

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos**



**RESTRUCTURACIÓN EN FRÍO DE MÚSCULO DE
PESCADO MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE
ALGINATO SÓDICO Y TRANSGLUTAMINASA
MICROBIANA.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Helena María Moreno Conde

Bajo la dirección de los doctores

Antonio Javier Borderías Juárez
José Carballo Santaolalla

Madrid, 2010

- ISBN: 978-84-693-2393-9

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA**



**REESTRUCTURACIÓN EN FRÍO DE MÚSCULO DE
PESCADO MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE
ALGINATO SÓDICO Y TRANSGLUTAMINASA
MICROBIANA**

TESIS DOCTORAL

**Helena María Moreno Conde
Madrid, Marzo, 2009**



Universidad Complutense de Madrid
Departamento de Nutrición, Bromatología y
Tecnología de los Alimentos.



Instituto del Frío
Departamento de Tecnología de la Carne y Productos
Cárnicos y del Pescado y Productos de la Pesca.

REESTRUCTURACIÓN EN FRÍO DE MÚSCULO DE PESCADO MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE ALGINATO SÓDICO Y TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA

Memoria que presenta Helena María Moreno Conde para optar al grado de
Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Bajo la dirección del Dr. Antonio Javier Borderías Juárez y de Dr. José Carballo
Santaolalla, actuando como tutor el Dr. Lorenzo de la Hoz Perales.

INSTITUTO DEL FRÍO (C.S.I.C.)
Madrid, Marzo 2009

Antonio Javier Borderías Juárez, Dr. En Veterinaria y Profesor de Investigación y **José Carballo Santaolalla**, Dr. En Veterinaria y Investigador Científico del Instituto del Frío de Madrid (C.S.I.C),

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “Reestructuración en frío de músculo de pescado mediante la incorporación de alginato sódico y transglutaminasa microbiana”, presentada por Helena María Moreno Conde para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Instituto del Frío (C.S.I.C) bajo su dirección, y que, hallándose concluida, autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente Certificado en Madrid, a 30 Marzo de 2009.

Dr. Antonio Javier Borderías Juárez

Dr. José Carballo Santaolalla

El trabajo que ha dado origen a la presente Memoria, ha sido realizado en el “Departamento de de Ciencia y Tecnología de la carne y de los Productos Cárnicos y del Pescado y Productos de la Pesca” del Instituto del Frío de Madrid (C.S.I.C), y durante periodos de estancias, en el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias y de la Pesca de Lisboa (INRB, I.P./IPIMAR) así como en el Instituto Nacional de Recursos Acuáticos de la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU-AQUA) en Copenhague.

Agradezco al C.S.I.C la concesión de la beca predoctoral I3P en “Líneas de investigación con interés para el sector industrial” durante los años 2005-2008, así como al Ministerio de Ciencia y Tecnología la cofinanciación de la misma con el proyecto AGL-2005-04347 que lleva por título “Relación entre proteínas químicas, reológicas y estructurales de surimis elaborados de distinta forma”.

AGRADECIMIENTOS

Aún recuerdo el día en que asistí a la primera defensa de una Tesis Doctoral... Hoy soy yo la que lo hace, y he de reconocer que esta etapa de mi vida, no ha pasado desapercibida. En la memoria quedan tantas experiencias, vivencias, ilusiones...

Casi sin darme cuenta me sorprende a mi misma intentando encontrar el punto de partida desde el que empezar a agradecer el haber podido llegar a presentar esta Memoria. No me resulta fácil. Todos aquellos con quienes he compartido momentos de mi vida, han ido forjándome en la persona que soy hoy. Por eso, si llegué hasta aquí es gracias a todos los que me habéis acompañado y enseñado con vuestra experiencia, paciencia y cariño a lo largo de los años.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de tesis, los Doctores D. A. Javier Borderías Juárez y D. José Carballo Santaolalla la oportunidad que me han brindado para llevar a cabo este trabajo bajo su dirección, así como su apoyo y ayuda.

También quisiera agradecer al D. Irineu Batista, su dedicación durante mi estancia IPIMAR (Lisboa, Portugal). Muy especialmente agradezco la Doctora Dña. Carolina P. Baron, su apoyo, el optimismo y la ilusión con que enfocó el trabajo durante mi estancia en la DTU (Copenhague, Dinamarca) así como a su equipo de técnicos que tanto me enseñaron y me ayudaron. Gracias a la Doctora Dña. Maite Solas por sus fotos de microscopía.

Con mis compañeros del Instituto del Frío he compartido momentos únicos, Inés, Chus, Tati, Ailén, Raquel, Tomás, Luz, Marta, Gonzalo, Pilar, Miguel-Ángel, Esther y Oscar... Sois estupendos. Especialmente quiero agradecer a Isabel Sánchez, su ayuda, apoyo y su amistad.

Con todo mi cariño agradezco a Carmen de la Mata el haberme enseñado a desenvolverme en el laboratorio, así como a Kike y Eva su ayuda.

A Ramón y Felipe les agradezco de todo corazón el afecto, cariño y simpatía que siempre me han mostrado.

Gracias también Roland Chiverton por su empeño en mejorar mi inglés.

No quisiera dejar pasar la oportunidad de recordar a mis amigos, esos con los que tantos momentos he compartido. Rocío y Yolanda, mis amigas de la infancia, del colegio, del instituto...Tere, Jose, Dani, Eva mis eternos amigos de la carrera de Veterinaria en Córdoba, qué años aquellos!. Elia, a la que me une una relación muy especial por haber compartido con ella los duros años del inicio de mi vida en Madrid y los estudios de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Y finalmente Sanja quien me ha descubierto nuevos horizontes y con quien comparto pese a la distancia, complicidad, confidencias y momentos inolvidables...

A estas alturas de mi vida, si de algo soy totalmente consciente es de que si hoy por hoy estoy escribiendo estos agradecimientos es sin lugar a dudas gracias a mis padres, María Escolástica y Cristóbal y a su esfuerzo por enseñarme a luchar por aquello en lo que creo. De una manera muy especial, quiero agradecer a mi madre su apoyo, su ayuda, el esfuerzo que ha hecho sobre todo los últimos años para que yo pudiera seguir formándome, sus constantes palabras de ánimo y aliento. Gracias por creer en mí mamá.

A mis hermanas, María Azahara y Mirian les debo tanto...soy consciente de que no es fácil luchar porque los inconvenientes de la vida no nos separen. Os quiero.

Lola y Gabriel, constituyen el centro de mi otra parte de la familia, la que tengo en Madrid. A ellos les agradezco infinitamente y de todo corazón lo mucho que me han ayudado, sus constantes muestras de cariño, apoyo y confianza. A Nando le doy mil gracias por el montón de veces que me ha echado una mano y por estar ahí siempre que se le necesita.

Mis últimas líneas van para mi propia familia, por cuyo sueño me vine a Madrid. A Santiago, mi marido y a nuestra hija, Elia, les agradezco de corazón el hacerme sentir orgullosa de tenerlos. Santi, nunca sabré agradecerte el apoyo incondicional, las palabras de ánimo cuando tanto me falló, tu comprensión, amor y cariño. A mi peque, Elia, manojillo de nervios, alegría y simpatía, a la que quiero con locura, simplemente le digo que algún día descubrirá que luchar por lo que uno cree, pese a ser duro en ocasiones, produce una profunda satisfacción que sólo uno mismo es capaz de comprender.

A Santi y a Chipi

A mi madre

**Vivir no es sólo existir,
sino existir y crear,
saber gozar y sufrir
y no dormir sin soñar.
Descansar, es empezar a morir.**

Gregorio Marañón

ÍNDICE

<u>RESUMEN/SUMMARY</u>	1
<u>I.- INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	7
I.2. PRODUCTOS REESTRUCTURADOS DERIVADOS DE LA PESCA	10
I.2.1. Reestructuración basada en recortes procedentes del fileteado	11
I.2.2. Reestructuración basada en pescado picado sin formación de gel inducido térmicamente	13
I.2.3. Reestructuración basada en la gelificación de la proteína miofibrilar inducida térmicamente	15
I.2.4. Reestructuración basada en el empleo de alta presión isostática	19
I.2.5. Textura de los productos pesqueros reestructurados	20
1. Características mecánicas	21
2. Características estructurales	22
I.3. ADITIVOS EMPLEADOS EN LA ELABORACIÓN DE REESTRUCTURADOS EN FRÍO	23
I.3.1. Alginatos: Alginato sódico	24
1. Tecnología de producción.....	25
2. Estructura química	25
3. Propiedades físico-químicas.....	28
4. Aplicaciones	32
I.3.2. Transglutaminasas: Transglutaminasa microbiana (MTGasa)	36
1. Transglutaminasa endógena del músculo.....	37
2. Transglutaminasa microbiana.....	39
2.1. Propiedades físico-químicas.....	40
2.2. Aplicaciones.....	41
2.2.1. Carne y productos cárnicos	42
2.2.2. Pescados y productos de la pesca	43
2.2.3. Otras aplicaciones.....	44
<u>II. JUSTIFICACIÓN</u>	47
<u>III. OBJETIVOS</u>	51
BLOQUE I: Empleo de Alginato sódico en la elaboración de reestructurados de músculo de merluza (<i>Merluccius capensis</i>)	53
1. Procedimientos para la incorporación de fuentes de calcio a sistemas de músculo alginato sódico.....	53
2. Aptitud tecnológica de las diferentes fuentes de calcio: Cloruro cálcico, Lactato cálcico y Caseinato cálcico.....	53
3. Propiedades físico-químicas de un sistema alginato-músculo picado al adicionar cloruro cálcico con el propósito de elaborar un reestructurado.....	53
4. Cambios durante la conservación en estado congelado y refrigerado de los reestructurados elaborados con alginato sódico y cloruro cálcico.....	54

BLOQUE II: Empleo de Transglutaminasa microbiana en la elaboración de reestructurados de merluza (<i>Merluccius capensis</i>) y calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	54
2.1. Reestructurados de músculo de merluza picado.....	54
2.1.1. Procedimientos de incorporación de MTGasa a un producto tipo reestructurado aplicando distintas temperaturas.....	54
2.1.2. Efecto de la incorporación de MTGasa y/o caseinato sódico sobre las propiedades físico-químicas del reestructurado de músculo.....	54
2.1.3. Importancia de la calidad del músculo de merluza y grado de picado en la elaboración de un sistema músculo-MTGasa.....	54
2.1.4. Influencia del pH, concentración de NaCl y grado de picado de un músculo de merluza.....	54
2.1.5. Estudio de la oxidación protéica y lipídica en reestructurados elaborados a partir de músculo picado de merluza y trucha.....	54
2.1.6. Modificaciones físico-químicas durante la conservación en estado congelado y refrigerado de reestructurados elaborados con MTGasa y caseinato sódico.....	54
2.2. Reestructurados elaborados a partir de surimi de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	55
2.2.1.- Efecto de la adición de MTGasa y el empleo de altas sobre las propiedades físico-químicas de un reestructurado elaborado a partir de surimi de calamar gigante.....	55
<u>IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....</u>	57
IV.1. MATERIA PRIMA.....	59
IV.2. PROCEDIMIENTOS DE REESTRUCTURACIÓN.....	60
2.1. Reestructurados elaborados empleando alginato sódico.....	60
2.1.1. Reestructurados elaborados mediante procesado por homogeneizadora en “cutter”.....	60
2.1.2. Reestructurados elaborados a partir de trozos pequeños de músculo.....	60
2.2. Reestructurados elaborados empleando MTGasa.....	61
2.3. Tratamiento de Alta presión isostática.....	62
IV.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	63
3.1. Constituyentes mayoritarios y pH.....	63
3.2. Análisis físicos.....	63
3.2.1. Viscosidad aparente.....	63
3.2.2. Propiedades ligantes de agua.....	63
A. Capacidad de retención de agua.....	63
B. Pérdidas por cocción.....	64
3.2.3. Pruebas mecánicas.....	64
A. Análisis de Penetración.....	65
B. Análisis de Perfil de Textura (TPA).....	65
C. Determinación de la Fuerza de Ligazón.....	65
3.2.4. Medida instrumental de color.....	66
3.3. Análisis Químicos.....	66
3.3.1. Determinación del estado de la proteína.....	66
A. Solubilidad de proteínas en diferentes soluciones.....	66
B. Relación proteína soluble e insoluble.....	67

3.3.2. Actividad residual de la MTGasa.....	67
3.3.3. SDS-PAGE Electroforesis.....	67
3.3.4. Análisis Microbiológicos.....	68
A. Recuento Aerobios viables a 30°C.....	68
B. Recuento enterobacterias.....	68
3.3.5. Análisis sensorial.....	68
3.3.6. Microscopía electrónica de barrido (S.E.M).....	68
3.3.7. Determinación Índice de TBA.....	69
3.3.8. Determinación Índice de peróxidos.....	69
3.3.9. Determinación antioxidantes: Astaxantina y Tocoferoles.....	69
3.3.10. Western Blot.....	69
3.3.11. Determinación Grupos Carbonilos.....	69
3.3.12. Determinación Perfil Lipídico.....	70
3.3.13. Metodología de Superficie de Respuesta.....	70

V.-TRABAJO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS.....72

BLOQUE I: Empleo de Alginato sódico en la elaboración de reestructurados de músculo de merluza (*Merluccius capensis*).....75

V.1.1.- Estudio de los diferentes procedimientos de incorporación de fuentes de calcio a un sistema músculo-alginato sódico.....	77
V.1.2.- Application of Response Surface Methodology to study the effect of different calcium sources in restructured fish muscle/alginate system	83
V.1.3.- Influence of alginate and microbial transglutaminase as binding ingredients on restructured fish muscle processed at low temperature.	111

BLOQUE II: Empleo de Transglutaminasa microbiana en la elaboración de reestructurados de merluza (*Merluccius capensis*) y calamar gigante (*Dosidicus gigas*).....121

V.2.1. Reestructurados de músculo de merluza picado (<i>Merluccius capensis</i>).....123	
V.2.1.1. Procedimientos de incorporación de MTGasa e función del tamaño de partícula y de la temperatura.....	125
V.2.1.2. Cold gelation of two different quality minced (<i>Merluccius capensis</i>) muscles at different setting time by adding Microbial Transglutaminase.....	137
V.2.1.3. Gelation of fish muscle using Microbial Transglutaminase and the effect of sodium chloride and pH levels.....	159

V.2.2. Reestructurados elaborados a partir se surimi de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).....183

V.2.2.1. Improvement of cold and thermically induced gelation of giant squid (<i>Dosidicus gigas</i>) surimi.....	185
---	-----

BLOQUE III: Efecto de la conservación de reestructurados elaborados a partir de músculo de merluza (*Merluccius capensis*; *Merluccius merluccius*) y de trucha (*Oncorhynchus mykiss*).....215

V.3.1. Physicochemical changes during chilled storage of restructured fish models made with sodium alginate and microbial transglutaminase.....	217
V.3.2. Oxidation of restructured rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) and restructured hake products (<i>Merluccius merluccius</i>) enriched with fish oil during chilled storage.....	247

V.3.1. Physicochemical changes during frozen storage of restructured fish models made with sodium alginate and microbial transglutaminase.....291

BLOQUE IV: Aplicaciones.....317

V.4.1. Patente Transferida.....319

VI. DISCUSIÓN INTEGRADORA323

VII. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....351

VII. REFERENCIAS359

Restructuration technology for elaborating fishery products, contributes towards increasing the employment of species of low commercial value (due to small size, large amounts of bones, soft muscle, etc.) and minced or chopped fish muscles. One of the most interesting advantages that this technology can offer, is the possibility of modifying the final composition and texture of a product. This process makes it possible to remove undesirable ingredients and to add others, in order to lengthen the storage period, to obtain a functional product or to modify any of its properties to make it more acceptable to the consumers. Nowadays, and as consequence of increasing demand for minimally processed products, cold gelation technology seems to be an interesting option for elaborating restructured fish products with a raw aspect, ready to be commercialized as fresh, marinated or smoked products. There are many different ways of elaborating restructured fish muscle products and different binding agents are also available for the manufacture of added-valued fish products from minced or bigger pieces of fish muscle.

In the present Memory two different binding agents, a hydrocolloid, sodium alginate, and an enzyme, microbial transglutaminase (MTGase) have been employed with the goal of elaborating fish restructured models. Each of these binding agents works in a different way and the way each acts will depend on interactions with other ingredients which have been added and the type of fish muscle involved in the process at temperatures below 30°C. Based on this technology many different kinds of products from hamburgers to seafood analogues could be elaborated.

Alginates are extracted from brown seaweeds growing in cold water. They have been widely used in food systems as stabilizers but one of their more special properties is gelation. Thermo-stable gels can be formed in the presence of calcium ions and without thermal treatment. Alginates are linear polysaccharides composed of two monomeric units, β -D-manuronic acid (**M**) and α -L-Guluronic acid (**G**). Both of them form blocks of β -D-manuronic acid (**MM**) and β -D-manuronic acid / α -L-Guluronic acid (**MG**) join by $\beta(1-4)$ links; and blocks of α -L-Guluronic acid (**GG**) and α -L-Guluronic acid / β -D-manuronic acid (**GM**) joined by $\alpha(1-4)$ links. When G blocks line up, they leave a space where polyvalent cations can remain (calcium principally), as result of the dimeric structure. Consequently, alginate gels are formed by intermolecular association of calcium ions dimerically associated with guluronic acid block regions of the polysaccharide molecule. It is believed that these gels interact with myofibrillar

proteins of the restructured fish product. These interactions are mainly electrostatic, between the anionic groups on the alginate and the positively charged groups on the protein. The proportion of sodium alginate, the calcium ion source and setting period conditions are the main variables used to achieve different kinds of texture.

The other ingredient used as a cold binder is Microbial Transglutaminase (MTGase). It is an extracellular monomeric enzyme (protein-glutamine γ -glutamyltransferase) with 37,863 kDa, produced by several microorganisms of the *Streptoverticillium* genus, and it differs from endogenous transglutaminase in that it is calcium independent. Its mechanism is based on the formation of covalent bonds between the ϵ -amino group of lysyl residues and the γ -carboxamide group of glutaminy residues of adjacent proteins, due to its being able to catalyze acyl-transfer reactions by cross-linking introducing proteins such as myosin, peptides and primary amine, as well as by forming hydrophobic interactions. MTGase is active over a fairly wide range of pH (4-9) and temperature (0-70°C) values, but its activity peaks at 50°C, although at 30-35°C the activity is also high. It has been used mainly to improve gel properties in surimi and for restructuring seafood muscle in conjunction with sodium caseinate that facilitates cross-linking in a cold state.

The aim of the present Memory is to deal with different partial studies, namely the development of cold restructured processes working with different seafood species, such as hake (*Merluccius capensis*; *Merluccius merluccius*), rainbow trout (*Oncorhynchis mykiss*) and giant squid surimi (*Dosidicus gigas*) and also the addition of sodium alginate and MTGase. To achieve our aim,, different processing techniques have been employed.

With the addition of the mentioned additives, thermo-stable gels at temperatures lower than 30°C, during a setting period of 12-24 hours, were obtained.

The combination of different sodium alginate concentrations (0.1-0.5%) plus different calcium sources (0.1-1.0%) which were calcium chloride, calcium caseinate and calcium lactate, revealed that all of them act as effective calcium ion donors resulting in an effective gelation with sodium alginate. These studies indicated that the election of one of the calcium sources would depend on the desirable properties expected, mainly mechanical properties, and for this reason calcium chloride was the source chosen. Moreover, it was observed that the proportion of calcium chloride added should be around 0.1% in order to improve the mechanical properties without increasing cooking loss.

The addition of MTGase as a binding agent, resulted in a restructured model with adequate mechanical properties when it was added in a range of up to 1.0% in combination with sodium caseinate at concentrations of up to 1.5%. However, it is important to stress that MTGase activity is higher during the first hours (up to 6-12 hours) after being added to hake muscle, although it continues at a much lower rate up to around 24 hours.

Protein functional quality is an important factor to be considered when restructured models are based on kneading of small muscle pieces instead of “cutter” processing, probably as a consequence of less interaction between MTGase and muscle. The reduction of the pH to a value of pH 6, presented a technological challenge. It that sense, it was able to extend shelf life by one week relative to elaborations carried out with a physiological muscle pH (6.8). The technological problem arises because pH 6 is quite close to the isoelectric point of miofibrillar proteins, so proteins are aggregated and their cross-linking ability to form a good protein-net is limited and consequently a more exudative product is obtained. Mechanical properties could be improved at pH 6, by increasing the NaCl concentration (4%) but this would limit the use of this product to specific types of products.

The improvement of low quality Giant squid (*Dosidicus gigas*) *surimi* gelation was possible by adding MTGase. The combination of MTGase (0.5%-1.0%) processing and high pressure treatment (300MPa) increased covalent bonds, and as a result, there were noticeable improvements in both, mechanical properties and water retention, due to a well-structured protein-net.

Different storage studies were also carried out with restructured products elaborated with sodium alginate or MTGase. Restructured models made using either the “cutter” process or by kneading, and with the addition of sodium alginate or MTGase can be chill-stored for 14 days at 5°C (when the initial bacterial count is lower than 10^3). The addition of sodium alginate in the restructuring process, produced a less dense structure compared with models elaborated with MTGase. Samples elaborated with sodium alginate facilitated better cooking regardless of the type of processing. The firmness of samples made employing the “cutter” process rises to higher values when alginate is added than when MTGase is added. Firmness of samples made by joining small pieces of muscle is higher with the addition of MTGase than with alginate though both increased firmness for 3-7 days of chilled storage. Breaking deformation does not

change throughout chilled storage in any samples. In all models firmness is higher in samples after the cooking process.

On the other hand, after restructured models elaborated with fresh hake (*Merluccius merluccius*) and trout (*Oncorhynchis mykiss*) with the addition of MTGase, had been chill-stored at 4°C for 6 days it could be stated that restructured products with good physicochemical properties can be prepared with fatty fish, such as trout, using cold gelation and MGTase. Also, the addition of up to 5% cod liver oil to hake muscle in the presence of MTGase also generated restructured models with good physicochemical properties and good oxidative stability. This might be a good alternative for generating new types of omega-3 enriched fish products, which are stable during cold storage.

