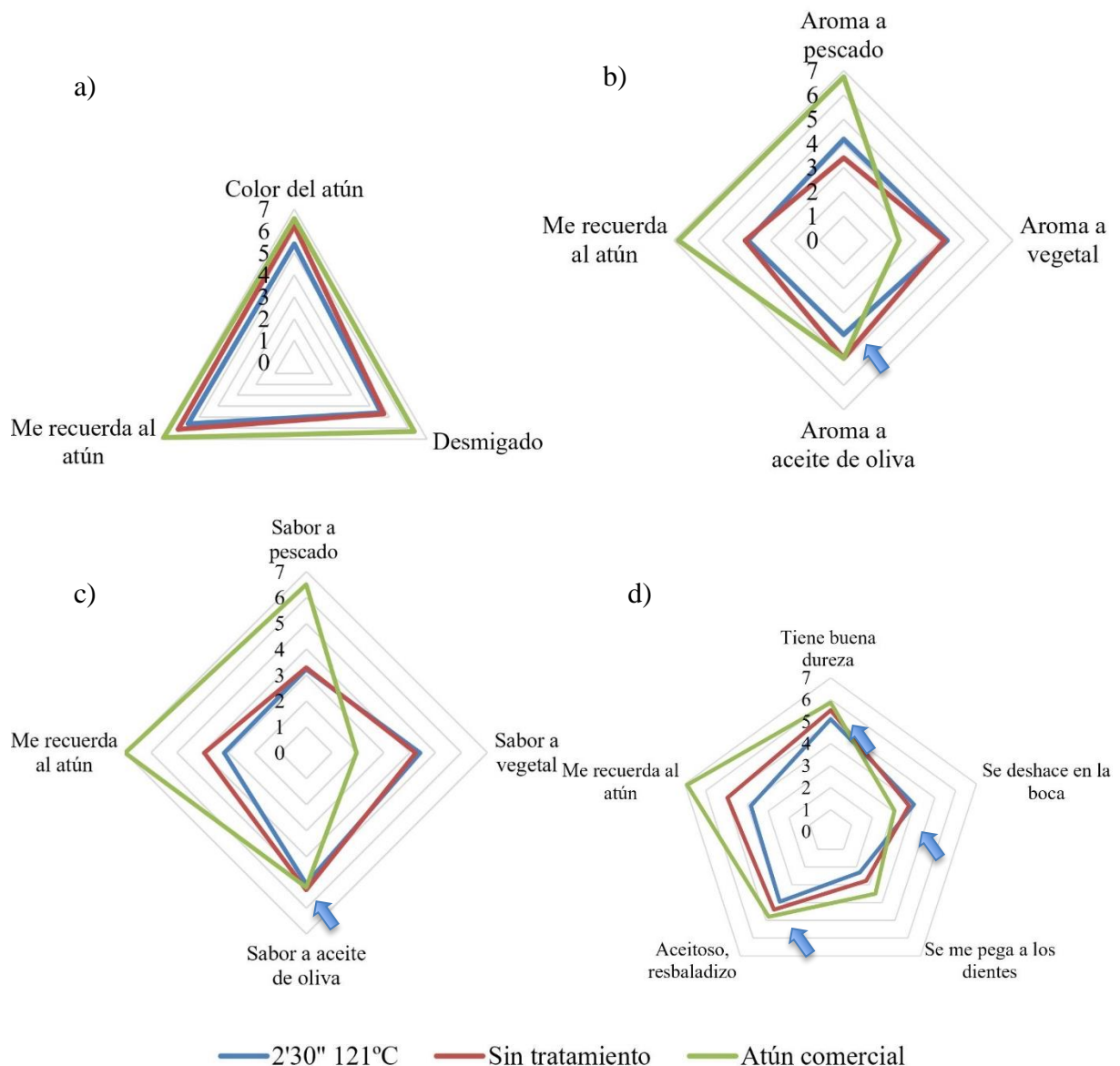



Figura 21. Gráficos de dispersión radial de las medias obtenidas por el análisis sensorial del a) aspecto exterior; b) aroma; c) sabor; d) textura en boca.  = No hay diferencias estadísticas significativas en el aspecto señalado.