After a frozen storage period at -15°C for 150 days physicochemical properties were affected mainly by protein aggregation but also by lipids oxidation. Firmness of models processed by “cutter” and adding alginates is similar to the model with MTGase, although after the first 60 days of storage, firmness rose sharper than in models elaborated with MTGase. The loss in water binding capacity is similar in models with different ingredients but it is much more evident in restructured samples processed by kneading than by the “cutter” method. No clear evolution in lipids oxidation was observed during the frozen storage.

In conclusion it could be stated that both additives studied, sodium alginate and MTGase, are quite suitable for elaborating different restructured fish models at low temperatures whilst maintaining the raw fish muscle appearance. The proportions of these ingredients, their interaction with other ingredients and other variables need to be considered depending on the type of final product and the properties desired.

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- INTRODUCCIÓN GENERAL

España, como país mediterráneo, se caracteriza por basar en gran medida su cultura gastronómica en el consumo de pescado. Su importancia no sólo radica en la existencia de altas ingestas, sino en el hecho de que es uno de los mayores mercados mundiales de pescado, con todas las implicaciones sociales, económicas e incluso políticas que de este hecho se derivan tanto a nivel nacional como internacional. Por todo ello, en la actualidad, puede considerarse a España un elemento activo y plenamente integrado en la economía pesquera internacional.

En nuestro país se consumen al año unas dos millones de toneladas de pescado aproximadamente, que son obtenidas de manera tradicional de muy diversas especies sin que éstas sean sometidas a ningún tipo de manipulación tecnológica. España presenta un índice anual de consumo de 39 kilos de pescado por habitante y año (Mapa, 2007), situándose en el tercer puesto del ranking mundial de importaciones, por detrás de Japón y USA, y en el décimo de exportaciones. A nivel Europeo, España también goza de una situación considerablemente privilegiada en cuanto a captura y producción, estando por delante de países como Francia, Italia, Portugal y Reino Unido (FAOSTAT, 2004).

En la actualidad la situación pesquera en España es consecuencia de diversos factores. En primer lugar, la limitación en la cantidad de capturas, hace que el límite impuesto por los gobiernos no cubra las necesidades del mercado interno, aunque paradójicamente cientos de toneladas de pescado sin valor comercial son destruidas o enviadas a empresas harineras, lo que indica que existen unos excedentes que por sus características (especies que poseen muchas espinas, de músculo muy blando, de pequeño tamaño que dificultan sobremanera su procesado, de muy alto contenido en grasa, etc.) no son consideradas comercialmente aptas para el consumo directo. En segundo lugar, la industria de elaboración de productos pesqueros que empezó a desarrollarse ampliamente en España en los años 70, ve como día a día la dependencia de la importación de materia prima para elaborar y transformar estos productos es mayor, habiendo pasado en los últimos años de un 20% a más de un 50%. Este hecho entraña graves riesgos de dependencia para dichas empresas, por lo que se hace necesario buscar alternativas a la situación actual en la que se encuentran (Documento Cotec, 1995).

Por todo ello, la incorporación de nuevas tecnologías con el objetivo de ofrecer al mercado nuevos productos obtenidos a partir de restos de especies e incluso de especies de bajo valor comercial parece ser una opción muy interesante. En algunas especies el rendimiento de músculo puede ser del 50%, aunque en otras no supera el 30-40%, por lo que con estos restos se podrían elaborar productos de mayor valor añadido y de características sensoriales bien definidas en función de los gustos del consumidor al que se dirigen. Para aprovechar los restos mencionados procedentes bien de especies nobles o del músculo extraído de especies no comerciales, se suele picar el músculo. En la mayoría de los casos este músculo es lavado y se le añaden una serie de ingredientes con los que se puede modificar su estabilidad, la textura, el color y/o el sabor (Raharjo y col, 1994; Raharjo y col., 1995). A estos nuevos productos se les agrupa bajo la denominación de “*productos reestructurados*” y su elaboración está basada en la estructuración del músculo picado en mayor o menor grado. Parte de estos productos reestructurados constituyen los llamados análogos o sucedáneos, de tal forma que el producto a obtener posea la apariencia, gusto y textura del producto al que se quiere imitar o incluso puede crearse un nuevo producto con características propias (Angulas Aguinaga, S.A, 1989). En relación con los análogos, debe considerarse, que el concepto de “imitar un producto” no se refiere únicamente a obtener una réplica exacta del producto original, sino que también puede obtenerse un producto similar con imagen de “sano” y “nutritivo” con un precio más económico (Borderías y Pérez Mateos, 1996).

En la actualidad los productos reestructurados se dividen en dos grandes grupos, de productos. El primero, de origen japonés, lo constituyen los derivados del “*surimi*” y la segunda, es la derivada de los “*Fish-Blocks*”, que son bloques de trozos de filetes de pescado, de filetes pequeños y/o de pescado picado. En España éste último grupo lo constituyen principalmente el músculo de especies de pescado de las familias de los *merlúcidos* u otros *gádidos*. De la familia del *surimi*” se consumen en España más de 37.000 TM., mientras que de la segunda se ponen en el mercado cantidades algo inferiores.

I.2.- PRODUCTOS REESTRUCTURADOS DERIVADOS DE LA PESCA.

En la actualidad, los productos pesqueros procedentes de especies nobles, suelen gozar de un precio elevado, y son un recurso cada vez más limitado como consecuencia de

la fuerte sobreexplotación a la que son sometidos y la creciente demanda, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (James, 1990). Es por ello, que el empleo de los recortes de fileteado así como de músculo de especies tradicionalmente poco comercializadas, haría posible, que tras una manipulación tecnológica previa adecuada, puedan obtenerse productos pesqueros con determinadas características según los diferentes mercados a los que se enfocan.

Una de las mayores ventajas de los productos reestructurados es la posibilidad de modificación de la composición del músculo troceado o picado mediante tratamientos, como el lavado, y la reformulación del producto original a fin de incorporar los ingredientes deseados (Sánchez-Alonso y col, 2007a; Sánchez-Alonso y col, 2007b; Sánchez-Alonso y Borderías, 2008). En este sentido se podría hablar de la eliminación de unos constituyentes y de la incorporación de otros nuevos. Dentro de estos últimos se pueden diferenciar dos funciones importantes de la incorporación: desde un punto de vista tecnológico se pueden modificar las propiedades fisicoquímicas de los productos elaborados (Ahmed y col., 1983; Rocker y col., 1983; Sakamoto y col., 1995; Pérez-Mateos y col., 2001; Pérez-Mateos y Montero, 2002; Suklim y col., 2004; Gómez-Guillén y col., 2005) y desde un punto de vista funcional, la posibilidad de incorporación de ingredientes nutracéuticos que permite que el producto final obtenido pueda enriquecerse en compuestos beneficiosos para la salud, lo que además puede tener su importancia a nivel de marketing (Borderías y col., 2005; Sánchez-Alonso y col, 2007a).

I.2.1.- REESTRUCTURACIÓN BASADA EN RECORTES PROCEDENTES DEL FILETEADO.

Los productos reestructurados a partir de restos de fileteado u otros trozos sobrantes del procesado del músculo de pescado, son productos constituidos por porciones que no han llegado a perder su estructura en miotomos y mioseptos y que por tanto tienen considerablemente intactas sus características de textura. A partir de estos restos se forman bloques normalmente a bordo o en plantas de procesado en tierra, que se congelan en porciones con forma de paralelepípedo, de unos 10 Kg aproximadamente. Su almacenamiento posterior es normalmente en estado congelado. Para su fabricación, se emplean filetes a los que se les ha eliminado la espina, denominada “pin” y por este

motivo a estos bloques se les conoce como “pin-out”. En algunas ocasiones, los trozos de pescado empleados para la elaboración de los bloques son tratados con fosfatos, en unos tambores giratorios a fin de favorecer la extracción de la proteína solubilizada y aumentar la cohesividad entre los diferentes trozos de músculo de pescado.

Este tipo de productos empezaron a desarrollarse en España a partir de los años 70 del siglo XX y unas décadas antes en los países europeos más desarrollados. Esta tecnología se ha empleado para la elaboración de distintos productos reestructurados, como es el caso de las porciones de músculo de pescado empanadas o rebozadas que son prefritas para fijar el rebozado, y se venden listas para freír (Borderías y Pérez-Mateos, 1996). También existe información sobre productos más sofisticados, como es una imitación a filete de bacalao fresco elaborado con varios filetes de bacaladilla unidos empleando proteína solubilizada extraída del propio músculo de pescado con sal y tripolifosfatos (Johnston y Roger, 1982). En nuestro país, se encuentra patentada la fabricación de lomos grandes de bacalao a partir de pequeños trozos de bacalao seco salado rehidratado, por medio de la adición de sustancias ligantes (*surimi*, alginato, etc.) y la posterior formación en moldes (CSIC, 1991). En la actualidad existen equipos desarrollados especialmente para reconstituir trozos y elaborar filetes o rodajas por moldeo a baja presión a partir de bloques constituidos por filetes pequeños o trozos. Los trozos son obtenidos a partir de dicho bloque, y atemperados alrededor a -5°C , se sitúan en un molde cuyas paredes son presionadas lentamente tanto longitudinal como transversalmente. Este molde después se abre y el producto, ya formado, es sometido a recongelación.

El empleo de alta presión también ha sido combinado con este tipo de reestructuración empleando porciones de bloques todavía congelados. Según este procedimiento, se introducen en una máquina de altas presiones porciones paralelepípedas de bloques “pin-out” a -10 ó -15°C dependiendo del equipo usado. Cada porción se somete a un tratamiento de alta presión (alrededor de 2000 bares) consiguiéndose de esta forma modificar el punto de fusión lo que hace que el producto se descongele, aún estando a esta temperatura. Al mismo tiempo un molde le dará la forma deseada. Finalmente, al eliminar la presión el producto se vuelve a endurecer, por recongelación instantánea al volver a presión atmosférica (Cheftel, 1992). Otro método en el que también se utiliza la alta presión es el de “cook and shape” (C & S Process), que se utiliza para reestructurar trozos de gambas y que consiste en introducir en moldes los trozos, presionar y calentar a la vez (Anon, 1983).

I.2.2.- REESTRUCTURACIÓN BASADA EN PESCADO PICADO SIN FORMACIÓN DE GEL INDUCIDO TÉRMICAMENTE.

El empleo de pescado picado para elaborar productos reestructurados conlleva una serie de ventajas, como son el aprovechamiento de especies pequeñas y con muchas espinas o el empleo de restos de fileteado que quedan entre las raspas, aletas y otros trozos que sobran tras la obtención de los filetes, etc.

La elaboración del músculo picado se lleva a cabo mediante una serie de etapas que dependerán del producto final que se desee elaborar. Por lo general, los principales procesos implicados en la elaboración del pescado picado pueden resumirse en: descabezado, eviscerado y lavado del pescado, separación mecánica del músculo, lavado del músculo picado (en caso de ser necesario), incorporación de los aditivos e ingredientes y conservación, normalmente en estado congelado (Documento COTEC, 1995; Borderías y Pérez-Mateos, 1996). A continuación se van a desarrollar los procesos más relevantes:

1.- Separación mecánica: La mayoría de las técnicas de separación mecánica se basan en la extracción del músculo de pescado previamente descabezado y eviscerado, sin piel ni espinas a través de placas perforadas. El tamaño del orificio por el que va a salir el músculo depende por lo general de la especie con la que se trabaje. Cuando se trata de pequeñas especies pelágicas, el tamaño de orificio aconsejado suele ser de 2 ó 3 mm ya que si fuese más pequeño se originarían alteraciones irreversibles en la capacidad de retención de agua y se aumentaría el riesgo de degradación proteica durante la conservación en congelación. Cuando se trata de especies de mayor tamaño, el orificio más recomendado es de unos 4 mm.

2.- Lavado: Esta fase no se lleva a cabo en todas las ocasiones, aunque es un proceso de suma importancia en el caso de músculos ricos en grasa o músculo rojo que posee abundante hemoglobina. La hemoglobina es responsable de generar propiedades sensoriales no adecuadas (color, sabor u olor) como consecuencia de su actividad pro-oxidante de lípidos y/o proteínas que alteran en última instancia la textura del músculo (Richards y col., 2002; Underland y col, 2002). Con el lavado con agua fría se puede llegar a eliminar hasta el 80% de la grasa del músculo. A esta agua de lavado se le pueden incorporar diferentes ingredientes como puede ser el bicarbonato sódico, con lo que se consigue que la eliminación de la grasa sea aún mayor. En algunos casos se

recomienda lavar dos veces, la primera con bicarbonato sódico al 3% y cloruro sódico al 0,1%, y la segunda solamente con agua para obtener unos resultados óptimos.

3.- Estabilización del pescado picado: El pescado picado como tal es un sustrato enormemente sensible a sufrir diversas alteraciones tales como la oxidación de los lípidos, la degradación proteica e incluso el desarrollo de microorganismos. Por ello, si el músculo una vez picado no se utiliza de inmediato para elaborar un producto reestructurado, éste debe ser conservado en congelación. En este sentido, la temperatura de conservación en congelación dependerá de la especie, de los tratamientos coadyuvantes a los que se halla sometido y del tiempo que vaya a durar el almacenamiento. Dada la baja estabilidad del músculo de pescado, la mayoría de los tecnólogos recomiendan temperaturas inferiores a los -18°C . Baron y col. (2007), comprobaron que en pescado graso, como la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), existían mayores alteraciones sobre lípidos y proteínas en el pescado congelado durante un periodo de conservación de 13 meses a -20°C que a -80°C .

Los problemas que pueden derivarse de la conservación del músculo picado son generalmente, consecuencia de la oxidación de los lípidos y su efecto sobre el sabor y textura, y de la desnaturalización y agregación de las proteínas miofibrilares que originan cambios en la textura y su funcionalidad (Tejada, 2001; Herrero y col., 2005; Geirsdottir y col., 2007). En cualquier caso, la adición de aditivos antioxidantes, como butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), tocoferoles, eritorbato sódico etc. o más naturales como extracto de romero que bloquean los radicales libres (Bhale y col., 2007), y la adición de sorbitol, lactosa o sacarosa, entre otros, para controlar la agregación proteica, pueden paliar estos problemas, aunque deben estudiarse para cada tipo de producto concreto que se desea desarrollar. En los últimos años se están utilizando ampliamente antioxidantes naturales para preservar el músculo picado aunque frecuentemente comunican algo de sabor, por lo que la elección de una u otra especie debe ser concienzudamente estudiada para cada caso particular.

A partir del músculo de pescado picado se puede elaborar una amplia gama de productos reestructurados con formas, sabores y texturas diferentes a las tradicionales que pueden ser además adecuados para la incorporación de un amplio abanico de ingredientes responsables de conferir al producto importantes y nuevos beneficios ya sea a nivel tanto tecnológico (Raharjo y col., 1994; Raharjo y col., 1995) como nutricional (Sánchez-Borderías y col., 2007a; Borderías y col., 2005). En este sentido, la inclusión de productos nutraceúticos, como pueden ser fibras, ácidos grasos, etc. pueden dar lugar a los alimentos

funcionales requeridos por una sociedad actual que cada vez demanda más productos de características saludables (Jena y Bhattachara, 2003; Sánchez-Alonso y col., 2007a).

Actualmente existe en Europa un gran interés por el consumo de productos sanos y de “aspecto fresco” lo que ha estimulado en gran medida el desarrollo de nuevas técnicas que permitan obtener nuevos productos empleado un procesado mínimo (Boles y Shand, 1999; Suklim y col., 2004; CSIC, 2006; Montero y col., 2007). Para elaborar este tipo de productos a base de pescado es necesaria la incorporación de determinados ingredientes gelificantes o coadyuvantes de la gelificación que actúen a temperaturas inferiores a 35 °C, como pueden ser determinadas enzimas, como la transglutaminasa microbiana, hidrocoloides, como alginatos y/o carragenatos y proteínas como la fibrina. El conocido como método Fibrimex® (Harimex, Loenen, Holanda) es empleado principalmente en la reestructuración a bajas temperaturas en productos cárnicos. Consiste en una mezcla de fibrinógeno y trombina. Ésta última transforma el fibrinógeno en fibrina que da lugar a uniones intermoleculares estables (Boles y Shand, 1997; Manseth y col., 2003). Sin embargo, no es muy conveniente su empleo en la elaboración de productos pesqueros ya que puede producir ciertos cambios en el color (Beltrán-Lugo y col. 2005).

Los sistemas denominados “de gelificación en frío” ofrecen al mercado una serie de nuevos productos más aceptables y apetecibles para los consumidores incluso más que aquellos otros conseguidos por gelificación inducida térmicamente, al ser considerados los primeros, productos mucho más versátiles para su posterior uso culinario, puesto que pueden ser tratados como un producto fresco natural con propiedades termoestables, sin posibles problemas de decoloración y/o rancidez oxidativa, alteraciones que suelen presentarse frecuentemente durante el proceso de conservación en los productos obtenidos por gelificación térmica (Means y Schmidt , 1986; Boles y Shand ,1998; Suklim y col., 2004).

I.2.3.- REESTRUCTURACIÓN BASADA EN LA GELIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA MIOFIBRILAR INDUCIDA TÉRMICAMENTE.

Este tipo de productos se suelen elaborar a partir de *surimi* o de pescado picado. El pescado picado posee un menor poder gelificante que el *surimi*, especialmente el procedente de pescados no recién capturados, por lo que suele ser necesario el empleo de

otros ingredientes como hidrocoloides, enzimas o proteínas no musculares para incrementar su capacidad de formación del gel. En este tipo de proceso lo más habitual es recurrir a la utilización de *surimi*.

La palabra *surimi* es de origen japonés y significa pescado picado, aunque en realidad el concepto es algo más concreto. El *surimi* en sí no es un producto alimentario, sino que es una fase intermedia, una materia prima a partir de la que se fabrican diversos productos, como son el *kamaboko* (especie de gel de pescado casi insípido que se utiliza en la cocina japonesa) y sobre todo, una serie de análogos o sucedáneos de otros de elevado valor, que imitan texturas, sabores y aspectos de gambas, vieiras, langostas, angulas, patas de cangrejo, etc. También es base de otros productos, que no intentando imitar a ningún otro, constituyen productos nuevos.

Existen dos factores fundamentales a tener en cuenta en el *surimi*: por una parte su calidad, que es reflejo de su capacidad gelificante y color, y por otro su rendimiento. Sobre ellas influye de manera decisiva la calidad de la materia prima, diversos factores del procesado y el sistema de almacenamiento, principalmente en congelación (Suzuki, 1987; Borderías y Pérez-Mateos, 1996; Ordoñez y col., 1998, Sánchez-Alonso et al., 2007a)

En sus inicios, el *surimi* se obtenía principalmente de abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*) (Suzuki, 1981; Lanier, 1992). Sin embargo, los incrementos en la producción, los costes de materia prima y el empleo de nuevas tecnologías, ha inducido su obtención a partir de especies de mayor disponibilidad como son merluza (*Merluccius gay*; *Merluccius productus*), jurel (*Trachurus trachurus*), sardina (*Sardina sp.*), halibut del pacífico (*Atheresthes stomias*), bacaladilla del sur (*Micromesistius australis*), hoki (*Macuronus novaezelandiae*), boga japonesa (*Nemimpterus spp.*), etc. que son infrutilizados en numerosas partes del mundo y cuya capacidad gelificante es suficiente para la fabricación de *surimi* (Chen y col., 1997, Park, 2005, Sánchez-Alonso et al., 2007a).

El proceso de producción del *surimi* ha sido ampliamente descrito por diversos autores (Lee, 1994; Spencer y Tung, 1994). A modo de resumen se puede decir que es músculo de pescado que ha sido separado mediante desespinado mecánico y lavado, una o varias veces con agua o soluciones salinas (entre 5-10°C). Seguidamente es escurrido y en la mayoría de los casos es refinado haciéndolo pasar a través de un tamiz para eliminar posibles impurezas, sobre todo restos de tejido conectivo, proteínas sarcoplásmicas hidrosolubles (hemoproteínas, enzimas y compuestos nitrogenados no proteicos). Posteriormente es prensado obteniéndose un extracto de proteínas miofibrilares (miosina,

actina y complejos de actomiosina) de músculo de pescado que posee una elevada capacidad de gelificación y emulsionante, siendo la miosina la principal responsable de las propiedades funcionales (Hamann, 1990; Ramírez y col., 2006). Una vez obtenido el “surimi”, se añaden los agentes crioprotectores a fin de asegurar una buena conservación del mismo en congelación. Básicamente el procedimiento de fabricación es como el descrito para pescado picado, pero extremando la intensidad del lavado y pasando la muestra, después de lavarla a través de una refinadora.

Con el proceso de lavado se consigue (Sonu, 1986):

1.- La separación mecánica de impurezas al agitar convenientemente la mezcla agua-pescado picado de tal forma que se consiga desprender gran parte de la grasa, partículas del peritoneo, pequeñas partículas del aparato digestivo y músculo rojo, que se van a eliminar por un sencillo proceso de decantación.

2.- La dilución de sangre, pigmentos e impurezas que están muy relacionados con los procesos de agregación proteica y oxidación lipídica y que además pueden causar coloración indeseable en el producto final.

3.- La eliminación de proteínas sarcoplásmicas, muchas de ellas enzimas, responsables de impedir la correcta formación de gel, y de las sales inorgánicas que contribuirían a la desnaturalización de las proteínas durante el posterior período de congelación.

Una de las fuentes alternativas de obtención de productos gelificados son los cefalópodos. Dadas las características particulares de sus proteínas miofibrilares (actina, miosina y paramiosina), estas son mayoritariamente solubles en agua (Tsuchiya y col., 1978), con alta actividad proteásica que degrada la miosina (Ayensa y col., 1999; Ayensa y col., 2002), bajo nivel de transglutaminasa (le confiere baja capacidad gelificante) y altas proporciones de tejido conectivo, se ha hecho necesario modificar el proceso habitual de elaboración de *surimi* (CSIC, 2004; CSIC, 2005). Por otra parte, algunas especies de cefalópodos como calamar gigante o pota del Pacífico (*Dosidicus gigas*) poseen un intenso olor a amoníaco (consecuencia de la alta concentración de nitrógeno no proteico: bases volátiles nitrogenadas y trimetilamina) y sabor amargo (consecuencia de péptidos y aminoácidos libres) (Maza y col., 2003; Sánchez-Bambila y col., 2004). Para solucionar estos problemas, se ha desarrollado recientemente un nuevo proceso que permite obtener un concentrado proteico de músculo de cefalópodos empleando la precipitación isoelectrica para precipitar las proteínas miofibrilares mayoritarias. El procedimiento consiste en la separación de las proteínas miofibrilares de proteasas y otros constituyentes

(Sánchez-Alonso y col., 2007c). Este procedimiento presenta dos variantes, la primera da lugar a un concentrado proteico funcional purificado tras la precipitación isoeléctrica de las proteínas miofibrilares después de su solubilización en soluciones salinas débiles. La segunda, un concentrado purificado funcional, a partir del lavado del músculo en una solución acuosa a pH ácido (4-5), sin que medie la solubilización previa, aunque es de inferior pureza que en el caso anterior. El grado de pureza no condiciona la funcionalidad sino las posibles aplicaciones posteriores.

Opcionalmente, con posterioridad, al producto aislado se le adicionan inhibidores de proteasas, crioprotectores y/o otros componentes y se conserva en estado congelado (CSIC, 2004; CSIC, 2005). Con este procedimiento el *surimi* resultante es más blanco y más puro que el *surimi* convencional y a su vez posee buenas propiedades de gelificación independientemente del material de partida (Sánchez-Alonso y col., 2007c).

Para formar los geles inducidos térmicamente a partir de *surimi* o pescado picado, en primer lugar la proteína debe solubilizarse por homogenización en sal (2.0-3.0% NaCl), lo que permite que las miofibrillas del músculo se separen, se solubilizan los miofilamentos y la actomiosina pierda su estructura original pasando al medio y quedando en condiciones de interaccionar entre sí formando la matriz de un gel, entre cuya red se alojaran el agua y otros ingredientes, determinando así la textura del producto. Cuando se aplican temperaturas mayores a los 75°C, el gel que se forma es termo-irreversible. La textura que finalmente se consiga va a depender de las propiedades de la red proteica, de los ingredientes y de las interacciones ingredientes-red (Lee y Chung, 1990). En la mayoría de las especies, si la pasta que resulta después de la mezcla del músculo con los ingredientes se deja reposar a 40°C, se produce el fenómeno de asentamiento formándose un gel translúcido denominado *suwari*, que dará lugar a geles muy elásticos después del calentamiento a 75°C. Cuando la pasta es calentada a unos 60°C, parte de la estructura se destruye pasando a un estado no-elástico que impide la formación del gel incluso calentándolo con posterioridad. Este es el denominado proceso de *modori* (Borderías y Pérez-Mateos, 1996). Desde un punto de vista tecnológico, son muchos y muy diversos los ingredientes que pueden emplearse con vistas a modificar las propiedades funcionales del producto. Éstos van a quedar atrapados en la matriz del gel, ejerciendo su acción coadyuvante, física o químicamente, modificando la viscosidad, pH, fuerza iónica, disponibilidad de agua, interaccionando con la proteína miofibrillar y/o influyendo en la textura, distribución, propiedades reológicas y volumen relativo de la fracción del gel (Mills, 1990; Ziegler y Foegeding, 1991; Lanier, 1992). La evolución de la tecnología del

surimi ha ido avanzado con el paso del tiempo, logrando importantes progresos en la optimización del lavado (máxima efectividad con menos agua, lo que evita la hidratación del músculo de pescado y la degradación de las proteínas miofibrilares (Shimizu y col., 1992), una mejor separación de impurezas, generalmente grasas (Chen y col., 1997) y, sobre todo, la automatización de todos los procesos.

1.2.4.- REESTRUCTURACIÓN BASADA EN EL EMPLEO DE ALTA PRESIÓN ISOSTÁTICA.

Los tratamientos de alta presión en tecnología de alimentos han estado principalmente encaminados a la destrucción de los microorganismos y a la inactivación de enzimas, modificando al mínimo las características organolépticas de la materia prima (Knorr y col., 1992) aunque en algunos casos, estas mínimas modificaciones pueden ser aprovechadas como procesados específicos, tal es caso de la gelificación en frío que podría permitir la obtención de una amplia gama de productos (Galazca y Ledward, 1995; Montero y col., 1997b; Pérez-Mateos y col., 1997; Uresti y col., 2004a; Tabilo-Munizaga y Barbosa-Canovas, 2004).

La presión aplicada a los alimentos provoca modificaciones en la mayoría de las reacciones bioquímicas, ya que en su desarrollo existe normalmente cambio de volumen. Centrándonos en el efecto sobre las proteínas, se puede afirmar, que la aplicación de tratamientos de altas presiones puede llegar a inducir cambios en su estructura secundaria, terciaria y cuaternaria (Lullien-Pellerin y Balny, 2002). Cuando se aplican presiones moderadas, inferiores 150 MPa, se afecta principalmente la estructura secundaria, mantenida principalmente por interacciones hidrofóbicas y se favorece la disociación de proteínas oligoméricas. Los cambios en la estructura terciaria se observan a presiones superiores a los 200-250 MPa. A partir de los 300 MPa, se producen modificaciones de la estructura secundaria que dan lugar a la desnaturalización no reversible de las proteínas, aunque todos estos cambios dependen de las condiciones del sistema proteico: estructura de la proteína, pH, fuerza iónica, presencia de azúcares, sales u otros aditivos así como de las condiciones de procesado: presión aplicada, tiempo de aplicación y temperatura (Balny y Masson, 1993; Messens y col., 1997; Jiménez-Colmenero, 2002). Las modificaciones que se producen en la miosina suelen ser las de mayor influencia sobre las propiedades finales del producto.

Se sabe que las moléculas de miosina sufren cambios fisicoquímicos y morfológicos asociándose para formar agregados. Cuando las proteínas miofibrilares son sometidas a tratamientos de altas presiones previos a un tratamiento térmico, se forman geles más fuertes, debido al incremento de hidrofobicidad e interacciones de los grupos sulfidrilo (Ikeuchi y col., 1992). Por otra parte, la elevación de la presión a valores entre 400-600 MPa parece mejorar las características texturales y de retención de agua de algunos geles (Massaux y col., 2000).

Existen algunos estudios que combinan eficazmente la alta presión con la incorporación de MTGasa para mejorar las propiedades mecánicas en geles de pescado de halibut del pacífico (*Atherestes stomias*), *surimi* (*Theragra chalcogramma*) y geles de pavo (Ashie y Lanier, 1999, Montero y col., 2005; Uresti y col, 2004). Otros estudios demuestran que la combinación de MTGasa y los tratamientos de altas presiones isostáticas (entre 200-600 MPa durante 30 min) aceleran la reacción de la MTGasa sobre seroalbúmina bovina, ovoalbúmina y gamma-globulina (Nonaka y col., 1997). Por otra parte, existen ciertas discrepancias entre diversos autores sobre la estabilidad de la MTGasa al ser sometida a tratamientos de altas presiones. Mientras que algunos autores constatan que la MTGasa tiene una gran estabilidad por encima de 400 MPa a 60°C en una solución tampón (Lauber y col., 2001), otros demostraron que la MTGasa mantiene hasta un 60% de su actividad inicial aún después de la presurización a 600 MPa a 60°C durante 60 min, indicando además que era más resistente a los procesos de presurización que otras enzimas (Lee y Park, 2002).

Uno de los efectos a considerar cuando se emplean altas presiones, son los cambios que éstas pueden inducir en el color, efecto que puede restringir considerablemente su aplicación en los productos pesqueros, sobre todo en aquellos en los que se quiere preservar el aspecto de crudo. Por lo general, estos cambios de color hacen que el músculo de pescado se vuelva más blanquecino y opaco, aunque estos efectos dependen de la especie en cuestión y en músculo de merluza no suelen presentarse hasta presiones superiores a los 200 MPa (Hurtado y col, 2000).

1.2.5- TEXTURA EN LOS PRODUCTOS PESQUEROS REESTRUCTURADOS.

La definición más acertada de textura según Brennan (1984), es la que en 1975 dio la British Standard Institution: “Textura es el atributo resultante de la combinación de las

propiedades físicas de una sustancia y percibido por los sentidos del tacto, de la vista y del oído. El conjunto de propiedades físicas referidas son: tamaño, forma, número y conformación de los elementos estructurales que constituyen la sustancia”. Según esta definición, la textura se define como atributo sensorial y por tanto puede ser medida sensorialmente. De forma indirecta, la textura podría ser también determinada de forma objetiva con técnicas físicas instrumentales. De esta forma podrían determinarse las características mecánicas y las estructurales.

1.- Características mecánicas

Las características mecánicas, se correlacionan con la textura determinada por medio del análisis sensorial de los productos. Resultan muy útiles para la determinación instrumental y objetiva de la textura. Dentro de este grupo se encuentran: el ensayo de perfil de textura o TPA, el análisis de penetración y la determinación de la fuerza de ligazón.

El **Análisis de perfil de textura (TPA)** es un método útil para caracterizar las propiedades mecánicas, tanto de productos reestructurados a partir de músculo picado, como de productos gelificados (Bourne, 2002; Kim y col., 2004). La idea original de este método era realizar el mejor modelo de masticación y sacar de él un cierto número de parámetros característicos de la acción de la mandíbula sobre un alimento. Consta de dos compresiones uniaxiales sucesivas separadas por un tiempo determinado de relajación (Roudot, 2004), que da lugar a una deformación pseudo-sinusoidal que simula de una manera correcta la acción de la mandíbula en un proceso de masticación. Mediante esta doble compresión se obtiene una curva, de fuerza frente a desplazamiento, a partir del cual se definen varios parámetros de textura bien por medida directa bien por cálculo de superficie (Kim y col., 2004). Dichos parámetros son:

1.- Dureza: Fuerza (N) necesaria para obtener una deformación dada. Se define como el pico de fuerza durante el primer ciclo de compresión.

2.- Cohesividad: Resistencia de los enlaces internos que constituyen el producto. Se define como el ratio del área positiva de fuerza durante la segunda compresión y el área durante la primera compresión.

3.-Elasticidad: Distancia que recupera la muestra tras la segunda compresión (mm).

4.-Masticabilidad: Energía (N x mm) requerida para desintegrar un producto sólido a un estado listo para ser tragado.

Uno de los métodos más simples y de empleo más frecuente para la determinación objetiva de la textura en los alimentos es el **Análisis de penetración a rotura**. Este método imita las grandes deformaciones que tienen lugar durante la masticación del alimento, hasta que se produce la rotura del mismo. El ensayo consiste en introducir una sonda o punzón de forma y tamaño conocidos, en el producto a analizar, hasta conseguir la ruptura del mismo. Debido a su sencillez de ejecución y a la alta correlación que presenta con las propiedades sensoriales, es el método instrumental estándar de control de calidad empleando en la industria del *surimi*. Para describir las propiedades del gel se utilizan los parámetros de fuerza hasta rotura (N) y deformación hasta rotura (mm) (Hamann y MacDonald, 1992).

La **Determinación de la fuerza de ligazón** se emplea principalmente en reestructurados de tamaño de partícula gruesa. Ésta técnica permite determinar la fuerza de ligazón (N) entre las partículas que constituyen el reestructurado, así como la elongación o deformación que sufre el reestructurado hasta su punto de ruptura (mm) (Schmidt y Trout, 1982).

La capacidad del músculo de mantener su contenido acuoso total o parcialmente, el agua propia y eventualmente el agua adicionada, tras la aplicación de fuerzas externas (*water binding capacity*), a lo largo de un proceso determinado como puede ser la descongelación (*water holding capacity*) o del cocinado (*cooking yield*) (Rey y Labuza, 1981) son características importantes incluidas en el término textura. La capacidad de retención de agua condiciona parámetros como el color, la textura, y sobre todo la jugosidad de los alimentos. Cuando su estudio se lleva a cabo a lo largo de un periodo de almacenamiento en frío, es un buen indicador del estado de la fracción proteica miofibrillar del músculo de pescado, ya que la capacidad de retención de agua disminuye con la agregación proteica.

2.- Características estructurales

Para el estudio de las características estructurales se emplea frecuentemente el análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de barrido. La ultraestructura de un alimento determina en gran medida sus características sensoriales y mecánicas. Se define como una organización compleja de componentes químicos, sometidos a la influencia de fuerzas físicas internas y externas, visible únicamente a través de instrumentos específicos (Stanley y Tung, 1976).

La estructura interna de los geles y reestructurados de pescado es una red tridimensional, que se desarrolla como consecuencia de la solubilización mediante la inclusión de una sal (NaCl principalmente) que eleve la fuerza iónica y un proceso de asentamiento a diversas temperaturas..

La observación de la microestructura y los cambios producidos en ésta, ofrece información relacionada directamente con los parámetros de textura (Stanley y Tung, 1976; Sato y Tsuchiya, 1992) y sobre la interacción entre los diferentes ingredientes (Groves, 2006). De esta forma, los geles de elevada elasticidad tienen una microestructura uniforme, con predominio de regiones densas. Por el contrario, en geles poco elásticos y de baja resistencia de gel se observan gran número de oquedades de tamaños diversos, que transmiten una imagen de conjunto poco homogénea (Sato y Tsuchiya, 1992).

I.3.- ADITIVOS EMPLEADOS EN LA ELABORACIÓN DE REESTRUCTURADOS EN FRÍO.

Entre los diversos aditivos utilizados en los procesos de reestructuración en frío destacan el Alginato sódico y la Transglutaminasa de origen microbiano (MTGasa).

El Alginato sódico se encuentra recogido en la Lista positiva de aditivos alimentarios (E-401), mientras que el empleo de Transglutaminasa en alimentos está siendo actualmente valorado y ya existen diferentes propuestas para su inclusión en dicha lista. En España no existe una legislación que marque límites máximos de transglutaminasa en alimentos, mientras que en los países europeos productos con transglutaminasa no pueden consumirse sin una previa inactivación y una vez es inactivada no es necesario citarla en el etiquetado. Sin embargo en Estados Unidos es considerada como un ingrediente seguro por el Departamento de Comercio de los Estados Unidos.

I.3.1.- ALGINATOS: ALGINATO SÓDICO

Los primeros estudios llevados a cabo sobre la extracción de alginatos de las algas datan de finales del siglo XIX. Su nombre lo deben al químico británico E.C. Stanford, cuyos estudios determinaron que los alginatos poseían varias propiedades muy interesantes para la industria en general puesto que podían emplearse como espesantes y formadores de geles y de películas. A partir de estos estudios iniciales se propusieron varias aplicaciones industriales, aunque la producción a gran escala no fue desarrollada hasta mucho después cuando Krefling en 1896, obtuvo ácido algínico puro y con posterioridad se fueron determinando muchas de las propiedades de las sales de este ácido. Sin embargo, la producción comercial de alginatos no comenzó hasta el año 1929 (Kelco, 1986) y tuvo un notable incremento después de la Segunda Guerra Mundial con la instalación de empresas extractoras de estas sustancias en todo el mundo.

Los alginatos son las sales del ácido algínico. Se extraen de una gran variedad de algas pardas de la familia de las “feofíceas”. Estas algas son de gran tamaño y son conocidas como Macroalgas o Kelp. Pueden llegar a medir entre 1 a 2,5 metros de longitud e incluso algunas pueden llegar a medir hasta 8 metros o más, como es el caso de las *Macrocystis sp.* Las algas pardas crecen en todas las regiones de aguas frías del mundo, desde el hemisferio norte hasta el hemisferio sur. Entre ellas existe una gran variedad de especies que varían en tamaño y forma, así como en el porcentaje y calidad del alginato que producen. Todas estas algas marinas conviven a temperaturas de agua de 13-20°C y viven y crecen constantemente en la zona costera ínter y submareal, es decir, entre y bajo el nivel de las mareas, llegando hasta los 20 ó 30 metros de profundidad (Mercier, 1994). Entre ellas destacan *Laminaria hyperborea*, que prolifera en zonas cercanas a las costas de Noruega, donde incluso se recoge en forma mecanizada en aguas poco profundas, donde además es posible encontrar *Laminaria digitata*, presente también en el Cantábrico. La *Laminaria japonica*, se cultiva en China y Japón y la *Macrocystis pyrifera* en aguas del Pacífico junto con algunas especies de los géneros *Lessonia*, *Ecklonia*, *Durvillaea* y *Ascophyllum*. Las algas contienen entre el 20% y el 30% de alginato sobre su peso seco.

1.-Tecnología de producción

Para la producción de los compuestos algínicos, existen distintos procedimientos que se diferencian principalmente por los intermediarios de reacción que se obtienen y que se modifican según la naturaleza de la materia prima y del uso al que se le quiera destinar. Los productos intermediarios que se pueden obtener son: alginato de calcio insoluble (proceso del alginato cálcico) o ácido algínico insoluble (proceso del ácido algínico). Ambos procesos de producción (Figura 1) son relativamente sencillos desde el punto de vista químico (Arvizo-Higuera y col., 1996; Arvizo-Higuera y col., 1997).

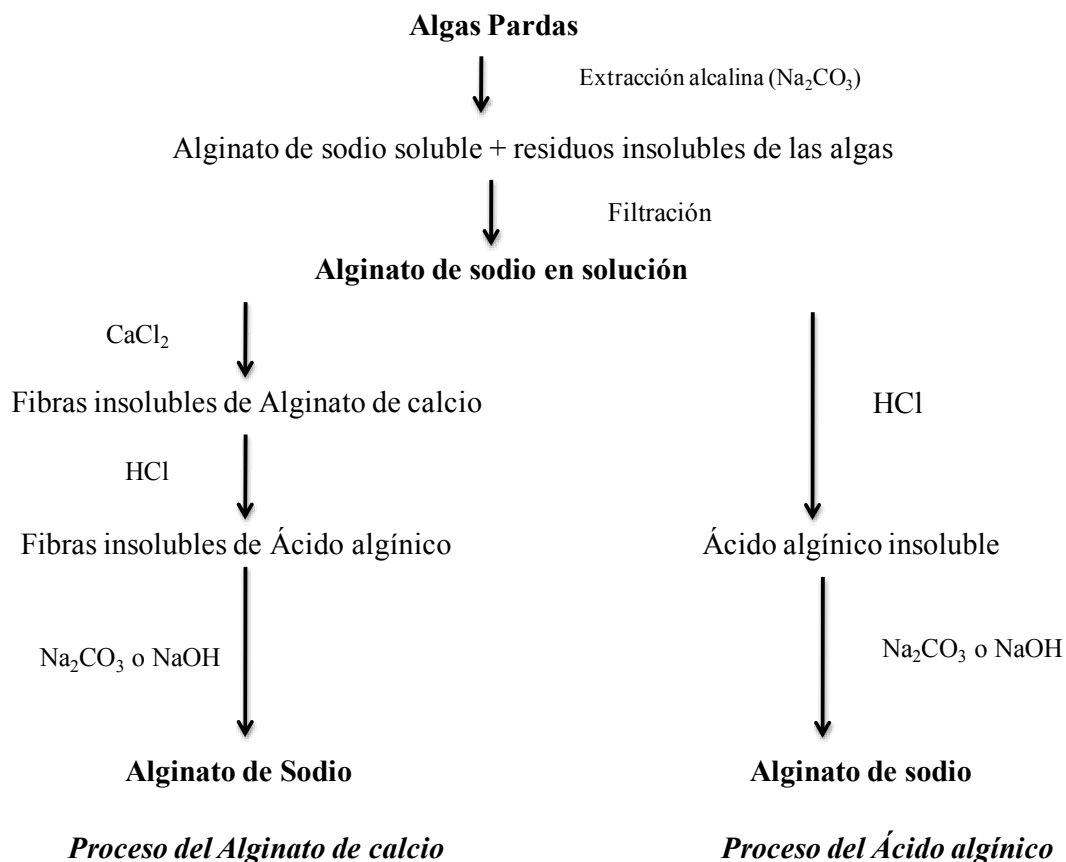


Figura 1: Obtención de Alginato sódico por el proceso del Alginato de calcio y por el proceso del ácido algínico.

2.- Estructura química

Las algas sintetizan el alginato inicialmente como un polímero de ácido manurónico, que posteriormente se modifica transformando unidades de ácido manurónico en ácido gulurónico mediante una epimerización enzimática.

Los alginatos son polisacáridos lineales constituidos por dos unidades monoméricas (monosacáridos), el ácido β -D-manurónico (**M**) y el α -L-Gulurónico (**G**). En los alginatos, estos ácidos se agrupan formando bloques: de ácido β -D-manurónico (**MM**) y de ácidos β -D-manurónico / α -L-Gulurónico (**MG**) que están unidos por enlaces glucosídicos β (1-4); y bloques de ácido α -L-Gulurónico (**GG**) y de ácidos α -L-Gulurónico / β -D-manurónico (**GM**) unidos éstos por enlaces glucosídicos α (1-4). De esta forma, la cadena polimérica que constituye el ácido algínico y sus sales se compone de tres tipos de regiones o bloques: por una parte los bloques **G** que contienen solo unidades derivadas del ácido L-gulurónico, por otra los bloques **M** que se basan enteramente en ácido D-manurónico y por último las regiones **MG/GM** que están compuestas por unidades alternas de ambos ácidos (L-gulurónico y D-manurónico).

La distribución de estos bloques es de notable importancia, ya que determina las propiedades individuales del compuesto que se obtenga. El contenido relativo de cada ácido depende del tipo de alga, su grado de desarrollo y, en menor medida, de las condiciones de su crecimiento. Las algas más jóvenes tienen menor contenido de alginato, de menor viscosidad y capacidad gelificante, que las algas más maduras.