Vemos gracias a estos resultados que en cuanto a textura en boca el producto de 'atún vegano' tiene muchas similitudes con el atún real comercial. En cuanto a color, aroma y sabor, a pesar de diferenciarse estadísticamente del atún real, fue muy bien evaluado agradando a los jueces. Lo que es más interesante de todos estos resultados es que, para la mayoría de los aspectos analizados, los jueces no fueron capaces de encontrar diferencias significativas entre el producto de 'atún vegano' sometido al tratamiento de 2'30" a 121°C con el que no se ha sometido al tratamiento. Por ello se pudo afirmar que este tratamiento es el que mantiene de mejor forma las propiedades organolépticas del producto de 'atún vegano' consiguiendo también convertirlo en una conserva a largo plazo por eliminar toda su posible vida microbiana.

7. PERSPECTIVAS DE FUTURO

En caso de tener que seguir adelante con este proyecto, se pueden realizar estudios para mejorar la textura y aspecto del producto envasado con líquido de gobierno de escabeche y al natural, consiguiendo así dos variantes más en el mercado para el ‘atún vegano’. También se podría ampliar la prueba piloto y realizar una cata a gran escala, aumentando el número de jueces (en caso de ser posible que estén entrenados) y aumentando para ello la cantidad de muestra disponible a evaluar. La fecha de consumo preferente dependerá de estudios posteriores a este trabajo en los que se observe el deterioro del producto con el paso del tiempo, por lo que posteriormente se puede delimitar como cambia este producto tras tiempos de conservación más largos a nivel fisicoquímico.

8. CONCLUSIONES

Gracias a los resultados obtenidos en este trabajo se puede llegar a una serie de conclusiones que justifican el éxito obtenido en cuanto a los objetivos esperados:

- Se ha conseguido obtener un método de conservación basado en tratamiento térmico a largo plazo para un producto marino en base de proteína vegetal extrusionado y enlatado (‘atún vegano’).
- Una proporción de 87 gramos de producto sólido con 28 gramos de líquido de gobierno optimiza la apariencia y textura final del producto, ya que aporta mayor dureza y adhesividad al producto haciéndolo más parecido al atún animal enlatado tras el tratamiento.
- Distintos líquidos de gobierno aportan diferentes características de color, pH y textura a los productos enlatados mientras que distintos tratamientos térmicos afectan al color y textura pero no al pH.
- Utilizar como líquido de gobierno aceite de oliva, favorece el mantenimiento de las propiedades organolépticas del producto al utilizarse como conserva por mantener mejor las características de pH, color y textura que con escabeche y ‘al natural’.
- Un tratamiento de 2 minutos y 30 segundos a 121°C en autoclave en un bote de cristal de 5 cm de altura, 6 cm de diámetro de zona de llenado y 5,5 cm de diámetro de boca con el producto enlatado al vacío, es suficiente para eliminar la vida microbiológica presente en el producto de ‘atún vegano’.

9. BIBLIOGRAFÍA

Allred, C. D., Allred, K. F., Ju, Y. H., Goepfinger, T. S., Doerge, D. R., & W. G. Helferich. (2004). *Soy processing influences growth of estrogen-dependent breast cancer tumors*. *Carcinogenesis* 25 (9): 1649–57.

Álvarez, Z (2012). *Determinación de la calidad microbiológica de escabeche comercializado en los supermercados del distrito dos de la zona metropolitana de San Salvador*. Tesis. Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador.

Argel, N. S. (2022). *Diseño y desarrollo de productos cárnicos magros adicionados con fuentes vegetales de elevado valor nutricional*. Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata.

Arrunátegui, H. F. (2020). *Estudio de las características físicas de líquido de gobierno (aceite de oliva refinado y agua), para una mejor conserva exclusiva en presentación: filete de atún (Thunnus albacares) en aceite de oliva refinado con pimienta piquillo en frasco de vidrio*. Universidad Nacional De Piura, Escuela Profesional De Ingeniería Pesquera. 212/7

Bautista, A. G., Garnica, A. R., & Vela, J. D. (2011). *Estudio comparativo sobre los microorganismos presentes en la carne molida proveniente de una cadena de supermercados y mercados en el Municipio de Ecatepec*. *Nacameh*, 5(1), 1-9.