La conformación estructural es una de las características más importantes de los alginatos y del ácido algínico ya que es lo que les permite reaccionar con cationes polivalentes. Esta interacción se produce al alinearse dos bloques **G** dejando entre ellos un hueco en el que puede alojarse un catión dando lugar a una estructura dimérica. Este hecho se debe a que la estructura tridimensional de las cadenas ricas en ácidos gulurónicos (**G**) genera distancias entre los grupos hidroxilos y carboxilos de sus cadenas lo que permite un alto grado de coordinación con iones divalentes (calcio generalmente). Esta estructura es conocida como “Modelo en caja de huevos” (Egg-box-model)” y fue propuesta por Grant en 1973 (Figura 2). Cuando el calcio queda alojado entre los ácidos gulurónicos el peso molecular y el volumen de las moléculas de alginato aumentan considerablemente, aumentando por tanto la viscosidad de los mismos. Es por ello que aquellos alginatos que poseen grandes fracciones de ácidos gulurónicos (**GG**) en su estructura, presentan una fuerte capacidad gelificante dado que son capaces de acoplar un mayor número de iones calcio. Todos estos factores condicionan en gran medida las dos principales propiedades de los alginatos como son la viscosidad y la capacidad gelificante.

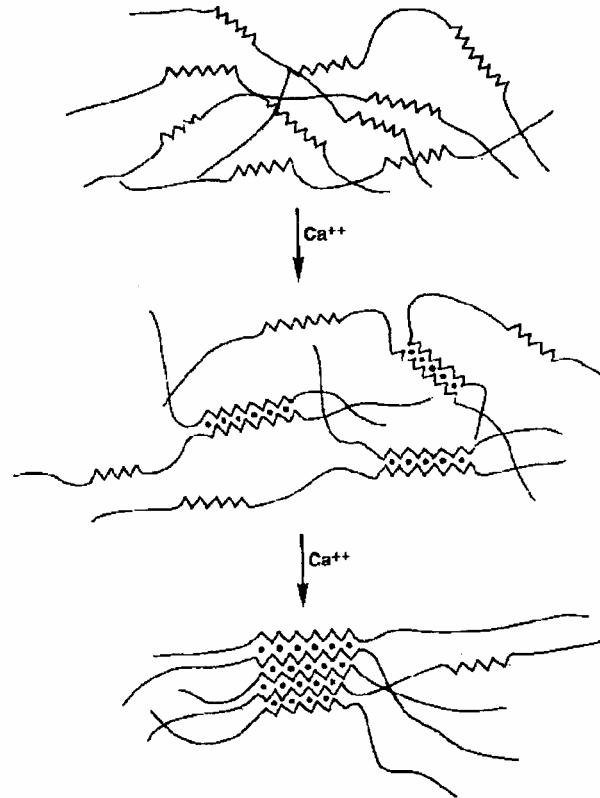


Figura 2: Modelo tridimensional de Grant (“Egg-box Model”).

Por otra parte, la viscosidad de las soluciones de alginato depende de la longitud de las moléculas, así cuanto mayor sea la longitud de las cadenas más alta será la viscosidad para una misma concentración, dado que al disolverse en agua las moléculas se hidratan y aumenta la viscosidad. Las moléculas disueltas no son completamente flexibles pues la rotación de la moléculas a lo largo de los enlaces glucosídicos en los bloques **G**, no es posible generándose puntos de endurecimiento de la cadena del alginato, dando lugar a soluciones altamente viscosas.

En función de su origen, los alginatos poseen distintas proporciones de monómeros gulurónicos (**G**) y manurónicos (**M**) distribuidos de diferentes formas. La principal propiedad que se desprende de esta distribución es la capacidad de formar geles con cationes polivalentes con los cuales reacciona en forma cruzada, como con el calcio, pero para que esto se lleve a cabo, los alginatos deben poseer una cantidad suficiente del monómero gulurónico (**G**) y una cierta proporción de los mismos deben estar en forma de bloque (**GG** o **GM**). Cuando se producen uniones intermoleculares mediante el calcio (u otros cationes polivalentes) se produce la gelificación de la solución de alginato. Después de la gelificación, las moléculas de agua que quedan

atrapadas en la matriz del alginato, tienen aún cierta posibilidad de migrar. Esto es de gran importancia en muchas aplicaciones (por ejemplo: geles de alginatos para encapsular o inmovilizar células), puesto que además la capacidad del gel para retener agua se debe a fuerzas capilares.

El calcio es el ión divalente más comúnmente empleado en la formación de geles de alginato, debido a que sus sales son económicas, de fácil disponibilidad, no tóxicas y los geles que se obtienen son de carácter termoestable. Como fuentes de calcio suelen emplearse, carbonato, caseinato, sulfato dihidratado, cloruro, lactato y citrato cálcico entre otros. Para obtener un gel de características adecuadas, los iones calcio deben ser liberados lentamente en la solución de alginato. En algunos procesos, la difusión es complicada por lo que se recurre al empleo de algunos acidulantes y secuestrantes con el fin de controlar el proceso de gelificación/hidratación y el periodo de asentamiento o *setting*, puesto que con su empleo se regula la liberación de los iones calcio durante las primeras fases del proceso (Boles y Shand, 1998).

Por lo general, los alginatos no se emplean en grandes cantidades, dado que ejercen su actividad a baja concentración. Habitualmente, el rango en el que se suelen añadir a los alimentos oscila entre 0.2- 1.0%, aunque en muchos casos se administran hasta el 2.0% y siempre acompañados de la fuente de calcio que se estime conveniente. Las fuentes de calcio suelen añadirse en concentraciones entre 0.2-0.75% pudiendo alcanzar concentraciones mucho mayores en el caso de que su adición se realice en baños (hasta 7%) ya que en estos casos el calcio de la solución debe perfundir hasta el interior de la matriz para formar el gel (Montera y col, 1997).

Durante el almacenamiento, tanto de las algas secas antes de su procesado, e incluso después de su procesado en forma de polvo, el alginato se degrada con cierta facilidad por la presencia de oxígeno, disminuyendo por ello su viscosidad.

3.- Propiedades Físico-químicas

Las propiedades de los compuestos algínicos varían en función de las sales que lo forman (sodio, potasio, amonio, etc). En las formas mencionadas, los alginatos son solubles en soluciones acuosas de $\text{pH} > 3.5$, de igual forma lo son en mezclas de agua y solventes orgánicos miscibles con ella, como el alcohol. En cambio, no lo son en leche debido a la presencia de iones calcio que les hacen gelificar y precipitar.

Una de las propiedades más importantes de las soluciones de alginato es la viscosidad, que va a depender de la concentración de alginato y de la temperatura, aunque en agua es soluble tanto en frío como en caliente y de la velocidad de agitación. De este modo, la viscosidad será mayor a partir de concentraciones mayores al 2.0% y en cambio disminuye al aumentar la temperatura o la velocidad de movimiento.

El comportamiento del alginato va a estar determinado por la presencia o no de calcio. Cuando el calcio no está presente, el alginato se pliega formando hélices en cada uno de sus bloques (**GG**, **GM**, **MM**) quedando estos unidos por puentes de hidrógeno. En presencia de calcio el alginato forma una estructura conocida como “Egg Box Model” (Figura 2), donde los iones de calcio se sitúan formando una especie de puentes entre los grupos con carga negativa del ácido gulurónico (**G**). Por este motivo, las zonas de ácido gulurónico son consideradas zonas de unión entre varias cadenas, mientras que las de ácido manurónico (**M**) son las que van a interactuar preferentemente con las moléculas de agua. Por ello, los alginatos ricos en gulurónico (**G**) forman geles mucho más resistentes que los alginatos ricos en manurónico (**M**). Los porcentajes de regiones G y M que posee cada alginato, varían en función de la especie de alga de la que proceda (Tabla 2) y por ello, los geles de alginato que de ellas se deriven tendrán diferentes características.

Tabla 2: Porcentaje de regiones de ácido gulurónico (G) y ácido manurónico (M) en distintas especies de algas.

Especie	M (%)	G (%)	M:G	Contenido de alginato de sodio (% sobre algas secas)
<i>Laminaria hyperborea</i>	30	70	0.45	25-27
<i>Laminaria digitata</i>	55	45	1.2	20-26
<i>Macrocystis pyrifera</i>	60	40	1.5	26
<i>Ascophyllum nodosum</i>	65	35	1.85	26-28
<i>Lessonia nigrescens</i>	60	40	1.5	35
<i>Ecklonia maxima</i>	55	45	1.2	40

Por otra parte, el grado de polimerización de un alginato es el promedio del peso molecular, que corresponde al número de unidades de ácidos gulurónicos y manurónicos en la cadena polimérica. La viscosidad de las soluciones de alginato se relaciona directamente con el grado de polimerización y el peso molecular; mientras que la pérdida de viscosidad de las mismas corresponde a un proceso de depolimerización del alginato.

El alginato de sodio se produce de manera comercial en distintos grados en función de su viscosidad: baja, media y alta. Entre ellos presentan pequeñas diferencias en cuanto a su estabilidad, dado que generalmente los compuestos con un elevado grado de polimerización son menos estables que aquellos con un grado de polimerización menor. El ácido algínico es el menos estable de los productos, ya que su alto grado de polimerización, provoca la degradación de sus largas cadenas en otras menores y por ello los compuestos de cadenas más cortas resultan más estables.

Las sales de los cationes monovalentes de Na^+ , K^+ , NH_4^+ , $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{NH}^+$, del ácido algínico son solubles en agua, sin embargo esto no sucede con ácido algínico y la sal cálcica que precipitan. Las soluciones neutras de alginatos de baja o media viscosidad pueden ser conservadas a 25°C durante años sin apreciar pérdida alguna de viscosidad y con un riesgo mínimo de ataque microbiano. Las soluciones de alginatos contienen un polisacárido aniónico, por ello se pueden llegar a obtener productos insolubles al mezclarse con ciertos cationes compatibles. Así mismo, estas soluciones resultan incompatibles con la mayoría de los cationes di y trivalentes, con ácidos fuertes capaces de producir la precipitación del ácido algínico y con álcalis fuertes, ya que producen una ruptura gradual de las cadenas polisacáridas que componen al alginato.

Existen diversos factores que condicionan la solubilidad de los alginatos en general:

3.1 Factores físicos:

Tanto el tamaño cómo la forma de las partículas afectan a la solubilización de los compuestos de alginato. Al incrementarse la concentración de alginato, la solución pasa de un estado de líquido viscoso a una pasta espesa. Cuando lo que se pretende es gelificar empleando alginato, y más concretamente alginato sódico, que es el proceso que nos ocupa en la presente Memoria, el empleo de iones de calcio resulta fundamental. Con ello se consigue gelificar el alginato sódico obteniendo un gel de características termoestables.

3.2 Factores químicos:

La solubilización de los compuestos de alginato en el agua depende de que éstos dispongan del agua necesaria para su hidratación. De tal forma que si hay otros compuestos que compiten con las moléculas de alginato por el agua necesaria para su hidratación su solubilización se ve muy condicionada. Por otra parte, la presencia de pequeñas cantidades de cationes polivalentes inhibe la hidratación de los alginatos y como consecuencia, si hay una elevada presencia de dichos cationes, puede dar lugar a

la precipitación del alginato. El alginato sódico resulta de difícil disolución en aguas duras y leche debido a que ambas contienen iones calcio, por ello éstos deben ser primero separados mediante un agente complejante como puede ser el hexametáfosfato de sodio o ácido etilenediamino tetra-acético (EDTA).

Por lo general, los alginatos son ligeramente solubles en solventes miscibles con el agua como alcoholes. Por ello, dada la gran afinidad del alginato de sodio por el agua, para obtener una solución suficientemente homogénea sin grumos, en algunas ocasiones, el alginato es pre-mezclado con alcohol o glicerina y posteriormente se mezcla con el agua. Las soluciones acuosas de la mayoría de los alginatos toleran la adición de entre 10-20% de tales solventes, pero proporciones mayores impiden una correcta hidratación de las moléculas.

3.3 Viscosidad:

La viscosidad es junto a su reactividad frente al calcio la propiedad fundamental de las soluciones de alginato. Las soluciones de alginato disminuyen su viscosidad si aumenta la velocidad de agitación, lo cual indica que poseen un comportamiento pseudoplástico, siendo este efecto reversible cuando los niveles de agitación no son muy elevados. Por otra parte, algunas de estas soluciones pueden llegar a presentar un comportamiento tixotrópico, es decir, la viscosidad varía a lo largo del tiempo de agitación a una velocidad de agitación constante.

La capacidad de viscosidad de las soluciones de alginatos, que los hace tan característicos, puede ser muy variable y depende de numerosos factores, algunos de los principales y que cabe nombrar son los siguientes:

- ✓ *Peso molecular:* La viscosidad de las soluciones de alginato, será mayor cuanto mayor sea el peso molecular del alginato. El peso molecular de los compuestos de alginato que se corresponde con el grado de despolimerización, puede variar en función de las condiciones de extracción y manufactura.
- ✓ *Concentración:* El grado de viscosidad de los alginatos comerciales puede ser manipulada variando la concentración de alginato sódico añadida, y así poder obtener los diferentes grados de viscosidad: alto, medio y bajo.
- ✓ *Temperatura:* La viscosidad del alginato de sodio en solución disminuye a medida que aumenta la temperatura y decrece aproximadamente un 2,5% por cada grado de incremento en la temperatura a partir de los 10°C. Este proceso es reversible, mediante enfriamiento, recuperando la solución a su

viscosidad inicial. Cuando las soluciones de alginatos se mantienen a temperaturas elevadas, esto es por encima de 50°C durante largos periodos, la viscosidad decrece irreversiblemente debido a un proceso de despolimerización de sus cadenas poliméricas. Este fenómeno habrá de ser tenido en cuenta durante el periodo de almacenamiento de los productos obtenidos industrialmente.

- ✓ *pH*: La viscosidad de las soluciones de alginato de sodio es casi independiente del pH en el rango entre 5 y 10. El descenso del pH de la solución provoca la transición del anión del alginato soluble en un ácido algínico insoluble dando lugar a una mayor viscosidad. A pH 2.0 o inferior, el ácido algínico precipita.
- ✓ *Fuerza iónica*: Cuando se adhieren a las soluciones de alginato sales de cationes monovalentes, la viscosidad de las soluciones tiende a decrecer levemente. El polímero en solución tiende a contraerse al aumentar la fuerza iónica de la misma. Por el contrario la viscosidad de las soluciones de alginato se incrementaran conforme a la concentración de iones de metales polivalentes que se agreguen a dichas soluciones.

4.- Aplicaciones de los Alginatos

La gran variedad de aplicaciones del alginato y sus productos se basa por una parte en su capacidad natural de ligar moléculas de agua y por otra en su reactividad frente a iones calcio, lo que permite obtener geles de alginato incluso a bajas temperaturas. Esta última habilidad permite la obtención de geles de características termoestables al actuar en una matriz de proteínas miofibrilares a bajas temperaturas (5°C).

- Los alginatos disponibles en el mercado se comercializan en su mayoría en forma de de sales hidrosolubles, libres de celulosa, blanqueadas y purificadas. Entre ellos se incluyen el ácido algínico, alginato de sodio, alginato de potasio, alginato de amonio, alginato de calcio y el alginato de propilenglicol. Pero además, también se producen compuestos combinados, tales como: alginato de amonio-calcio y alginato de sodio-calcio.

Algunos de estos compuestos, principalmente el ácido algínico y sus sales de sodio, calcio y potasio, se ofrecen en tres calidades diferentes en función de los procesos de purificación y blanqueado que sufren durante su producción. Estas calidades son:

- ✓ Calidad alimentaria: la presentan los productos completamente libres de celulosa, de coloración blanca o ligeramente amarilla.
- ✓ Calidad farmacéutica: son productos libres de celulosa y totalmente blancos. Es la calidad más pura.
- ✓ Calidad técnica: la presentan los productos usualmente libres de celulosa, aunque pueden contener cierta proporción; son de color variable (blancos, amarillos o marrones). Por lo general se emplean principalmente en la industria textil, de pinturas, papeles calco, maderas aglomeradas, etc.

En tecnología de alimentos se emplean principalmente el alginato sódico (E-401) por su capacidad gelificante y el alginato de propilenglicol (E-405) que pese a no tener capacidad de formar geles, es empleado como suspensor y estabilizante de espumas.

Las aplicaciones de los alginatos en la tecnología alimentaria se conocen desde la década de los 60 del pasado siglo. Empezó a emplearse en la formación de películas para recubrir productos elaborados a partir de recortes de ternera frescos con el fin de prolongar su vida útil (Allen y col, 1963, McCormick, 1975), en productos cárnicos de cerdo (Allen y col, 1963) e incluso en productos pesqueros (Earle, 1968).

En la actualidad los alginatos gozan de gran cantidad de aplicaciones (Tabla 3), aunque de entre ellas caben destacar: los rellenos de diferentes tipos, piezas de "fruta" para usar en repostería, o incluso en la fabricación de piezas con forma definida como pueden ser los conocidos "aros de cebolla" o las "guindas", estabilizante de espumas de cervezas y bebidas de frutas, etc.

Para elaborar rellenos para aceitunas, el material de relleno (anchoa, pimiento triturado, etc.), se inyecta en forma líquida y su gelificación se produce posteriormente a en el interior de las aceitunas. En estos casos, el proceso de gelificación del alginato debe ser controlado, de tal forma que dicha gelificación no ocurra antes de lo deseado. Para ello puede ser añadido junto con un compuesto poco soluble (como el sulfato o algunos fosfatos) que dificulte su difusión o bien puede ser liberado de un complejo o de una sal soluble como el carbonato cálcico, acidificando lentamente (por ejemplo, con gluconodelta lactona).

Tabla 3: Aplicaciones generales de los alginatos.

Aplicaciones alimenticias	
Espesante, estabilizante o propiedades de suspensión	Zumos de frutas Salsas y cremas Cerveza
Gelificante	Alimentos para animales Gelatinas Relleno de aceitunas
Propiedades de control	Fabricación de quesos Fabricación de helados Cubiertas de frutas en pastelería
Aplicaciones farmacéuticas	
Espesantes	Jarabes y emulsiones Lociones Cremas
Gelificantes	Polvos de impresión dental
Aplicaciones textiles	
Espesantes	Gomas para impresión Baños de tinta
Propiedades de limpieza	Sistemas reactivos de tinta Sistemas de dispersión de tinta
Otras aplicaciones industriales	
Formulación de películas	Industria de papeles de calco Sellado de conservas
Interacción con silicatos	Electrodos de soldadura
Espesantes y estabilizantes	Barnices para cerámicas Pinturas cremosas

En productos de pequeño grosor, o cuando lo que se pretende es obtener una película adherente especialmente en la parte exterior del mismo, la difusión de los iones de calcio se produce desde el exterior del alimento hacia su interior. Esta tecnología es empleada en la producción de “perlas de alginato” o sucedáneos de huevas de pescado (Vieira SA, 2000). Para ello el alginato, en una proporción del 2% aproximadamente, se disuelve en agua biodestilada y la solución obtenida se bombea gota a gota en una solución de cloruro de calcio (0,05 M). El alginato en contacto con la solución de CaCl_2 forma un gel transparente. El problema que presenta esta metodología es que según aumenta la difusión del CaCl_2 dentro de la solución de alginato, el gel va a ir endureciéndose, por ello la difusión de iones calcio debe estar muy controlada, por lo que se condiciona enormemente el proceso de elaboración, dado que el producto obtenido debe ser consumido lo antes posible pues de lo contrario su textura iría

endureciéndose al pasar el tiempo. La solución a este problema técnico vino de la mano de cocineros de renombre como Ferrán Adriá (2003), quienes sugirieron hacer el proceso al contrario, es decir, que la solución de calcio quedase dentro (por lo que la cantidad de iones calcio quedaba perfectamente controlada), de esta forma únicamente se endurecería hasta que el limitado número de iones calcio existente en el interior se acoplase entre la solución de alginato dispuesta en la superficie. A este proceso se conoce como “Sferificación” (www.texturasebulli.com).

Como se ha comentado con anterioridad, uno de los empleos más característicos de los alginatos es la formación de revestimientos comestibles para alimentos. Se ha empleado para recubrir huevas de pescado frescas, congeladas o descongeladas. Para ello, una solución de alginato sódico es pulverizada sobre la superficie de dichas huevas que luego son tratadas con una solución concentrada de cloruro de calcio (Vieira SA, 2000). Estas películas también se han destinado a preservar el aspecto fresco de pescados y gambas al minimizar la contaminación microbiana, las pérdidas de agua y la oxidación (Gao y col., 2001).

También se ha utilizado para gelificar la masa en productos reestructurados análogos al de huevas de pescado (Vignisson, 2004).

Otra de sus aplicaciones más conocidas es como estabilizante de suspensiones asociado al carragenato, y para minimizar el crecimiento de cristales de hielo en helados y en productos que van a ser descongelados, dado que evitan la sinéresis de los mismos al reaccionar las regiones de manurónico con las moléculas de agua ligándolas y evitando de esta forma las pérdidas por descongelación (Zumbado, 1999).

Su empleo ha sido también optimizado para fabricar pequeñas cápsulas en cuyo interior se almacenan aceites, vitaminas, aminoácidos, minerales, etc. que se añaden a yogures, cremas, gelatinas, músculo de pescado o carne y, que pueden ser destinados tanto en alimentación humana como animal (Fernández-Lespagnol, 2003). También se ha empleado en la elaboración de geles con alto contenido en aceite a partir de despojos de origen animal o marino que se destinan a alimentación animal (Baekken y col. 2001).

I.3.2.-TRANSGLUTAMINASAS: TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA

Las transglutaminasas (TGasas) son una familia de proteínas presentes en la mayoría de los tejidos y fluidos extracelulares de los vertebrados e involucradas en numerosos procesos biológicos tales como: coagulación sanguínea, cicatrización de heridas, queratinización de la epidermis y endurecimiento de la membrana de los eritrocitos. Se han encontrado en mamíferos, pescados, plantas y microorganismos. El papel fisiológico de las TGasas parece ser considerablemente diverso y varias enfermedades se han relacionado con deficiencias o sobreproducción de estas enzimas en el organismo humano (Wilhelm y col., 1996).

Se identificaron por primera vez por Waelsch y colaboradores (Clarke y col., 1959) como enzimas del hígado capaces de incorporar aminas dentro de las proteínas. Wilhelm y col. (1996) distinguieron distintos tipos de isoformas de TGasas según la fuente de obtención y describieron distintos métodos de extracción, purificación y forma de determinar su actividad. La masa molecular de las diferentes isoformas determinadas por electroforesis (SDS-PAGE) y la fuente de obtención se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4: Masa molecular de las diferentes isoformas de transglutaminasa

Enzima*	Masa Molecular (kDa)	Fuente de obtención
TGasa SECRETORIA	65-70	Próstata (cobaya, rata)
TGasa TISULAR	80-85	Hígado (cobaya, rata)
TGasa HEMOCÍTICA	86	Eritrocitos (hombre)
TGasa QUERATINOCÍTICA	92	Hígado (rata)
FACTOR XIIIa	80	Plaquetas, placenta, plasma (hombre)
TGasa EPIDÉRMICA (enzima activa)	50	Piel (cobaya, hombre)

* Wilhelm *et al.* (1996)

La TGasa obtenida a partir de hígado de cobaya fue la única fuente de enzima comercial durante varios años. A principios de los años 80, se llevaron a cabo los primeros experimentos en alimentos y se observó la posibilidad de modificar el comportamiento de las proteínas de la leche y de la soja, utilizando TGasa extraída de hígado de cobaya y de plasma bovino (Ikura y col., 1980). Con posterioridad se intentó obtener cantidades elevadas de la enzima mediante la manipulación genética usando microorganismos huéspedes como *Escherichia*, *Bacillus*, *Aspergillus* o *Saccharomyces*. No obstante, ninguna de esas TGasas se comercializó debido a la baja aceptación y al poco rendimiento obtenido (Motoki y Seguro, 1998).

Finalmente, la producción para uso industrial fue posible por el aislamiento y purificación de una enzima secretada por un microorganismo taxonómicamente clasificado como una variante de *Streptoverticillium mobaraense*, actualmente denominada *Streptomyces mobaraense* (Seguro y col. 1996). Esta enzima se caracteriza por formar enlaces covalentes con la proteínas, que es la propiedad fundamental de la TGasa, y se la denominó Transglutaminasa Microbiana (MTGasa) (Nonaka y col., 1989).

Las transglutaminasas son proteínas- γ -glutaminiltransferasa (EC 2,3,2,13) (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1992).

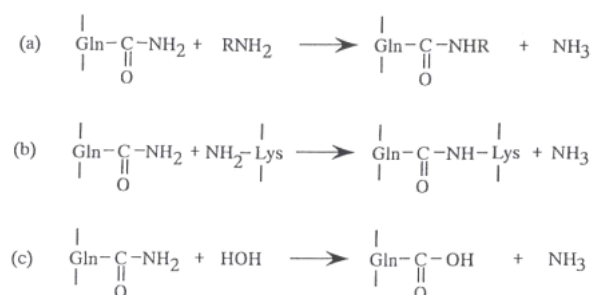


Figura 4: Reacciones de la Transglutaminasa

Catalizan la reacción de transferencia de grupos acil entre el grupo γ -carboxiamida de un péptido ligado a un residuo de glutamina (donador de acilos) y una gran variedad de aminas primarias (aceptor de acilos), incluyendo el grupo amino de la lisina (Figura 4a). Cuando el grupo ϵ -amino de la lisina es el sustrato, las cadenas de péptidos quedan unidas a través de enlaces covalentes ϵ -(γ -glutaminil)lisina (G-L) (Figura 4b). En ausencia de sustratos con grupos amino, la transglutaminasa cataliza la hidrólisis del grupo γ -carboxiamida del grupo glutaminil (Figura 4c) dando lugar a una desaminación (Motoki y Seguro, 1998).

1.-Transglutaminasa endógena del Músculo de pescado

Pese a que la TGasa endógena se encuentra ampliamente distribuida de forma natural en el músculo de pescado, su actividad y concentración dependen enormemente de la especie de pescado (Tsukamasa y col., 2002).

Esta enzima es la responsable del fenómeno conocido como *suwari* que consiste en la gelificación de la proteína miofibrilar de músculo de pescado a baja temperatura (<40 °C). El *suwari* es un gel obtenido después de un proceso de setting o asentamiento, durante el cual, la cadena pesada de la miosina (MHC) se polimeriza formando enlaces covalentes no disulfuro catalizados por dicha transglutaminasa endógena (Seki y col. 1990; Kumazawa y col., 1996; Kimura y col., 1991; Kumazawa y col., 2005).

El proceso depende en gran medida de la especie de pescado (Benjakul y Visessangaun, 2003; Morales y col., 2001), así diferentes especies pueden tener distintas temperaturas óptimas de setting. Por ejemplo, la temperatura óptima de Abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*) es de 25°C y la de la corvina (*Pachuyrus bonariensis*) de 40°C (Kamath y col., 1992). Durante el proceso térmico de cocinado es bastante común que la transglutaminasa endógena forme enlaces cruzados con la proteínas antes de ser inactivada por las altas temperaturas que se aplican a los alimentos.

La principal diferencia entre la transglutaminasa endógena del músculo y la transglutaminasa de origen microbiano (MTGasa) es que la primera requiere de la presencia de iones Ca^{2+} para expresar su actividad enzimática.

Las primeras investigaciones sobre la transglutaminasa endógena de músculo de pescado sometida a altas presiones fueron llevadas a cabo por Shoji y col. (1994) sobre *surimi* de abadejo (*Theragra chalcogramma*) y consideraron que la transglutaminasa del músculo de pescado era inactivada en su mayor parte por el tratamiento a 300MPa/0°C/10min y no podía estar por tanto involucrada en la gelificación por alta presión, ni en la formación del gel posterior al tratamiento. Estudios llevados a cabo en músculo picado de jurel (*Trachurus trachurus*) concluyeron que la actividad residual de la enzima endógena de pescado picado se reducía sustancialmente en geles obtenidos mediante la presurización (300MPa/25°C/15min) al incubarlo a 25°C (Montero y col., 2005). También se observó que inducía la formación de geles fuertes y deformables y con menor índice de TBA, en geles elaborados a partir de jurel (*Trachurus spp.*), comparados con aquellos que solo habían sido presurizados sin pasar por un periodo previo de asentamiento (Gómez-Guillén y col., 2005).

Actualmente, no hay duda de que tanto la TGasa endógena como la MTGasa mejoran la eficacia de la materia prima para formar geles de pescado. Sin embargo, la formación de isopéptidos en los geles de “surimi” durante el “suwari”, difiere cuando es catalizado por una enzima u otra (Sato y col., 2001).

2.- Transglutaminasa microbiana

La Transglutaminasa Microbiana (MTGasa) suele ser obtenida a partir de *Streptoverticillium sp.* Es secretada en el medio de cultivo desde la membrana citoplasmática como un zimógeno y se activa por un proceso proteolítico, por lo que no requiere de disrupción celular para su obtención (Zhu y col., 1995).

Es una proteína simple, monomérica que consiste en 331 aminoácidos y su masa molecular calculada a partir de su composición de aminoácidos es de 37,863 KDa. Posee una estructura cristalina con una profunda hendidura en uno de los lados de la molécula donde se encuentra el residuo catalítico de Cisteína (Cys⁶⁴) (Kashiwagi y col., 2002).

La estructura compacta que posee la MTGasa es totalmente diferente a la que se obtiene del plasma humano (F XIIIa) y de la de tipo tisular derivada de hígado de pescado (FTGasa), las cuales sí se parecen considerablemente (Noguchi y col., 2001). En la estructura tridimensional de la TGasa F XIIIa, un residuo de Tirosina (Tyr) restringe la accesibilidad del sitio activo y posiblemente los iones Ca²⁺ causan un cambio estructural que libera al residuo de Tyr y permite que se forme un complejo intermedio acil-enzima. Sin embargo, en la MTGasa, el residuo catalítico Cys⁶⁴ está suficientemente expuesto al solvente lo que le permite reaccionar rápidamente con el sustrato. Esta diferencia entre los dos tipos de enzima marca su utilización en cuanto a la especificidad del sustrato y la velocidad de reacción de la misma (Shimba y col., 2002).

La MTGasa se caracteriza por catalizar la formación de enlaces ϵ -(γ -glutaminil)lisina en la mayoría de las proteínas que contengan glutamina y lisina, como son : caseínas, globulinas de soja, gluten, proteínas de huevo, miosina y fibrina, entre otras, pero debe tenerse en cuenta que la cantidad de enlaces cruzados formados dependerá de la estructura macromolecular de cada sustrato (Dickinson, 1997). Dado que los residuos de glutamina residen en regiones flexibles de la cadena polimérica o en regiones con giros β o inversos, las caseínas se convierten en excelentes sustratos (Nio y col., 1986).

Los enlaces ϵ -(γ -glutaminil)lisina, que forma la MTGasa, son digeridos por las enzimas digestivas de todos los mamíferos que rompen los polipéptidos en aminoácidos, pero mantienen los dipéptidos ϵ -(γ -glutaminil)lisina intactos. Éstos serán posteriormente

absorbidos en la paredes intestinales y se transportaran al hígado, donde son metabolizados por dos enzimas que van a degradar estos enlaces: la γ -glutamyl-transferasa (EC 2,3,2,2) y la γ -glutamyl-ciclotransferasa (EC 2,3,2,4), generando lisina libre. Además se ha comprobado que la lisina proveniente de los enlaces cruzados se incorpora a los tejidos y es aprovechada por el organismo (Seguro y col., 1996).

Los enlaces ϵ -(γ -glutaminil)lisina se presentan de manera natural en numerosos alimentos, como son: huevos de varias especies de pescado (salmón, arenque y sardina (Kumazawa y col., 1996), así como en diversos alimentos tanto frescos como procesados de pescado, crustáceos, carnes, aves y soja (Sakamoto y col., 1995). Por el contrario no se hallaron en la leche y productos lácteos, debido posiblemente a la existencia de un péptido inhibidor de la actividad transglutaminasa existente en leche de bovino, cabra y oveja (de Jong y col., 2003). La mayor cantidad de estos enlaces se encuentra en productos de pescado procesados térmicamente como el *kamaboko* (gel termoestable obtenido tras aplicar temperaturas superiores a 60°C posteriormente a solubilización de su proteína), o cárnicos, tales como pollo frito, cerdo asado y hamburguesas cocinadas, como consecuencia de la deshidratación de los grupos ϵ -amino de la lisina y los γ -carboxilo de la glutamina lo que favorece la formación de dichos enlaces (Gerrard, 2002). Por otra parte, la MTGasa es también capaz de incorporar aminoácidos o péptidos a sustratos de proteínas, lo cual puede aumentar el valor nutricional de los alimentos porque los aminoácidos o dipéptidos incorporados covalentemente se comportan como aminoácidos endógenos (Nonaka y col., 1996).

No se conocen estudios específicos enfocados a determinar los límites legales y las condiciones de empleo de la MTGasa,. Aunque se ha señalado que su empleo podría aumentar el riesgo de inducir reacciones alérgicas, Poulsen (2004) y Pedersen y col. (2004) indicaron que no existía ningún problema de seguridad con el potencial alérgico de la MTGasa.

2.1. Propiedades Físico-químicas.

La MTGasa es estable en un amplio rango de pH, entre 4 y 9, aunque su óptimo se localiza entre 6-7. Su punto isoeléctrico es 8,9 y pese a que su temperatura óptima de actividad se encuentra entre 45-50°C a pH 6, mantiene su actividad a temperaturas de entre 0-50°C (Ajinomoto, 2009). A temperaturas de congelación posee aún cierta

actividad. pero su inactivación es irreversible a temperaturas de más de 80°C (Ando y col., 1989; Menéndez y col., 2006).

Como ya ha sido comentado con anterioridad, a diferencia de la transglutaminasa endógena, la MTGasa es totalmente independiente del calcio (Motoki y col., 1990). Esta característica es muy importante a la hora de modificar la propiedades funcionales de las proteínas debido a que muchas de las proteínas presentes en los alimentos, como son las caseínas, globulinas de soja y miosina, son susceptibles a la presencia de Ca^{2+} , facilitando éste su precipitación, mientras que otros cationes como K^+ , Na^+ , Mg^{2+} y Ba^{2+} no afectan a su actividad enzimática (Tsai y col., 1996; Matsumura y col., 2000). Por otra parte, la MTGasa, puede establecer enlaces cruzados con un mayor número de proteínas que cualquier otra TGasa obtenida de mamíferos (de Jong y col., 2001).

2.2.- Aplicaciones

Tanto la estructura como las propiedades de la MTGasa, le confieren características adecuadas para ser un aditivo de amplio empleo en la industria alimentaria. Estas características son:

- ✓ trabajar en un amplio rango de pH
- ✓ temperatura de actividad baja y media
- ✓ elevada velocidad de reacción
- ✓ baja masa molecular
- ✓ totalmente independiente de Ca^{2+}
- ✓ baja especificidad de sustrato
- ✓ baja actividad de desaminación

En la actualidad, la MTGasa es empleada para mejorar las propiedades físicas de muchos alimentos ricos en proteínas, como la carne, lácteos, o de soja, etc. (Kurahisi y col., 2001; Pszczola, 2002) e incluso en productos de panadería, aunque su empleo en la elaboración de productos a partir de músculo de pescado es aún poco frecuente y menos aún cuando se quiere que estos productos mantengan su aspecto de crudo durante la comercialización.

Los enlaces cruzados que se forman como consecuencia de su adición mejoran varias de las propiedades funcionales de las proteínas como son: la capacidad

emulsionante, la solubilidad y la gelificación, sin embargo los altos costos y la poca disponibilidad de estas enzimas limitaron su uso en la industria alimentaria durante un periodo de tiempo (Motoki y Seguro, 1998).

Entre las aplicaciones más características de la MTGasa tanto en la industria alimentaria como fuera de ella caben destacar:

2.2.1.- Carne y productos cárnicos

La reestructuración de la carne fresca ha sido una de las principales aplicaciones de las MTGasas, empleándose para reestructurar piezas de carne de bajo coste a fin de mejorar su valor comercial (Lee y Park, 2003). Kuraishi y col., (1997) observaron que la combinación de MTGasa y caseinatos permitía ligar piezas de carne a bajas temperaturas sin necesidad de añadir NaCl dando lugar a un producto cárnico reestructurado con reducida concentración de sal. La MTGasa se ha empleado en productos elaborados a partir de carne de cerdo, bovino, pollo y cordero, habiéndose demostrado que la eficiencia de la enzima varía con la especie animal (Carballo y col., 2006).

La capacidad que presenta la miosina de formar un gel al formarse gran cantidad de enlaces ϵ -(γ -glutamínil)lisina, como consecuencia de la adición de MTGasa, es un factor de máxima importancia en la preparación tanto de jamones y salchichas (Kuraishi y col., 1998), reestructurados de pollo (Trespacios y Pla, 2007), como de cualquier otro tipo de producto reestructurado a partir de músculo de ternera o cerdo (Kolle y Sawell, 2003; Katayama y col., 2005). Varios investigadores han estudiado el efecto de la concentración de enzima, sal y fosfatos sobre las características de los productos cárnicos, a fin de aumentar sus propiedades ligantes sin necesidad de aumentar la concentración de NaCl (Huffman y col., 1987; Jiménez-Colmenero y col., 2005; Carballo y col., 2006; Cofrades y col., 2006). Mediante su empleo se mejora la estabilidad de las emulsiones proteicas y se incrementa la capacidad emulsionante de los homogenizados de pollo (Ruiz-Carrascal y Regenstein, 2002) y se mejoran las propiedades físico-químicas de reestructurados (Ramírez y col., 2002; Jiménez-Colmenero, 2005; Cofrades y col., 2006). La MTGasa ha sido empleada para elaborar productos cárnicos reestructurados en frío (Kurahisi y col., 1997; Moller y col., 1997; Cofrades y col., 2006) e incluso dada su capacidad de modificar las propiedades de las proteínas, también se ha empleado como sustituto de la grasa tanto en productos cárnicos como derivados de la pesca (Novo-Disk AS, 1995).

El estudio de diversos ingredientes no cárnicos en combinación con la enzima para modificar las características de textura y retención de agua en diversos productos cárnicos ha sido también ampliamente estudiado. Entre estos estudios cabe destacar la combinación de la MTGasa con caseinatos (Carballo y col., 2006), carragenatos (Pietrasik, 2003;), soja (Muguruma y col., 2003), albumen de huevo (Pietrasik, 2003), nueces (Cofrades y col., 2006), surimi (Dondero y col., 2006) y plasma sanguíneo (Jarmoluk y Pietrasik, 2003).

2.2.1.- Pescado y productos de la pesca.

El empleo de transglutaminasa, tanto endógena como microbiana, mejora la formación de geles de pescado. La MTGasa ha sido empleada para obtener *surimi* de jurel (*Trachurus murphyi*) y abadejo de Alaska (*Theragra*) (Asagami y col., 1995; Dondero y col., 2002; Gilleland y col., 1997). En este sentido, Asagami y col. (1995) adicionaron MTGasa en el *surimi* congelado de diferentes especies, los resultados demostraron que los efectos de la MTGasa no sólo dependían de la especie de la que se extrae el músculo sino que también depende de otros factores como por ejemplo su frescura. Su empleo se realizó en combinación con tratamientos térmicos para la obtención de mejores geles empleando platija mejicana (*Cyclopsetta chittendeni*) o músculo de abadejo de Alaska (*Alaska pollock*) (Ramírez y col., 2006; Uresti y col., 2003; Seki y col., 1990) o para mejorar el proceso de reestructuración a partir de restos de músculo de pescado de carpa plateada reduciendo el contenido en NaCl (*Hypophthalmichthys molitrix*) (Ramírez y col., 2002; Téllez-Luis y col., 2002). Estos estudios confirmaron que la reducción de NaCl, de 2% a 1% en la elaboración de reestructurados, empleando MTGasa, permitía la obtención de reestructurados de apropiadas propiedades físico-químicas. En la actualidad es posible elaborar reestructurados elaborados a partir de músculo picado (*Ictalurus punctatus*) empleando MTGasa (0.05-0.1%) y aislados proteicos de soja (1.7%) sin emplear fosfatos (Min y Green, 2008). Por otra parte, su empleo es también conocido en la elaboración de productos pesqueros elaborados a partir de una masa de huevas de bacalao a la que se incorpora MTGasa (Ajinomoto KK, 1994).

Recientemente y con el claro objetivo de incrementar el valor comercial de algunas especies de pescado, se ha propuesto utilizar la MTGasa a bajas temperaturas en la combinación con altas presiones en productos reestructurados de pescado a partir de platija o halibut del pacífico (*Atheresthes stomias*). Los resultados muestran, que los

tratamientos con altas presiones mejoran las propiedades mecánicas de los geles de músculo de pescado adicionados con MTGasa, ya que la presurización protege a las proteínas contra la agregación y desnaturalización proteica como consecuencia del tratamiento térmico posterior (Uresti y col., 2006).

El empleo de MTGasa y colágeno de pescado para elaborar huevas de bacalao a las que pueden incorporarse otros ingredientes tales como pimienta roja, es una de las últimas aplicaciones conocidas en la que se ha empleado (Ogawa, 2008).

2.2.3.- Otras aplicaciones

Cuando la enzima se añade a productos lácteos, es posible mejorar la fuerza de gel, las propiedades mecánicas y la capacidad de retención de agua, aumentar la viscosidad, la estabilidad, la coagulación enzimática y disminuir la permeabilidad de los geles. Uno de los mayores campos de aplicación de la MTGasa en la industria láctea es la elaboración de yogurt, ya que disminuye la sinéresis e incrementa la fuerza de gel (Lauber y col., 2000).

La caseínas son particularmente buenos sustratos para la MTGasa, en cambio, las proteínas del suero tienden a ser menos eficaces en la formación de los enlaces cruzados debido a su estructura globular (Sharma y col., 2002) y en un sistema mixto, como la leche, las caseínas forman enlaces cruzados preferentemente con las proteínas séricas. La inclusión de la MTGasa acelera la velocidad de formación de los geles de caseína, y les proporciona una mayor viscoelasticidad en relación con los geles obtenidos por acidificación o por renina (Flanagan y col., 2003).

La adición de la enzima mejora la característica textura del “tofu” (gel a partir de proteína de soja) y evita la pérdida de agua durante la esterilización posterior a fin de prolongar su vida útil (Khwan y Easa, 2003). El tratamiento de las proteínas de soja con MTGasa y proteasas las hace muy adecuadas para mejorar el sabor de encurtidos y bebidas a las que se añaden (Kato y Nakamura, 2006).

A partir de proteínas de leche, soja, pectina, colágeno, gelatina o mezclas entre sí en combinación con MTGasa, se han desarrollado películas comestibles muy resistentes (Oh y col., 2004; Yi y col., 2006, Kok y col., 2007).

Hoy en día existen métodos para la conservación de frutas y vegetales mediante el recubrimiento con una membrana conteniendo diversas proteínas y MTGasa (Takagaki y col., 1991).

II.- JUSTIFICACIÓN

Como ya ha sido comentado en la Introducción, el agotamiento de especies nobles marinas como consecuencia de la fuerte sobreexplotación a la que son sometidos, induce a llevar a cabo un mayor aprovechamiento de los restos de músculo que quedan tras el fileteado de dichas especies. Por otra parte existen una serie de especies de difícil utilización dadas sus características intrínsecas (pequeño tamaño, gran cantidad de espinas, etc.) que sólo pueden emplearse tras recurrir previamente a la extracción mecánica de su músculo. Con este músculo, existe la posibilidad de elaborar productos comerciales, de considerable valor añadido, basados en su reestructuración pudiéndose obtener texturas muy diferentes. Para ello se requiere de una tecnología que permita ligar las partículas de músculo de forma que soporten el cocinado.