Berlau, J., Auckland, H., Malnick, H. & Pitt, T. (1999). *Distribution of Acinetobacter Species on Skin of Health Humans*. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*. 18:179-183.

Bonino, J., Cagnassi, L., Giudicci, A., Ibarra, J., Oriolani March, P., Vidal, A. & Boeris, V. (2016). *Caracterización fisicoquímica de aislados de proteínas vegetales*. Universidad Católica Argentina. Facultad de Química e Ingeniería del Rosario. 1668-1622

Bouvet, P.J.M., Jeanjean, S., Vieu, J. & Dijkshoorn, L. (1990). *Species, Biotype, and Bacteriophage Type Determinations Compared with Cell Envelope Protein Profiles for Typing Acinetobacter Strains*. *Journal of Clinical Microbiology* 28(2):170-176.

Boza López, J. (1991). *Valor nutritivo de las leguminosas grano en la alimentación humana y animal*. Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental.

Buchbinder, L., Baris, Y., & Goldstein, L. (1953). *Further studies on new milk-free media for the standard plate count of dairy products*. American Journal of Public Health and the Nations Health, 43(7), 869-872.

Cabel, M. L. (2019). *Efecto del tratamiento térmico y tipo de líquido de gobierno sobre las características fisicoquímicas y sensoriales en filetes de tilapia azul (oreochromis aureus) en conserva*. Tesis Final de Grado. Universidad Privada Antenor Orrego. Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Trujillo, Perú.

Calles, T., Xipsiti, M., & del Castillo, R. (2019). *Legacy of the international year of pulses*. Environmental earth sciences, 78(5), 1-8.

Cano, P. (2001). *Procesado y conservación de alimentos vegetales*. Revista Horticultura, 150,110-114.

Cantoral, R., Fernández Quintela, A., Martín0z, A., & Macarulla, M. T. (1995). *Estudio comparativo de la composición y el valor nutritivo de semillas y concentrados de proteína de leguminosas*. Arch. latinoam. nutr, 242-8.

Casp, A. & Abril, J. (2003). *Procesos de conservación de alimentos*. 2a. ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.

Castellano, M (1998). *Intoxicaciones por alimentos*. Gisbert Calabuig J A. Medicina legal y Toxicología. Ed. Masson, Barcelona. 871-882.

Castells, M. L. (2019). *Caracterización reológica, viscoelástica y mecánica de crema de guisante con textura modificada*. Tesis de máster. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Tecnología de Alimentos.

CIE (1986). *Colorimetry*. Publication CIE no 15.2, Vienna.

Codex Alimentarius (2007) – Norma del Codex para determinadas legumbres. (Rev. 1-1995)
En: Cereales, Legumbres, Leguminosas y Productos Proteínicos Vegetales. CODEX STAN 171-1989

Daza, T. E. L., & Atahualpa, L. E. T. (2017). *Evaluación de la influencia por variación del líquido de gobierno en el tiempo de esterilizado de conservas de anchoveta (Engraulis ringens)*

en envase ¼ club. En Anales científicos. Universidad Nacional Agraria La Molina. Vol. 78, No. 1, pp. 43-49

Lab converter (s. f.). *Convert L*ab values to BS, RAL, NCS, Pantone, AS2700, AMS 595A, Farrow and Ball, Little Greene, Dulux colours and to RGB*. Lab converter. Disponible en: <https://www.e-paint.co.uk/convert-lab.asp>

Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Referencia: BOE-A-1967-16485

Dey, R. (2018). *Consumo de alimentos con el colorante alimenticio rojo 40 y su remoción por enterobacterias de la microbiota intestinal*. Master's thesis. Instituto de ciencias. Universidad autónoma de Puebla.

Eyraud, V., Karaki, L., Rahioui, I., Sivignon, C., Da Silva, P., Rahbe, Y., Royer, C. & Gressent, F. (2013). *Expression and biological activity of the cystine knot bioinsecticide PA1b (pea albumin 1 subunit b)*. PLoS One 8 (12):e81619.