En la actualidad, lo más frecuente es la elaboración de geles termoestables mediante inducción térmica tras la solubilización de la proteína miofibrilar. De esta forma se pueden crear texturas muy variadas pero se pierden tanto el sabor como el aspecto de músculo crudo. Esta pérdida es relevante en el caso de la elaboración de productos marinados o ahumados en crudo o en sucedáneos a filetes de pescado comercializados en fresco.

Para la elaboración de productos reestructurados con aspecto, olor y sabor a crudo es necesario recurrir a otras tecnologías que no requieran de tratamientos térmicos.

Entre ellas destacan:

- 1.- Utilización de alginato sódico, para crear una red de alginato sódico-iones cálcico que se integre con las proteínas miofibrilares y que sea capaz de sostener la trama muscular.
- 2.- Adición de transglutaminasa microbiana, cuya acción se basa en la formación de enlaces covalentes con las proteínas miofibrilares.

Los alginatos han sido bastante utilizados en la elaboración de productos cárnicos reestructurados en crudo (Means and Schmidt, 1986, Means and Schmidt, 1987, Esquerre, 1994, Boles y Shand, 1998, Devatkal y Mendiratta, 2001) aunque su uso en productos pesqueros es bastante menos conocido (Montero y Pérez-Mateos, 2001; Pérez-Mateos y col., 2002; Suklim y col, 2004) y en algunas ocasiones son patentes (Vieira, 2000; Sokolova y col., 2005, Shimada y col., 2008).

En relación con el empleo de la transglutaminasa microbiana, también ha sido, bastante utilizada en productos cárnicos (Kurahisi y col, 1997; Kurahisi y col, 1998; Lee

y Park, 2003; Ruiz-Carrascal y Regenstain, 2002; Carballo y col., 2006, Cofrades y col, 2006) pero tampoco está muy extendido su uso en la elaboración de productos pesqueros (Pérez-Mateos y Montero, 1997; Montero y col., 2005) a los cuales, además, suelen aplicarse primero temperaturas alrededor de 40°C durante diferentes periodos de tiempo (generalmente unas horas), para favorecer la actividad de la enzima, y posteriormente aplicar un tratamiento térmico, que puede alcanzar fácilmente los 90°C, con lo que el producto resultante queda con aspecto y propiedades de producto cocinado (Ramírez y col.; 2006; Seki y col., 1998; Uresti y col., 2003, Lee y col., 1997).

Por todo lo anteriormente expuesto, y con el interés de desarrollar modelos que sirvan de base para la elaboración de productos pesqueros de aspecto crudo, se llevaran a cabo una serie de estudios sobre el comportamiento de músculo picado de pescado adicionado de alginato o transglutaminasa de origen microbiano bajo la influencia de diversas variables que se recogen en los objetivos de la presente Memoria.

III.- OBJETIVOS

El diseño y desarrollo de reestructurados obtenidos a partir de diferentes especies pesqueras empleando tecnologías que no se basen en tratamientos térmicos para gelificar a las proteínas, supone un importante reto tecnológico. Sobre todo, teniendo en cuenta que se propone elaborar un producto análogo que debe responder a los criterios de calidad de cualquier otro producto reestructurado de características similares.

El objetivo general de la presente Memoria consiste en abordar, a través de diversos estudios parciales, el desarrollo tecnológico de la reestructuración en frío a partir de recortes de músculo picado de merluza congelada (*Merluccius capensis*), músculo picado de merluza fresca (*Merluccius merluccius*), trucha fresca (*Oncorhynchis mykiss*) y surimi de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Para ello se emplearán diferentes técnicas de procesado que incluyen el empleo de Alginato sódico y Transglutaminasa microbiana (MTGasa).

Con tal fin, se plantearon una serie de objetivos parciales que dan origen a los distintos trabajos experimentales que conforman la presente memoria.

BLOQUE I: EMPLEO DE ALGINATO SÓDICO EN LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS REESTRUCTURADOS DE MÚSCULO DE MERLUZA

El objetivo principal de este bloque es estudiar el efecto tecnológico que ejerce la adición de alginato sódico junto con diferentes fuentes de calcio, encunado se incorpora músculo (picado) de merluza. El grado de picado del músculo puede ser muy diferente, empleándose trozos pequeños de músculo cuya estructura se mantiene y otros donde se emplea homogeneización con “cutter” obteniéndose una masa homogénea. En ambos casos se pretende obtener un producto reestructurado tipo, así como determinar su aptitud a los procesos de refrigeración y congelación.

Este objetivo se pretende conseguir a través de los siguientes objetivos parciales:

- 1.1.- Estudiar los diferentes procedimientos para la incorporación de fuentes de calcio a sistemas de músculo-alginato sódico para formar geles termoestables.
- 1.2.- Determinar la aptitud tecnológica de las diferentes fuentes de calcio para elaborar geles termoestables de sistema músculo-alginato.

1.3.- Estudiar las propiedades físico-químicas de un sistema alginato-músculo picado, cuando se adiciona cloruro cálcico con el propósito de elaborar el reestructurado.

1.4.- Estudiar las modificaciones durante la conservación en estado congelado y refrigerado de los reestructurados elaborados con alginato sódico y cloruro cálcico

BLOQUE II: EMPLEO DE TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA EN LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS REESTRUCTURADOS DE MERLUZA Y CALAMAR GIGANTE.

En este bloque, el principal objetivo es estudiar el efecto tecnológico que ejerce la inclusión de transglutaminasa microbiana sobre dos sistemas diferentes:

2.1.- Reestructurados modelo elaborados empleando músculo de merluza

En este punto, el objetivo principal es el estudio de las modificaciones físico-químicas de modelos de reestructurados de merluza elaborados (con diferente grado de picado) y diversas variables que se recogen a continuación:

2.1.1.- Estudio de diferentes procedimientos para la incorporación de MTGasa a un modelo de reestructurado aplicando distintas temperaturas que favorezcan la acción de la enzima.

2.1.2.- Estudio de la incorporación de MTGasa y/o caseinato sódico sobre las propiedades físico-químicas del reestructurado de músculo de merluza.

2.1.3.- Estudio sobre la importancia de la calidad del músculo de merluza así como su procesado en la elaboración de sistemas músculo-MTGasa.

2.1.4.- Determinar la influencia del pH, concentración de NaCl y grado de picado de un músculo de merluza sobre la acción de la MTGasa para la elaboración de modelos de reestructurados.

2.1.5.- Estudio de la oxidación proteica y lipídica en modelos de reestructurados elaborados a partir de músculo picado de merluza y trucha.

2.1.6.- Estudiar las modificaciones físico-químicas durante la conservación en estado congelado y refrigerado de modelos de reestructurados elaborados con músculo de merluza y MTGasa - caseinato sódico.

2.2.- Gelificación a partir de *surimi* de calamar y MTGasa .

2.2.1.- Determinar en qué medida la adición de MTGasa y su combinación con altas presiones puede mejorar las propiedades físico-químicas del reestructurado elaborado a partir de *surimi* de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

IV.-MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1.- MATERIA PRIMA

Los estudios realizados se llevaron a cabo a partir de:

- 1.- Recortes de filetes de merluza (*Merluccius capensis*) sin piel, congelados en altamar y con un periodo de congelación inferior a 1 año.
- 2.- Bloques congelados de *surimi* de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).
- 3.- Recortes de filetes de merluza fresca (*Merluccius merluccius*).
- 4.- Recortes de filetes de trucha fresca (*Oncorhynchus mykiss*).

Los recortes de filetes de merluza congelada se recibieron en bloques de 15 Kg de peso. Para su conservación hasta su utilización, los bloques se cortaron en porciones de 600 g aproximadamente y se envasaron a vacío (Cryovac BB4L, Barcelona) manteniéndose a $-20\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante un máximo de 2 meses.

El *surimi* se recibió en bloques de 10 Kg de peso. Para su mejor manejo y conservación se cortaron en trozos rectangulares de entre 500-600 g y se envasaron en bolsas a vacío (Cryovac BB4L, Barcelona). Hasta su utilización se mantuvieron en estado congelado a $-20\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Los recortes de merluza fresca y los de trucha se adquirieron en un mercado local y su procesamiento y utilización fueron inmediatos.

IV.2.-PROCEDIMIENTOS DE REESTRUCTURACIÓN.

En la presente Memoria se han empleado dos tipos diferentes de reestructuración que se detallan a continuación.

IV.2.1- REESTRUCTURADOS MÚSCULO-ALGINATO SÓDICO.

Esta metodología se empleó para reestructurados obtenidos a partir de músculo de merluza (*Merluccius capensis*) previamente descongelado y atemperado.

Los procedimientos de reestructuración empleados fueron:

1.- Reestructuración mediante procesado por homogeneización en “cutter”:

El picado del pescado y mezclado con los ingredientes se llevó a cabo en una homogenizadora picadora a vacío (Stephan UM5, Stephan u. Söhne GmbH & Co., Hameln, Alemania), durante 5 minutos, hasta conseguir una masa completamente homogénea.

La secuencia de adición de los ingredientes fue: en primer lugar NaCl, seguido de alginato sódico y finalmente la sal cálcica. Tras la incorporación de cada componente, la mezcla es homogenizada durante un minuto. Posteriormente la masa final es homogenizada durante 2 minutos más.

Este tipo reestructuración se empleó en los trabajos experimentales correspondientes a los Apartados V.1.2, V.1.3 y V.1.4 que componen la presente Memoria.

2.- Reestructuración a partir de trozos pequeños de músculo:

Para estos reestructurados, el músculo es previamente picado en una picadora FST 11 (Van Dall SRL, Milano, Italia) con tamaño de orificio de 20.0 mm. El mezclado de los ingredientes con el músculo de pescado se llevó a cabo en una mezcladora homegenizadora (Hobart N-504, Hobart Corporation, U.S.A) durante 5 minutos.

Para la adición de ingredientes se utilizó la misma secuencia que en el apartado anterior. Este modelo de reestructurado se estudia en el trabajo experimental recogido en los Apartados V.3.1 y V.3.1 de la presente Memoria.

La masa que se obtiene en ambos casos, se colocó en placas de Petri de 96mm x 16mm (capacidad de 90±10 g). Seguidamente se introdujeron en bolsas de plástico (Cryovac BB4L, Barcelona), se envasaron a vacío, con el fin de compactar la masa, y se mantuvieron en una cámara refrigerada a 5±1°C hasta el momento de llevar a cabo los

análisis o en su caso hasta el momento de ser conservados en estado refrigerado o congelado.

IV.2.2.-MODELOS DE REESTRUCTURADOS ELABORADOS MEDIANTE LA ADICIÓN DE MTGasa.

Esta metodología se empleó para modelos de reestructurados obtenidos a partir de músculo de merluza previamente descongelada (*Merluccius capensis*), *surimi* de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), músculo de trucha arcoíris fresca (*Oncorhynchus mykiss*) y merluza fresca (*Merluccius merluccius*).

Para obtener los diferentes reestructurados se emplea la misma metodología descrita anteriormente.

Con el procedimiento descrito para los modelos de reestructurados elaborados por homogeneización en “cutter”, se realizaron los trabajos experimentales correspondientes a los Apartados V.1.3, V.2.1.1, V.2.1.2, V.3.1, V.3.2 y V.3.3 que componen la Memoria. Con la metodología de reestructuración con trozos de músculo se llevaron a cabo los trabajos experimentales recogidos en los apartados V.2.1.1, V.2.1.2, V.2.1.3, V.3.1 y V.3.2

La secuencia de adición de los ingredientes, independientemente del grado de picado del músculo fue: NaCl, caseinato sódico y finalmente la MTGasa disuelta en un 5% de H₂O (del peso total de la muestra). Tras la adición de cada componente, la mezcla fue homogenizada durante un minuto y finalmente la masa resultante es homogenizada durante 2 minutos más.

Las muestras obtenidas en ambos casos se colocaron en placas de Petri de 96mm x 16mm capacidad de 90±10 g de masa). Seguidamente se envasan a vacío, con el fin de compactar la masa, en bolsas (Cryovac BB4L, Barcelona) y se mantienen en cámara refrigerada a 5±1°C hasta el momento de llevar a cabo los análisis o en su caso hasta el momento de ser conservados en estado refrigerado o congelado.

Para elaborar los geles a partir de *surimi* de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), trozos atemperados del mismo fueron previamente cortados en trozos cúbicos de unos 30±10 g. Después homogenizados en una homogeneizadora picadora a vacío (Stephan UM5, Stephan u. Söhne GmbH & Co., Hameln, Alemania). El pH fue ajustando con Ca(OH)₂ a 6,5- 7,0 (aprox. 0,7%) y posteriormente se incorporó un 3.0% de NaCl y caseinato sódico al 1,5 %. La humedad se ajustó al 75% añadiendo el agua necesaria

con la enzima disuelta en ella. La enzima (MTGasa) se añade en dos concentraciones diferentes (0,5% y 1,0%) y además se hizo un lote control sin MTGasa añadida. Tras la adición de cada ingrediente la masa se homogeneizó durante 1 minuto.

La masa fue embutida en tripas Krehalon de 35 mm de diámetro (grupo Amcor Flexibles Hispania S.L., Barcelona, España). A continuación las muestras se mantuvieron a temperaturas de $5\pm 1^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ ó bien $30^{\circ}\text{C}/1\text{h}$ y se conservaron en cámara de refrigeración a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de realizar análisis o en su caso, hasta el momento de ser tratadas por alta presión.

Este procedimiento se llevó a cabo en el trabajo experimental recogido en el Apartado V.2.2.1 de la presente Memoria.

IV.2.3.- TRATAMIENTO DE ALTA PRESIÓN

Para aplicar altas presiones isostáticas, se empleó una unidad (ACB 665, GEC Alstom, Nantes, Francia), con regulación de la temperatura del medio de inmersión mediante un baño termostático conectado a un controlador automático de temperatura (modelo IA/2230 AC, INMASA, Barcelona, España). La presión utilizada fue de 300 MPa, debido a que se observó previamente que, a estas presiones, los cambios en el aspecto crudo de las muestras eran mínimos. La temperatura del medio de inmersión fue de $15\pm 5^{\circ}\text{C}$ y el tiempo de presurización de 30 minutos. En todos los casos, las muestras de *surimi* embutidas en tripas Krehalon, se envasaron en bolsas de vacío flexibles (Cryovac BB4L, Barcelona).

El tratamiento de altas presiones fue aplicado con posterioridad a un periodo de asentamiento a $30^{\circ}\text{C}/1\text{h}$ y previo al tratamiento térmico en su caso. Dicho tratamiento se aplicó en el trabajo experimental recogido en el Apartado V.2.2.1 de la presente Memoria.

IV.3.-DETERMINACIONES ANALÍTICAS

IV.3.1.- CONSTITUYENTES MAYORITARIOS Y pH

El análisis de la humedad y cenizas, tanto en el caso de las merluzas de ambas especies (*Merluccius capensis*, *Merluccius merluccius*), surimi (*Dosidicus gigas*) y trucha (*Oncorhynchis mykiss*) empleadas en los diferentes trabajos experimentales, se realizó de acuerdo a los métodos descritos por la AOAC (2005). El contenido en proteína se determinó mediante un analizador automático de nitrógeno (LECO, modelo FP-2000, LECO Corp., St. Joseph, MI, EE.UU), utilizando 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína.

El contenido en grasa total se determinó según el método de Bligh y Dyer,(1959) en las muestras del Apartado V.3.2.

El pH se determinó según la técnica descrita por Vyncke (1981) en un pHmetro ORION model 720 A (Instrumentación analítica S.L, Barcelona, España) sobre las muestras correspondientes a los trabajos experimentales recogidos en los Apartados V.2.1.3 y V.2.2.1 que componen la presente Memoria.

IV. 3.2.- ANÁLISIS FÍSICOS

IV.3.2.1.- Viscosidad aparente

Esta determinación se llevó a cabo a fin de conocer la calidad funcional de la proteína miofibrilar. Para su determinación se siguió el procedimiento descrito por Borderías y col. (1985). Se llevó a cabo en los trabajos experimentales correspondientes a los Apartados V.1.2, V.1.3, V.2.1.2, V.2.1.3, V.3.1 y V.3.1.

IV.3.2.2- Propiedades ligantes de agua

A. Capacidad de retención de agua

Para determinar la capacidad de retención de agua se siguió la metodología descrita por Moreno y col. (2008). Los resultados se expresan como gramos de agua que retiene la muestra por cada 100 g de agua de la muestra.

Se llevó a cabo en los trabajos experimentales correspondientes a los Apartados V.1.2, V.1.3, V.2.1.1, V.2.1.2, V.2.1.3, V.2.2.1, V.3.2 y V.3.3.

B. Pérdidas por cocción

Para determinar las pérdidas por cocción se siguió el método descrito por Sánchez-Alonso y col. (2007c) con algunas modificaciones que se detallan seguidamente. De cada muestra se pesaron aproximadamente 90g que se dispusieron en bolsas de plástico termorresistentes cuya parte inferior es cortada a modo de zig-zag para permitir que el agua exudada salga. Éstas son introducidas en posición horizontal en un horno (Rational Combi, modelo Master CM6, Barcelona) durante 10 min/90°C con vapor húmedo. Tras atemperar las muestras, la diferencia de pesada del reestructurado antes y después del tratamiento permite saber la cantidad de agua que libera la muestra.

La técnica se llevó a cabo en el trabajo experimental recogido en el Apartado V.3.1.

IV.3.2.3.- Pruebas mecánicas

Para realizar las determinaciones de textura se utilizó un Analizador de Textura TA-XT (Texture Technologies Corp., Sacrsdale, NY, USA). Se realizaron las siguientes determinaciones en función de las características de cada muestra:

A.- Análisis de Penetración

Consiste en penetrar una muestra hasta alcanzar su punto de ruptura y da idea de la calidad de un gel (Park, 2005).

Para llevarla a cabo, se tomaron probetas de 16mm de altura y 96 mm de diámetro las cuales fueron penetradas utilizando un vástago de 0,5 cm de diámetro con punta esférica. La célula de carga empleada es de 50 N y la velocidad de movimiento del cabezal de 0,2 mm/seg. Las muestras se penetran hasta alcanzar el punto de rotura. Se tomaron las medidas de fuerza a rotura (N), deformación a rotura (mm) y trabajo de penetración, que es el producto entre los dos y se expresa en g x cm.

Se llevó a cabo en los trabajos experimentales correspondientes a los Apartados V.1.2, V.1.3, V.2.1.1, V.2.1.2, V.2.2.1, V.3.1 y V.3.3 de la presente Memoria.

B.-Análisis de perfil de textura (TPA).

La técnica consiste en comprimir dos veces la muestra de forma axial un 40% (sin ruptura de la muestra) y en algunos casos un 80% (con ruptura de la muestra). Da idea del comportamiento mecánico en un símil de masticación.

Para realizarla se siguió el procedimiento descrito por Bourne (2002). Se emplearon probetas de 16 mm de diámetro y 16 mm de altura. Se utilizó una célula de carga de 50

N y se aplicó una velocidad de cabezal de 0,8 mm/seg. Los parámetros obtenidos son: Dureza (N) que se corresponde con el pico máximo de la primera compresión; Cohesividad que es la relación entre las áreas bajo la curva de la segunda y primera compresión; la Elasticidad (mm), se corresponde con los milímetros que recupera la muestra después de la primera compresión y finalmente, la Adhesividad (N/s) que se corresponde con el área de la curva negativa que se encuentra entre la primera y segunda compresión. La Masticabilidad puede obtenerse multiplicando Dureza (N)* Elasticidad (mm)* Cohesividad.

El análisis de perfil de textura se llevó a cabo en los trabajos experimentales correspondientes a los Apartados V.1.2, V.1.3, V.2.1.1, V.2.1.2, V.2.2.1, V.3.1 y V.3.3.

C.-Determinación de la Fuerza de ligazón

Este análisis se emplea sobre reestructurados elaborados a base de trozos pequeños de músculo unidos. Da idea del grado de unión o fuerza de ligazón entre dichas partículas que forman el reestructurado). La fuerza de ligazón o unión se define como la fuerza aplicada por unidad de área de sección, para separar (directa o indirectamente) las piezas ligadas del producto (Schmitdt y Trout, 1982; Field y col., 1984).

Para llevarla a cabo la técnica las probetas (16 mm de altura y 96 mm de diámetro) se colocan sobre un aplique en el que quedan perfectamente sujetas el cual, posee un anillo de 3,2 cm de diámetro. A continuación, se atraviesan con un vástago de punta esférica de 1,9 cm de diámetro Los parámetros determinados son: Fuerza de ligazón (N), que es definida como la fuerza aplicada por unidad de área de sección para separar (directa o indirectamente) las partículas ligadas; y la Elongación (mm), distancia transcurrida hasta el punto de ruptura.

Se llevó a cabo en los trabajos experimentales correspondientes a los Apartados V.2.1.1, V.2.1.2, V.2.1.3, V.3.1 y V.3.3.

IV.3.2.4.- Medida instrumental de color

La determinación instrumental de color se determinó usando una escala CIELab (Young y Whitte, 1985; Park, 1995) en un colorímetro (Chroma Meter, MINOLTA). Se determinaron la luminosidad (L^*), la tendencia al rojo (a^*) y la tendencia a tonos amarillos (b^*).

Se llevó a cabo en los trabajos experimentales correspondientes a los Apartados V.1.2, V.2.1.1, V.3.1 y V.3.2.

IV.3.3.- ANÁLISIS QUÍMICOS

IV.3.3.1.- Determinación del estado de la proteína

A.-Solubilidad de proteína en diferentes soluciones selectivas de rotura de enlaces

El objetivo de esta técnica es incidir selectivamente en la rotura de determinados enlaces empleando para ello diversas soluciones. Se siguió el procedimiento descrito por Jiang y col. (1989) con las modificaciones de Fernández-Martín y col. (2002). El procedimiento queda esquematizado en la Figura 1.

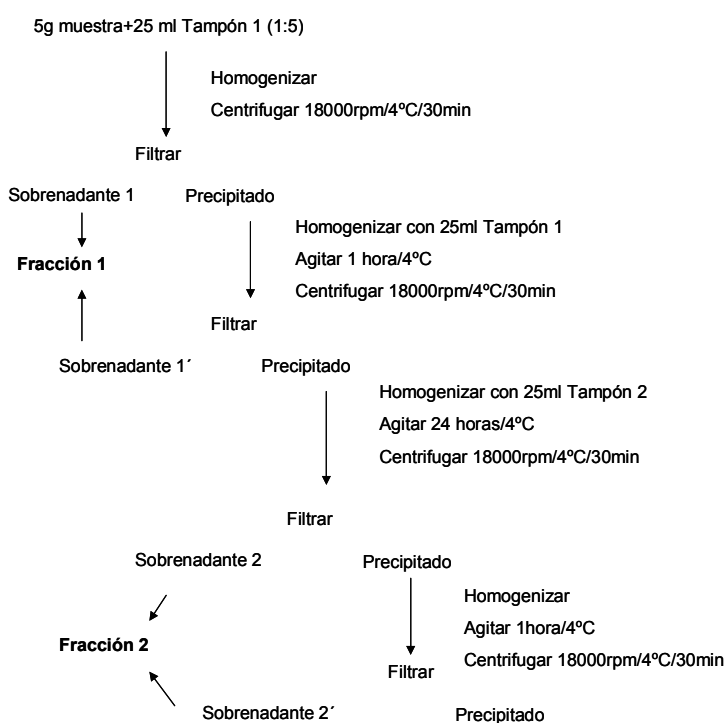


Figura 1: Procedimiento de extracción de proteínas en distintas soluciones selectivas.

La primera extracción se llevó a cabo en una solución al 6.0 % NaCl (Solución 1). El precipitado resultante es resuspendido en una solución al 8.0% Urea (Solución 2). La proteína soluble de las Fracciones 1 y 2, se determina por el método de Lowry (Lowry y col., 1951). En la Fracción 1 se encuentran las proteínas en estado nativo y otras unidas por fuerzas electrostáticas, mientras que la Fracción 2, está compuesta por agregados de proteínas unidas por enlaces hidrofóbicos y puentes de hidrógeno. En el

precipitado final quedarían los agregados de proteínas unidos por enlaces covalentes, disulfuro, y otras proteínas muy insolubles en su mayor parte colágeno (Kauzman, 1959).

Esta técnica se llevó a cabo en el trabajo experimental recogido en el Apartado V.1.3.

B.- Relación proteína soluble e insoluble

Para la determinación de la relación proteína soluble e insoluble de una muestra, se siguió la técnica descrita por Ironside y Love (1985). El fundamento de esta técnica es la separación de la proteína soluble en solución al 5% de NaCl de la proteína que se encuentra agregada. El contenido de proteína total se determinó mediante un analizador automático de nitrógeno (LECO, modelo FP-2000, LECO Corp., St. Joseph, MI, EE.UU), utilizando 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína.

Se llevó a cabo en los trabajos experimentales correspondientes a los Apartados V.2.2.1, V.3.2 y V.3.3.

IV.3.3.2.-Determinación actividad enzimática (MTGasa): Actividad residual de la MTGasa.

El procedimiento de extracción de la enzima se llevó a cabo según describe Lee y col. (1997). Una vez extraída la enzima del músculo de pescado o muestra en cuestión, la determinación de su actividad se determinó siguiendo el método colorimétrico del ácido hidroxámico descrito por Folk (1970). La actividad enzimática fue determinada en el trabajo experimental recogido en el Apartado V.2.1.2 en el cual queda detallado el procedimiento.

IV.3.3.3.- SDS-PAGE Electroforesis

La técnica consiste en tratar la muestra con una solución desnaturalizante preparada según describe Hames (1985). El análisis de electroforesis se llevó a cabo empleando un equipo PhastSystem (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden) usando geles de poliacrilamida de 12.5% (Pharmacia LKB Biotechnology AB).

Se utilizó como estándar de referencia un patrón comercial de alto peso molecular (Pharmacia LKB Biotechnology AB) que consta de: miosina (220 kDa), α_2 -macroglobulina (170 Kda), β -galactosidasa (116kDa), transferrina (76kDa) y glutámico dehidrogenasa (53 kDa).

Para densitometrar la banda de la cadena pesada de la miosina (MHC) se empleó el programa informático ID-Manager v. 2.0 (TDI S.A, Madrid, Spain).

Esta técnica se llevó a cabo en los trabajos experimentales correspondientes a los Apartados V.1.3, V.2.1.2, V.2.1.3, V.2.1.4 y V.2.2.1.

IV.3.3.4.- Análisis microbiológicos

Las determinaciones microbiológicas llevadas a cabo han sido:

A.-Recuento de los microorganismos aerobios viables totales a 30°C

Se realizó según la norma AFNOR NF V 08-051 (1999) con siembra en profundidad del medio Plate Count Agar (PCA) (Difco, Detroit, Michigan, EEUU) e incubación a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 72 ± 3 horas.

B.-Recuento de Enterobacterias

Se realizó según la norma AFNOR NF V 08-054 (1999) con siembra en profundidad y añadiendo doble capa de agar Cristal Violeta, Rojo Neutro y Sales Biliares con glucosa (VRBG) (Difco). Incubación a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.

Ambas determinaciones se llevaron a cabo en los trabajos experimentales recogidos en los Apartados V.2.1.3 y V.3.1.

IV.3.3.5.- Análisis sensorial

Se siguió el procedimiento descrito por Moreno y col., 2009a (en proceso de publicación).

El análisis sensorial se realizó dentro del trabajo experimental recogido en el Apartado V.2.1.3.

IV.3.3.6.- Microscopía electrónica de barrido (S.E.M.)

Para llevarla a cabo, las muestras son cortadas en pequeños cuadraditos, con un corte lo más limpio posible y fijadas con un mezcla 1:1 v/v de formaldehído (4%) y glutaraldehído (0.2%) en un búfer fosfato 0.1 M (pH 7.2). A continuación son fijadas en OsO_4 y desecadas hasta alcanzar su punto crítico empleando concentraciones crecientes de acetona. Tras este proceso, las muestras son recubiertas con una fina capa de una mezcla de oro/paladio (Balzer, SCD004) y colocadas en un porta adecuado que permita que puedan ser examinadas en el microscopio electrónico de barrido (Jeol, JSC

6400, Akishima, Tokio, Japan) a 20 kV. Tomándose las imágenes a los aumentos deseados.

Esta técnica está descrita y se llevó a cabo en los trabajos experimentales recogidos en los Apartados V.2.2.1, V.3.1 y V.3.3.

IV.3.3.7.- Determinación del Índice del TBA

Se llevó a cabo de acuerdo a la técnica descrita por Vyncke (1970) en el trabajo experimental recogido en el Apartado V.3.3.

Para el trabajo experimental recogido en el Apartado V.3.2 se empleó la modificación del método anterior descrito por Vyncke (1975) tal como queda reflejado en el apartado de Materiales y Métodos de dicho trabajo experimental.

IV.3.3.8.-Determinación Índice de peróxidos

Para determinarlo se empleó la metodología descrita por Shantha y Decker (1994).

Se determinó dentro del trabajo experimental recogido en al Apartado V.3.3 en cuyo apartado de Materiales y Métodos se detalla el procedimiento.

IV.3.3.9.-Determinación de antioxidantes: Astaxantina y Tocoferoles

Ambas determinaciones se hicieron siguiendo la metodología descrita por los métodos oficiales de la AOCS (1994).

Se determinó en el trabajo experimental recogido en el Apartado V.3.2 tal como queda recogido en el apartado de Materiales y Métodos de dicho apartado.

IV.3.3.10.- Western blott

Se siguió la metodología descrita por Barón y col. (2007).

Se llevó a cabo en el trabajo experimental recogido en el Apartado V.3.2 en el que se describe dicha técnica en la sección de Materiales y Métodos.

IV.3.3.11.- Determinación grupos carbonilos

Se procedió según describen Levine y col. (1990) y las modificaciones de Levine et al. (1994).

Se llevó a cabo en el trabajo experimental V.3.2 de la presente Memoria en el cual queda descrita la técnica.

IV.3.3.12.- Determinación del perfil lipídico.

Para llevar a cabo esta técnica, se procedió según el procedimiento descrito por Barón y col. (2007) siguiendo lo estipulado por los métodos oficiales de la AOCS (1998).

La técnica fue llevada a cabo en el trabajo experimental V.3.2 de la presente Memoria en cuyo apartado de Materiales y Métodos queda descrita.

IV.3.3.13.- Metodología de Superficie de Respuesta.

La Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas empleadas para modelar y analizar muestras en las que una variable puede tener influencia sobre otras. El objetivo de su empleo es optimizar una o varias de las variables a fin de encontrar unas condiciones óptimas de trabajo independientemente de cuál sea el campo de aplicación.

Los experimentos estaban basados en un diseño central rotatable compuesto (Cochran y Cox, 1957) que es un diseño factorial donde los factores o variables están codificados con al menos tres niveles (-1, 0, 1).

El hecho de ser rotatable indica que la varianza de la respuesta predicha en algún punto es función sólo de la distancia al centro y no de la dirección. La rotabilidad es importante dado que el objetivo último del diseño es optimizar un proceso y debe hacerse de forma lo más precisa posible.

De acuerdo con el diseño, cada variable estudiada se ensayó en cinco niveles diferentes. El experimento es llevado a cabo empleando 15 combinaciones diferentes de las tres variables.

Para calcular el error experimental y según las exigencias del modelo, se realizaron 6 réplicas del punto central (0,0 ,0), de tal forma que el número total de experimentos llevados a cabo es de 20. En la Tabla A.1 se muestran los niveles de las 20 formulaciones estudiadas que dan lugar a la composición de las muestras.

Tabla A.1: Niveles teóricos de las variables estudiadas en función del diseño experimental.

Muestra	Variable 1	Variable 2	Variable 3
1*	0	0	0
2*	0	0	0
3	1	1	-1
4	1	-1	1
5	1	-1	-1
6	0	-1,68	0
7	0	0	1,68
8	0	1,68	0
9	-1	1	1
10	1,68	0	0
11*	0	0	0
12*	0	0	0
13	-1	1	-1
14	-1,68	0	0
15	1	1	1
16	-1	-1	-1
17	-1	-1	1
18*	0	0	0
19*	0	0	0
20	0	0	-1,68

* Réplicas del punto central.

La respuesta de cada variable estudiada es ajustada por el modelo a una ecuación polinómica de segundo orden tal como se indica:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} b_{ij} x_i x_j$$

Donde y es la respuesta estimada, y b_0 , b_i , b_{ii} and b_{ij} son los parámetros estimados de la ecuación (constante: b_0 , parámetros estimados lineales: b_i , parámetros estimados cuadráticos: b_{ii} , términos de la interacción: b_{ij}), x_i and x_j son los niveles de los factores y k el número de factores analizados.

El grado de significación de los parámetros de la ecuación para cada respuesta se determina mediante un análisis de varianza.

Para cada parámetro estudiado, la varianza se divide en lineal, cuadrática, interacción y en un componente de error con el fin de comprobar que la ecuación polinómica de

segundo orden es adecuada para predecir el efecto de la combinación de las variables sobre la respuesta a los distintos niveles ensayados.

El grado de significación de los parámetros de la ecuación para cada respuesta se calculó una prueba F empleando el programa estadístico Statgraphics plus 2.1, STSC Inc., Rockville, MD. El mínimo nivel de significación aceptado fue $p \leq 0.05$.

Las representaciones tridimensionales muestran la interrelación entre dos variables dadas sobre una variable concreta manteniendo la tercera variable en su punto medio.

El diseño experimental que se detalla a continuación fue empleado en los trabajos que se recogen en los apartados **V.1.2** y **V.2.1.1** de la presente Memoria

V.- TRABAJO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

**BLOQUE I: EMPLEO DE ALGINATO SÓDICO EN LA ELABORACIÓN DE
MODELOS DE REESTRUCTURADOS BASADOS EN MÚSCULO DE
MERLUZA (*Merluccius capensis*).**

V.1.1.- ESTUDIO DE LOS DIFERENTES PROCEDIMIENTOS DE INCORPORACIÓN DE FUENTES DE CALCIO.

Tras la revisión bibliográfica llevada a cabo, se estudió la forma más apropiada en la que la sal cálcica podría ser añadida al sistema músculo de pescado-alginato sódico a fin de obtener un reestructurado adecuado.

Se hicieron una serie de pruebas preliminares sobre el comportamiento del alginato sódico junto con diferentes fuentes de calcio en un sistema de músculo picado de merluza, estudiando la incorporación de diversas fuentes de calcio y su forma de incorporación. Las fuentes de calcio que se estudiaron fueron: cloruro cálcico, lactato cálcico, caseinato cálcico, citrato cálcico, carbonato cálcico, fosfato cálcico y acetato cálcico. Las sales de calcio se incorporaron de las siguientes maneras:

1. Adición directa en polvo.
2. Inmersión en solución de sal cálcica.
3. Pulverizado en solución acuosa sobre la superficie del sistema músculo-alginato.

En la Figura 1 se recoge la metodología y las formas de incorporación de las sales cálcicas.

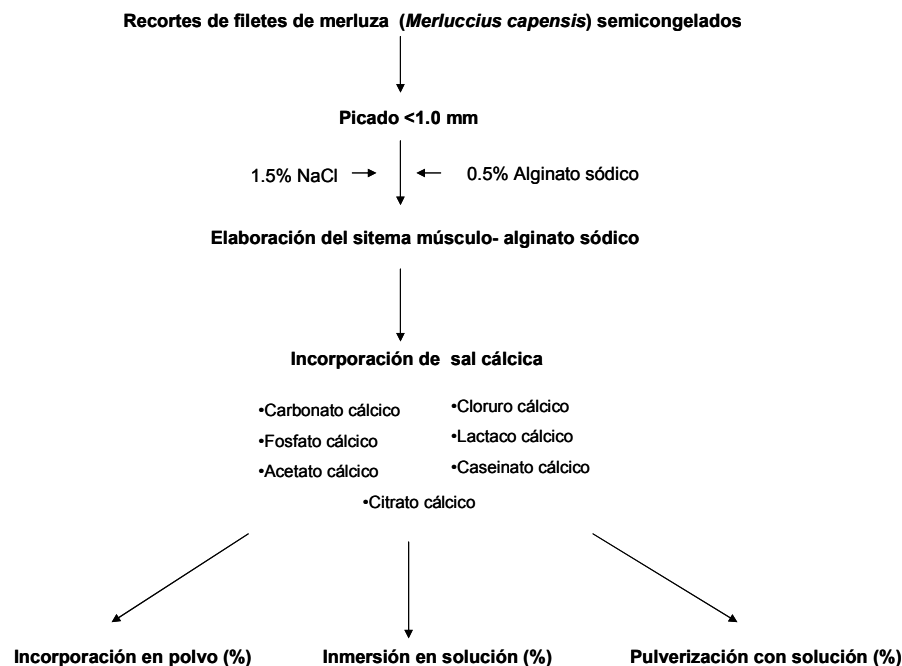


Figura 1: Procedimientos de incorporación de sales cálcicas al sistema músculo-alginato.

Dependiendo de la forma de incorporación, los resultados obtenidos fueron muy diferentes:

1. Adición directa de la sal cálcica en forma de polvo.

Este sistema es el más empleado por la mayoría de los autores (Ahmed y col, 1983, Rocker y col, 1983; Montero y Pérez-Mateos, 2002, Suklim y col., 2004). Consiste en añadir la sal cálcica en un rango de concentraciones de 0.2 y 0.5% directamente en polvo al sistema músculo-alginato sódico.

Se obtuvieron muy buenos resultados. La forma de incorporación no presentó dificultad tecnológica alguna. Los reestructurados obtenidos representaban buen aspecto y aceptables propiedades sensoriales.

2. Inmersión del sistema músculo-alginato sódico en baño de solución de sal cálcica.

Se hicieron soluciones de las diferentes fuentes de calcio entre 0,5 y 7,0 % en las que se sumergió el sistema músculo-alginato sódico. La temperatura del baño a la que se llevaron a cabo las pruebas fueron $10^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Las muestras se mantuvieron sumergidas durante 30 min., en agitación constante para evitar la precipitación de la sal en el fondo del baño.

Cuando el sistema músculo-alginato sódico se introducía en el baño de sal cálcica, se deshacía tanto en agitación como sin ella. Por este motivo, el proceso fue descartado pese a que se tenía información sobre la elaboración de un producto análogo de cefalópodo empleando esta metodología (Montero y col., 1994).

3. Pulverización de una solución acuosa de la sal cálcica sobre la superficie del sistema músculo-alginato.

El procedimiento se basó en pulverizar la superficie del sistema músculo-alginato sódico con una solución de 0.5-7.0% de sal cálcica, determinándose la cantidad aproximada de solución que se pulverizaba cada vez. Este método había sido estudiado para formar películas con gran variedad de aplicaciones (Cathell y Schauer, 2007) aunque por lo general no se ha empleado en alimentos.

Los resultados obtenidos no fueron los adecuados porque el calcio quedaba en la superficie cubriéndola de una capa blanca y no se consiguió la gelificación del sistema músculo-alginato.

Tras analizar los resultados de las experiencias anteriores, se llegó a la conclusión de que la adición de las sales cálcicas en solución, ya fuese por inmersión en baño o por pulverización no daba resultados adecuados, además de complicar considerablemente el proceso tecnológico.

La incorporación de la sal cálcica en forma de polvo, directamente al sistema, dio buenos resultados, por lo que se decidió optar por este método de adición para los próximos trabajos experimentales.

Por otra parte, las fuentes de calcio que se mostraron más adecuadas con este tipo de incorporación fueron lactato cálcico, caseinato cálcico y cloruro cálcico dado que los reestructurados a los que dieron lugar poseían buenas propiedades físicas y sensoriales.

**V.1.2.- APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE
RESPUESTA PARA ESTUDIAR LOS EFECTOS DE DIFERENTES FUENTES
DE CALCIO EN UN SISTEMA MÚSCULO DE PESCADO-ALGINATO
SÓDICO.**

“Application of Response Surface Methodology to study the effect of different calcium sources in restructured fish muscle/alginate system”.

Helena M Moreno, José Carballo, A. Javier Borderías.

Enviado a Food Science and Technology International (Marzo, 2009)

Application of Response Surface Methodology to study the effect of different calcium sources in fish muscle - alginate restructured fish products

H. M. Moreno, J. Carballo and A. J. Borderías*

***Corresponding autor. Tel.:+3491 5492300; Fax; +3491 5493627. E-mail address: jborderias@if.csic.es**

Departamento de Ciencia y Tecnología de la Carne y Productos Cárnicos y del Pescado y Productos de la Pesca. Instituto del frío (CSIC), José Antonio Nováis, 10, 28040 Madrid, Spain.

Abstract

Response Surface Methodology (RSM) was used to determine the contribution of different calcium sources to a restructured fish muscle. Sodium alginate needs the presence of calcium ions to gelify. For these reason, the contribution of the calcium source in a fish mince muscle added by sodium alginate, make it possible to gelify giving as result a restructured fish product. The three different calcium sources considered were Calcium Chloride (CC), Calcium Caseinate (CCa) and Calcium lactate (CLa). Various physical properties were analyzed, including mechanical properties, colour and cooking loss.

The calcium source that most alters the system is CC. A combination of CC and sodium alginate weakened mechanical properties as reflected by the negative linear contribution of sodium alginate. Moreover, CC on its own increased lightness and cooking loss. The

mechanical properties of restructured fish muscle elaborated were enhanced by using CCa and sodium alginate, as reflected by the negative linear contribution of sodium alginate. Also, CCa increased cooking loss. The role of CLa combined with sodium alginate was not so pronounced in the system discussed here.

Keywords: Sodium Alginate, Calcium Chloride, Calcium Caseinate, Calcium Lactate, restructured fish product.

INTRODUCTION

The development of restructuring technology has made it possible to produce value-added fish products from low-commercial-value cuts and to control product characteristics such as shape, colour, texture, fat and moisture content (Raharjo et al., 1994; Raharjo et al., 1995). Consumers today are interested in “fresh products”. This demand has prompted attempts to produce restructured products based on chopped or minced raw fish muscle, for sale chilled and with eating characteristics similar to cuts from intact muscles. The mechanical properties of such restructured products are decisive from the standpoint of consumer choice and acceptability (Jena and Bhattacharta, 2003), and therefore it is important to consider the contribution of the ingredients or additives that are used for that purpose. Also, cold-set products are more versatile in that they can be processed in many ways, for instance as marinated products, sushi, carpaccio, or as ready-to-cook fish fillet analogs. Although alginates are widely used in food systems as stabilizers and to modify the rheology of food sols, one of their more useful properties is gelation (Means and Schmidt, 1986). Alginates are polysaccharides extracted from brown seaweed (*Phaeophyce ssp*, *Laminariae ssp*) and

are used mainly in the form of monovalent salt as sodium alginate. Alginate differs from other gel forming hydrocolloids in that it forms chemically rather than thermally induced gels. Alginate gels are formed by intermolecular association of polyvalent cations (except magnesium) with dimerically associated guluronic acid block regions of the polysaccharide molecule (Morris, 1980). Calcium ions interact with alginate better than other polyvalent cations and are also the most commonly used source of cations in food systems. Their gelation mechanism induces changes in the cross-link of the gel and alters the mechanical properties of gel depending on the concentration of either sodium alginate or calcium salt (Stokke et al., 2000). The alginate gel is formed at the interface where dispersions of alginate and calcium ions come into contact with each other; gelation depends on the diffusion of calcium ions through the gel membrane, a process that can take anything from a few seconds to several hours. The strengthening of the gel depends on the gradual release of calcium ion in alginate dispersion. Alginate is different from other gel forming hydrocolloids in that it forms thermo-stable gels without thermal treatment. Alginate gels are formed by intermolecular association of polyvalent cations (chiefly calcium) with dimerically associated guluronic acid block regions of the polysaccharide molecule (Means and Schmidt, 1986). It is this gel that interacts with myofibrillar proteins. Shand et al. (1993) and Montero et al. (2000) reported that these are mainly electrostatic interactions, between the anionic groups on the alginate and the positively charged groups on the protein. Calcium ions pull the alginate molecules together by ionic interactions, producing hydrogen bonding. The proportion of sodium alginate, the calcium ion source, pH, temperature, presence of other components and the reaction time are all variables used to achieve different kinds of texture (Tolstoguzov, 1986). It is also important to minimize the calcium source in

order to avoid sensory problems as calcium ions can produce bitterness and astringency.