F'SH PEAS. (2023). *Home - F'SH PEAS*. Disponible en: <https://fishpeas.com/>

FAO. (2016)b. *El Año Internacional de las Legumbres: semillas nutritivas para un futuro sostenible*. COAG/2016/3

Fauci, A., Braunwald, E., Isselbacher, K., Wilson, J.D., Martin, J. & Kasper, D. (1998). *Botulismo. Principios de Medicina Interna. Harrison*. 14ª Ed., McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid. 1032-1034.

FDA (1995) *Bacteriological Analytical Manual*, 8th edition. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD

Fehir, Aaron. (2016). *Taphonomy's Rainbow: The Introduction and Application of Chromophoric Variance Analysis*. University of Sheffield's Msc Osteoarchaeology.17-19

Felix, M., Romero, A., Rustad, T., & Guerrero, A. (2017). *Physicochemical, microstructure and bioactive characterization of gels made from crayfish protein*. Food Hydrocolloids, 63, 429-436.

Future Farm. (s. f.). *Future tvna*. Disponible en: <https://www.futurefarm.io/>

Garden Gourmet Spain. (s. f.). *Vuna*. Disponible en: <https://www.gardengourmet.es/>

Gobierno de España (2013) *Orden de 21 de noviembre de 1984 por la que se aprueban las normas de calidad para las conservas vegetales*. BOE-A-1984-26465

González, J. D. T., Morelos, K. J. G., & Correa, D. A. (2015). *Análisis del perfil de textura en frutas, productos cárnicos y quesos*. Revista ReCiTeIA.

González, Y., Casas, Y. & Vidal, G. (2020). *Huella del agua*. Centro de Recursos Hídricos para la Agricultura y la Minería Universidad de Concepción.

Gram HC. (1884). *Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten*. Fortschritte der Medizin, 2(31), 185-189.

Gressent, F., P. D. Silva, V. Eyraud, L. Karaki, & C. Royer (2011). *Pea albumin 1 subunit b (PA1b), a promising bioinsecticide of plant origin*. Toxins 3 (12):1502–17.

Gutiérrez de la Fuente, Á. L. (2015). *Caracterización de distintas proteínas de uso alimentario*. Trabajo Fin de Máster. E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera. Universidad de Valladolid.

Guzmán, G., & Pérez, M. C. (1964). *Posibilidades del Ácido Benzoico y Benzoatos en la Industria de Conservas Vegetales*. Anales de la Universidad de Murcia. Ciencias.

Happy Vegetal. (s. f.). *Atún en aceite 200g. Avus*. Disponible en: <https://happyvegetal.es/>

Hirsch, A. & Grinsted, E. (1954). *Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore-formers from cheese with observations on the effect of nisin*. Journal of Dairy Research 21, 101-110.

Jiménez, A., Puerta, J. F., Gómez, J. R., & Jiménez, Y. (2019). *Influencia de las propiedades de la materia prima en el desempeño del proceso de extrusión*. Ingeniería Energética, 40(1), 73-80.

Jiménez, E., Delgado, S., Maldonado, A., Arroyo, R., Albújar, M., García, N. & Rodríguez, J. M. (2008). *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC microbiology*, 8(1), 1-11.

Kazir, M., & Livney, Y. D. (2021). *Plant-Based Seafood Analogs*. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(6), 1559.

Kudre, T.; Benjakul, S. & Kishimura, H. (2013). *Effects of protein isolates from black bean and mungbean on proteolysis and gel properties of surimi from sardine (Sardinella albella)*. *LWT—Food Sci. Technol.* 50, 511–518.

Kumar, P.; Chatli, M.K.; Mehta, N.; Singh, P.; Malav, O.P. & Verma, A.K. (2017) *Meat analogues: Health promising sustainable meat substitutes*. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 923–932.

Kyriakopoulou, K., Dekkers, B., & van der Goot, A. J. (2019). *Chapter 6 - Plant-Based Meat Analogues*. C. M. Galanakis (Ed.), *Sustainable Meat Production and Processing* (pp. 103-126): Academic Press.

Laboratorios Conda (2011) *Microbiology Manual*. 5th Edition. Pronadisa. Spain

Lam, A., Can Karaca, A., Tyler, R., & Nickerson, M. (2018). *Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality*. *Food Reviews International*, 34(2), 126-147.

Lantern (2021) *Estudios: The Green Revolution*. Disponible en: <https://www.lantern.es/>

Lazzari, V., Boebel, A., Guidi, C., Lazzati, S., Ricci, M., & Cantoni, A. (2018). *Bacillus pumilus QST2808 SC, new bio fungicide to control powdery mildew on grape and vegetables*. *Atti, Giornate Fitopatologiche, Chianciano Terme (SI), Italia, 6-9 marzo 2018, Volume secondo*, 59-66.

Levenson, C.W. & Axelrad, D.M. (2006) Too much of a good thing? Update on fish consumption and mercury exposure. *NutrRev.* 64:139–145.

Liang, H. N., & Tang, C. H. (2013). *pH-dependent emulsifying properties of pea (*Pisum sativum* (L.)) proteins*. Food Hydrocolloids, 33(2), 309-319.

Lima, M., Costa, R., Rodrigues, I., Lameiras, J., & Botelho, G. (2022). A narrative review of alternative protein sources: highlights on meat, fish, egg and dairy analogues. Foods, 11(14), 2053.

Lu, Z., He, J., Zhang, C. & Bing, D. (2019): *Composition, physicochemical properties of pea protein and its application in functional foods*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition,

MAGRAMA (2014). *Balance del nitrógeno en la agricultura española*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Secretaría General de Agricultura y Alimentación. Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios.

Maphosa, Y., & Jideani, V.A. (2017). *The role of legumes in human nutrition*. Functional food-improve health through adequate food, 1, 13.

Marshall R. (1992) *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 16th ed., APHA, Washington, D.C.

Morales, L.E. & Higuchi, A. (2018). *Is fish worth more than meat?—How consumers' beliefs about health and nutrition affect their willingness to pay more for fish than meat*. Food Qual. Prefer. 65, 101–109.

Moritz, M. S., Tepp, W. H., Bradshaw, M., Johnson, E. A., & Pellett, S. (2018). *Isolation and Characterization of the Novel Botulinum Neurotoxin A Subtype 6*. mSphere, 3(5), e00466-18.

OECD. (2020). *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2020-2029*. OECD Publishing.

Oken, E., Wright, R. O., Kleinman, K. P., Bellinger, D., Amarasiriwardena, C. J., Hu, H., Rich-Edwards, J.W. & Gillman, M. W. (2005). Maternal fish consumption, hair mercury, and infant cognition in a US cohort. *Environmental health perspectives*, 113(10), 1376-1380.

Organización Internacional de Normalización. (1991). *Microbiología de la cadena alimentaria* (ISO 4833)

Organización Internacional de Normalización. (1991). *Normas y reglamento de alimentario y de bebidas* (ISO 17410)

Organización Internacional de Normalización. (2004). *Milk* (ISO 8552)

Parrilli, C. C. (2008). *Clostridium botulinum em alimentos*. Monografía (Graduação em Medicina Veterinária)-Faculdade Metropolitana Unidas, São Paulo.

Pascual, M. R., & Calderón, V. (2000). *Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas*. 2ª Edición. Ediciones Diaz de Santos.

Pérez, H. P., Rubio, C., Pozuelo, M. R., Revert, C., & Hardisson, A. (2003). *Botulismo y toxina botulínica*. Revista de toxicología, 20(1), 8-12.

Pérez-Aparicio, J., Rodríguez Partida, V., & Toledano-Medina, M. (s.f.) *Evaluación de tratamientos térmicos en la fabricación de conservas vegetales*. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Córdoba.

Pino, E. J. G., Serrada, A., & Farías, C. (2017). *Efecto del proceso de esterilización en conservas de atún al natural*. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. Vol. 29:374-384.

Poore, J., & Nemecek, T. (2018). *Reducing food's environmental impacts through producers and consumers*. Science, 360(6392), 987–992.

Quinga, M. A. (2017). *Caracterización de proteínas obtenidas a partir de harina de Firiguero (Vigna unguiculata L.) y de sus hidrolizados mediante electroforesis SDS-PAGE y RP-UHPLC*. Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Reglamento (UE) No 1129/2011 de la Comisión de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión.

Rodríguez, P. A., & Arenas, R. (2018). *Hans Christian Gram y su tinción*. Dermatología cosmética, médica y quirúrgica, 16(2), 166-167.

Sajib, M., Forghani, B., Vate, N. K., & Abdollahi, M. (2023). *Combined effects of isolation temperature and pH on functionality and beany flavor of pea protein isolates for meat analogue applications*. *Food Chemistry*, 412, 135585.

Silva, P. P. M., Spoto, M. H. F., da SILVA, E. G., & Cardoso, T. L. (2011). *Parâmetros sensoriais de conserva de palmitos basal e foliar de pupunha acidificada com ácido acético*. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 5(2).

Sluka, E. F., de Rank, E. F., del Valle Monserrat, S., Condorí, M. S., & Arce, O. (2009). *Tecnologías emergentes aplicadas a la conservación de porotos (Phaseolus vulgaris L.)*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 41(2), 13-21.

Smith, A. E., Zhang, Z., Thomas, C. R., Moxham, K. E., & Middelberg, A. P. (2000). *The mechanical properties of Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(18), 9871-9874.

Sol Natural. (s. f.). *Productos bio para cuidar lo que más te importa | Sol Natural*. Disponible en: <https://solnatural.bio/>

Stone, A. K., Karalash, R. T., Tyler, T. D., Warkentin, & Nickerson, M. T. (2015). *Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars*. *Food Research International* 76:31–8.

Tankeshwar, A., & Tankeshwar, A. (2022). *GasPak Anaerobic System: Principle, Application*. *Microbe Online*.

Tharanathan, R. N., & Mahadevamma, S. (2003). *Grain legumes - A boon to human nutrition*. *Trends in Food Science & Technology* 14 (12):507–18.

Torres Intriago, C. A., & Vera Sánchez, G. A. (2019). *Efecto del porcentaje de ácido acético en la vida útil de una conserva de pollo desmenuzado en escabeche* (Bachelor's thesis, Calceta: ESPAM MFL).

Vargas, M. E. (2016). *Evaluación de la calidad funcional y sensorial en cultivares de Triticum aestivum ssp. vulgare y ssp. spelta en cultivo ecológico*. (Doctoral dissertation, Universidad Politécnica de Madrid).

Wilches, R. S. (2015). *Tecnologías no térmicas en el procesado y conservación de alimentos vegetales*. *Revista colombiana de investigaciones agroindustriales*, 2(1), 73-82.

World Health Organization (1990). *Methylmercury. Environmental Health Criteria*. 101, Geneva, Switzerland: World Health Organization.

World Health Organization (2003). *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: Report of a joint WHO/FAO expert consultation*. Geneva: World Health Organization/Food and Agricultural Organization.

Woudstra, C. (2016). *Clostridium botulinum, from toxin and flagellin genotyping to Whole Genome Sequencing: an insight into genetic diversity of human and animal botulism associated clostridia's* (Doctoral dissertation, Université Paris-Est).

Yang, J., Mocking-Bode, H. C., van den Hoek, I. A., Theunissen, M., Voudouris, P., Meinders, M. B., & Sagis, L. M. (2022). *The impact of heating and freeze or spray drying on the interface and foam stabilising properties of pea protein extracts: Explained by aggregation and protein composition*. *Food Hydrocolloids*, 133, 107913.

Yang, J., Zamani, S., Liang, L., & Chen, L. (2021). *Extraction methods significantly impact pea protein composition, structure and gelling properties*. *Food Hydrocolloids*, 117, 106678.

Yantén Vegan Food (2022). *Yantuna 320 gramos* | Yantén Vegan Food. Disponible en: <https://yantenvegan.com/yantuna-320-gramos/>

Zhang, F., Liu, Q., Liao, L., Li, X., & Zhang, X. (2022). *Chinese botulinum toxin A for the treatment of lower urinary tract dysfunction: It works just as well*. *Bladder* (San Francisco, Calif.), 9(1), e47.