The calcium-alginate gel may interact with myofibrillar proteins. Shand et al. (1993) and Montero et al. (2000) reported that these interactions are mainly electrostatic, between the anionic groups on the alginate and the positively charged groups on the protein. But other authors such as Moreno et al., (2008) have suggested that the alginate establishes its own gel-net, which somehow enhances the gelation of the minced muscle, although it is not clear whether it establishes bonds with proteins. Other authors similarly reported that the gel that is produced holds food particles together in a thermostable way, meaning that the restructures retain their structural integrity despite subsequent heating (Suklim et al., 2004; Roopa and Bhattacharya, 2008). Several researches have investigated the reaction of alginate/calcium sources with a view to modifying the texture of formed meat products (Means and Schmidt, 1986; Roopa and Bhattacharya, 2008), but we have found very few results relating to the texture of minced fish products (Montero et al. 2000; Pérez-Mateos and Montero, 2000). Also, there is little information about the molecular mechanism whereby the functionality of myofibrillar proteins is improved by conjugation with alginates (Urdangarin et al., 2004).

The objective of this study was to use Response Surface Methodology to evaluate the effect of three different calcium sources (calcium chloride, calcium caseinate and calcium lactate) on physical properties of gels formed at low temperature from fish minced muscle with different concentrations of sodium alginate added, with a view to making raw fish muscle restructured products as bases for raw analog products.

MATERIALS AND METHODS

Raw materials and additives

Raw material was fillets of hake (*Merluccius capensis*) caught two or three months earlier and frozen stored on board (-20°C).

Sodium chloride, a calcium source (calcium chloride, calcium caseinate or calcium lactate) (Panreac Quimica, S.A.; Barcelona, Spain) and sodium alginate (Degussa Texturant Systems España, S.A.; Barcelona, Spain) were used to prepare the restructured product. Proportions of ingredients of different samples are shown in Table 1.

Experimental design

Response Surface Methodology (RSM) was used to study the simultaneous effect of the three independent variables (Sodium alginate, calcium source and NaCl proportions) on restructured fish product properties. The experiment was based on a central composite rotatable design. Five levels of each variable were chosen following the principles of that design (see Table 1). The factors studied were: sodium alginate (0.05-0.5%), sodium chloride (0-3 %) and three calcium sources (calcium chloride, calcium caseinate and calcium lactate)(0.1-1.0 %). For each experiment, three in total (one for each calcium source), 20 combinations of three variables were performed following the design. Error assessment was based on six replications of the treatment in the central conditions as proposed in the design (Cochran and Cox, 1957). For each response, a second-order polynomial equation was fitted as follows:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} b_{ij} x_i x_j$$

Where y is the the estimated response, and b_0 , b_i , b_{ii} , b_{ij} are the equation parameter estimates (constant: b_0 , parameter estimates for linear terms: b_i , for quadratic terms: b_{ii} , for interaction term: b_{ij}), x_i, x_j are the levels of the factors and k the numbers of factors. The significance of the equation parameters for each response variable was assessed by F testing using Statgrafics plus 2.1, STSC Inc., Rockville, MD. Minimum level of significance was set for $p \leq 0.05$. Three-dimensional representations were drawn to show interrelationships between two given independent variables on a given response, by imposing a constant value equal to the mid-level of the third variable .

Sample preparation

For each of the three experiments, the hake was minced and then mixed with the other components: NaCl, Sodium alginate and the Calcium source (Calcium Chloride, Caseinate and Lactate), in a refrigerated (4-8 °C) vacuum homogenizer (Stephan UM5, Stephan u . Söhne GMBH & Co., Hameln, Germany). The mixture was homogenized for 1 min with each ingredient. At the end, the whole mixture was homogenized for 2 min more. The resulting dough was vacuum-wrapped in a petri-plate (depth 16 mm and diameter 96 mm). The Petri-plates were kept in a cold room at 5 °C overnight.

Proximate Analysis

Moisture, fat content and ashes of the fish muscle were determined following AOAC (2000) in triplicate. Crude protein contents were measured in quadruplicate by a LECO FP-2000 Nitrogen Determinator (Leco Corporation, St Joseph, MI, USA).

Viscosity measurement

Apparent viscosity of muscle homogenate was measured according to Borderías et al. (1985) as an indirect means of determining the protein quality of fish muscle. Measurements were performed at 12 rpm with a RV4 spindle, using a Brookfield model DV-III rheometer (Stoughton, MA) and rheocalc V 1.2 software system. Measurements were performed in triplicate and results were expressed in centipoises (cP).

Mechanical properties

Puncture Tests (Kim et al., 2004) were performed on samples tempered at room temperature (20-22°C). Sample dimensions were depth 16 mm and diameter 96 mm. Each sample was penetrated four times up to breaking point using a 5 mm diameter cylindrical stainless steel plunger attached to a 50 N cell connected to the crosshead on a TA-XT2 Texture Analyzer (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY, USA). Force-deformation curves were obtained at 0.2 mm/s crosshead speed. The penetration force (PF) is defined as the force (N) required to reach breaking point and the breaking deformation (BD) as the deformation (mm) at which the PF is reached. Work of penetration (WP) is defined as $PB \times BD$. Determinations were performed in quadruplicate.

Texture Profile Analysis was performed using a TA-XT2 Texture Analyzer as described by Bourne (2002). Seven probes (diam = 19.0 mm; height = 12 mm) of raw samples were axially compressed to 40% of their original height without reaching breaking point. Force-time deformation curves were derived with a 50N load cell applied at a crosshead speed of 0.8 mm/s. Attributes were calculated as follows: hardness (Hd) = peak force (N) required for the first compression; Cohesiveness (Ch) = ratio of active work done under the second compression curve to that done under the first compression

curve (dimensionless); springiness (Sp) = distance (mm) the sample recovers after the first compression; chewiness (Cw) = $Hd \times Ch \times Sp$ (N x mm). Measurements were performed at room temperature (20-22 °C).

Colour measurement

Gel colour was determined on a HunterLab Mini Scan MS/S-4000S (Hunter Associated Laboratory Inc., Reston, VA) (D65/10°) using the CIE Lab values, originally defined by the Commission Internationale de l'Eclairage: lightness, L^* ; redness, a^* and yellowness, b^* of samples were evaluated on the restructured raw cores (diam = 19.0 mm; height = 12 mm) as described by Park (1995). Six determinations were performed for each formulation.

Cooking Loss

To determine the cooking loss in order to know the behaviour in a prototype product during conventional cooking. Cooking loss was determined as reported Sánchez-Alonso et al., (2007) with some modifications. The raw samples were placed weighed and vacuum wrapped. The bags with the samples inside were heated in a bath at 90°C/30min. When samples reached room temperature the exudate was evacuated and the samples measured again. Water loss due to the cooking was defined as the difference in weight before and after cooking.

RESULTS AND DISCUSSION

Proximate and functional analysis of fish muscle

The major constituents of the raw fish were: moisture 80.6%±0.6, protein 17.1%±0.91, fat 1.1%±0.1 and ash 1.1%±0.3.

The apparent viscosity determined in muscle homogenate was 7519 cP. This correlates well with the functional quality of fish muscle protein (Borderías et al., 1985; Kim and Park, 2000). On the basis of these viscosity data, the protein quality of this frozen fish muscle may be considered good (Barroso et al., 1998).

Effect of different calcium sources

Table 2 shows the results of the analysis of variance of the three regression models with each calcium source. Note the significant contribution of the different calcium sources to the parameters in each model of restructured fish muscle. The effects of each calcium source are explained separately below, indicating the contribution of the significant variable to each parameter.

Effect of calcium chloride

Analysis of variance indicated that in the case of regression models for colour measurement, only L* and b* values were significant (Table 2). Increasing the amount of NaCl produced an inverse linear effect ($p < 0.001$) on L*, and increasing the amount of sodium chloride produced lower lightness values. Moreover, the amount of calcium chloride produced a positive linear effect ($p < 0.001$), i.e. a greater amount of calcium chloride produced a higher lightness value (Table 3). NaCl produced quadratic effects, so that L* increased considerably at higher concentrations. In this connection Montero and Pérez-Mateos (2000) reported that the addition of calcium generally promotes

lightness in gels of minced Blue whiting (*Micromesistius poutassou* Risso) irrespective of the hydrocolloid used; that is consistent with the results shown in Table 3, where there are no interactions between sodium alginate and calcium chloride. Trout (1989) reported that when sodium alginate was used without a calcium source it increased the decolouration in a restructured meat product, but when added along with a calcium source it protected against decolouration. Because hake muscle is a white fish, this is not readily apparent, but it is an important point for muscles of other colours like salmon or trout. Similarly, in the case of parameter b^* NaCl produced a negative linear effect ($p < 0.001$), and NaCl and CC respectively produced negative and positive quadratic effects. Addition of sodium alginate did not contribute to the colour parameters ($p > 0.05$) (Table 3).

In analysis of variance, in the regression models for TPA parameters only cohesiveness was significant (Table 2), while the models for the other TPA parameters were not significant ($p > 0.05$). This indicates that no significant contribution was found within the range of ingredients studied. Alginate concentration produced a negative linear effect on cohesiveness (Figure 1a); Roopa and Bhattacharya (2008) likewise reached the general conclusion that highly cohesive gels were achieved with low concentrations of alginate and calcium chloride. There are interactions between the different components of the model (Table 3) which make it quite difficult to determine how each ingredient contributes to cohesiveness.

NaCl concentration produced a positive linear effect on the penetration force of samples (Table 3 and Figure 1b), meaning that a higher NaCl concentration enhanced the penetration force. This could be due to the ability of NaCl to enhance protein gelation owing to a lack of interaction between NaCl and SA (Table 3). Increasing sodium alginate concentration reduced the penetration force at low concentrations (0.05- 0.14%)

but increased it at higher concentrations (0.4-0.5%). In this connection, in a study of various hydrocolloids carried out by Pérez-Mateos and Montero (2000), the authors reported that the addition of high concentrations of sodium alginate (between 0.5 and 4%) and the attendant addition of water to homogenize the moisture, protein is diluted, what interferes with gelation of the myofibrillar protein. Clarke et al. (1988) found similar results in a meat muscle system and reported that when high concentrations of sodium alginate were added, the pH increased and that this hindered the diffusion of calcium ions through the alginate's guluronic acid units, thus hampering progressive gelation.

CC concentration was the only component that affected cooking loss in this model ($p < 0.001$) (Table 3) positively, meaning that with increasing concentrations there was increasing drip (Figure 1c). Clarke et al. (1988) also reported the same phenomenon. However, Montero et al. (2000) reported an increase of WHC when CaCl_2 was added in concentrations higher than the ones used in the present work (0.5%). In our model, we detected no significant influence of sodium alginate concentration.

Effect of calcium caseinate

Table 4 shows the regression model fitted for parameters from Calcium caseinate samples. The variance analysis indicated that in the case of the regression models for colour measurement only parameters L^* and b^* were significant (Table 4). The addition of NaCl produced an inverse linear effect ($p < 0.001$) on L^* , as above in the study of addition of CC, so that L^* decreased when CC increased; on the other hand, increasing the amount of sodium alginate produced a positive linear effect ($p < 0.001$). It is interesting to note that the contribution of sodium alginate to lightness was different depending on the type of calcium source, probably because the different types of bond

that formed created different textures in which the light was reflected in different ways. Montero et al. (2000) reported that the divalent cation (Ca^{2+}) correlates well with the increase in lightness (L^*). The same was true in the present work in the case of CC, but in that of CCa no statistical differences was found. Yellowness was determined by the positive linear contribution of sodium alginate concentration and the negative linear contribution of NaCl concentration (Table 4).

Analysis of variance indicated that in the case of the regression models for TPA parameters only hardness was significant (Table 2). Increasing the amount of sodium alginate produced an inverse linear effect ($p < 0.001$) on hardness within the limits of the study (Table 1). On the other hand when NaCl and SA were added together, the interaction between them on hardness was positive (Table 4). This agrees with Trout (1989) reporting on restructured beef steaks. However, larger amounts of CCa increased the hardness of restructurates (Figure 2a).

The contribution to cooking loss (Table 4) was similar to that found in the calcium chloride model (Table 3). Increasing the concentration of CCa increased the cooking loss (Figure 2b). In the present model sodium alginate presented a positive quadratic contribution, meaning that cooking loss increased when large amounts of sodium alginate (0.4-0.5%) were added. Some authors have reported that the use of calcium alginate in chicken patties can reduce cook loss (Trout, 1989). Then others have found no differences or increases in cook loss (Means and Schmidt, 1986; Means, 1987). Therefore, as Clark et al. (1989) propose, detailed studies of the relationship between the algin/calcium gel matrix and the myofibrillar proteins in structured products may help us to understand why cook yield is enhanced in some products but not in others.

Effect of calcium lactate

According to the analysis of variance for the regression model shown in Table 2, only b^* and cohesiveness were significant. As in all the other models, NaCl presented a negative linear effect ($p < 0.001$) on b^* , meaning that yellowness increased when its concentration decreased (Table 5). However, negative interactions were detected between NaCl and CLa, indicating that the effects of each of them were influenced by the effects of the others. The concentration of calcium lactate was not significant ($p > 0.005$) with respect to colour.

Cohesiveness was also significant in this model, as in the CC model, but in this case only the contribution of NaCl was statistically significant, presenting a positive linear contribution but a negative quadratic contribution, so that cohesiveness decreased at high concentrations of NaCl (2.4-3 %) (Figure 3). Neither sodium alginate nor calcium lactate presented any contribution to cohesiveness (Table 5) in the present work, although the use of CLa with alginate in meat myosystems has been reported to increase binding force and reduce cooking loss (Raharjo et al., 1994; Raharjo et al., 1995; Ensor, 1989).

CONCLUSIONS

The results of the present study show that within the experimental range, addition of sodium alginate and the three different calcium sources produced acceptable restructured fish muscle, the choice of additive depending on what properties are desired.

CC added to sodium alginate/fish muscle systems modifies the mechanical properties of the restructure more than any of the other calcium sources studied, Increasing

concentrations of CC increased lightness and cooking loss. CC by itself did not affect mechanical properties but did influence them through interactions with NaCl.

Addition of CCa increased hardness and cooking loss, and also interacted to some extent with NaCl, thus influencing the latter's effect on the lightness.

The addition of CLa did not contribute to any parameter, but it did interact with NaCl to influence the effect on yellowness.

The effect produced by the concentration of sodium alginate was dependent on the calcium source. When added along with CC at low concentrations (< 0.14%), it weakened mechanical properties; while at higher concentrations (>0.4%) it increased the force of penetration. When added along with CCa, it increased L* and b* and reduced hardness. When added with CLa, no effect was detected. Cooking loss was not affected by the addition of sodium alginate in any of the experimental systems.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas in the form of a Predoctoral Scholarship under program I3P-2004.

REFERENCES

- AOAC. (2000). *Official methods of analysis. 17th edn*, Association of Official Analytical Chemistry, Maryland, USA.
- Barroso M., Careche M. and Borderías, A.J. (1998). Quality control of frozen fish using rheological techniques. *Trends in Food Science & Technology* **9** (6): 223-229.

- Borderías A..J., Jiménez-Colmenero F. and Tejada, M. (1985). Parameters Affecting Viscosity as a Quality-Control for Frozen Fish. *Marine Fisheries Review* **47** (4): 43-45.
- Bourne M.C. (2002). *Food Texture and Viscosity. Concept and Measurement. 2nd edition* edn, Inst Food Technologists, Chicago, pp. 107-187.
- Clarke A.D., Sofos J.N. and Schmidt G.R. (1988). Effect of Algin Calcium, Ph and Muscle Proteins on Gelation and Microstructure of Gels and Structured Beef. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **21**(1): 46-53.
- Cochran W.G. and Cox G.M. (1957). *Experimental Desings. 2nd edn*, Wiley International, New York.
- Ensor D.(1989). Quality characteristics of restructured turkey meat with variable alginate calcium-lactate ratios. *Journal of Food Science* **54** (3): 558-565.
- Jena R. and Bhattacharya S. (2003). Viscoelastic cahracyerization of rice gel. *Journal of Texture Studies* **34**: 349-360.
- Kim B. and Park J.W. (2000). Rheology and texture properties of surimi gels. In: *Surimi and surimi sea food*. J.W. Park and M. Dekker (Eds), Inc., New York.
- Kim B.Y., Park J. and Yoon W. (2004). Rheology and texture properties of surimi gels. *In surimi and surimi seafood*. Ed. By J. Park, CRC Press, Boca Raton, FL
- Means W.J. (1987). Binding, sensory and storage properties of algin calcium structured beef steaks. *Journal of food science* **52** (2): 252-257.
- Means W.J. and Schmidt G.R. (1986). Algin Calcium Gel as a Raw and Cooked Binder in Structured Beef Steaks. *Journal of Food Science* **51** (1): 60-65.
- Montero P., Hurtado J.L. and Pérez-Mateos M. (2000). Microstructural behaviour and gelling characteristics of myosystem protein gels interacting with hydrocolloids. *Food Hydrocolloids* **14** (5): 455-461.

- Moreno H.M., Carballo J. and Borderías A.J. (2008). Influence of Alginate and Microbial Transglutaminase as binding ingredients on restructured fish muscle processed at low temperature. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **88**: 1529-1536.
- Morris E.R. (1980). Competitive-inhibition of interchain interactions in polysaccharide systems. *Journal of molecular biology* **138** (2): 363-372).
- Park J.W. (1995). Surimi Gel Colors as Affected by Moisture-Content and Physical Conditions. *Journal of Food Science* **60** (1): 15-18.
- Pérez-Mateos M. and Montero P. (2000). Contribution of hydrocolloids to gelling properties of blue whiting muscle. *European Food Research Technology* **210** : 383-390.
- Raharjo S., Dexter D.R., Worfel R.C., Sofos J.N., Solomon M.B., Shults G.W. and Schmidt G.R. (1994). Restructuring Veal Steaks with Salt. *Journal of Food Science* **59** (3): 471-473.
- Raharjo S., Dexter D.R., Worfel R.C., Sofos J.N., Solomon M.B., Shults G.W. and Schmidt G.R. (1995). Quality Characteristics of Restructured Beef Steaks Manufactured by various Techniques. *Journal of Food Science* **60** (1): 68-71.
- Roland L.M., Seideman S.C., Donnelly L.S. and Quenzer N.M. (1981). Physical and Sensory Properties of Chicken Patties made with Varying Proportions of White and Dark Spent Fowl Muscle. *Journal of Food Science* **46** (3): 834-837.
- Roopa B.S. and Bhattacharya S. (2008). Alginate gels: I. Characterization of textural attributes. *Journal of Food Engineering* **85** (1): 123-131.
- Sánchez-Alonso I., Hají-Maleki R. and Borderías A.J. (2007). Wheat fiber as a functional ingredient in restructured fish product. *Food Chemistry* **100** (3): 1037-1043.

- Shand P.J., Sofos J.N. and Schmidt G.R. (1993). Properties of Algin Calcium and Salt Phosphate Structured Beef Rolls with Added Gums. *Journal of Food Science* **58** (6): 1224-1230.
- Stokke B.T., Draget K.I., Smidsrod O., Yuguchi Y., Urakawa H. and Kajiwara K. (2000). Small-angle scattering and rheological characterisation of alginate gel. *Macromolecules* **33** (1): 1853-1863.
- Suklim K., Flick G.J., Marcy J.E., Eigel W.N., Haugh C.G. and Granata, L.A. (2004). Effect of cold-set binders: Alginates and microbial transglutaminase on the physical properties of restructured scallops. *Journal of Texture Studies* **35** (6): 634-642.
- Tolstoguzov V.B. (1986). Functional properties of protein-polysaccharide mixture. In Functional properties of food macromolecules. J.R. Michell & D.A. Ledward. (Eds.). *Elsevier Applied Science Publishers Ltd.* pp. 85-415.
- Trout R.G. (1989). The effect of Calcium carbonate and sodium alginate on the color and bind strength of restructured beef steaks. *Meat Science* **25**: 163-175.
- Urdangarin M., Shigeru K., Ryo S. and Hiroki, S. (2004). Improved solubility and stability of carp myosin by conjugation with alginate oligosaccharide. *Fisheries Science* **70**: 896-902.

Table 1: Levels of variables established according to the central composite rotatable desing

Sample	NaCl(%)	Sodium Alginate (%)	Calcium source* (%)
1	1.50	0.28	0.46
2	1.50	0.28	0.46
3	2.39	0.41	0.14
4	2.39	0.14	0.78
5	2.39	0.14	0.14
6	1.50	0.05	0.46
7	1.50	0.28	1.00
8	1.50	0.50	0.46
9	0.61	0.41	0.78
10	3.00	0.28	0.46
11	1.50	0.28	0.46
12	1.50	0.28	0.46
13	0.61	0.41	0.14
14	0.00	0.28	0.46
15	2.39	0.41	0.78
16	0.61	0.14	0.14
17	0.61	0.14	0.78
18	1.50	0.28	0.46
19	1.50	0.28	0.46
20	1.50	0.28	0.10

* Each sample has been estuded by separate

Table 2: Analysis of variance of regression model from NaCl, Sodium alginate and Calcium source.

Parameter	Calcium Chloride		Calcium Caseinate		Calcium Lactate	
	Model ^a	R ^{2a}	Model ^a	R ^{2a}	Model ^a	R ^{2a}
Color Measurement						
L*	***	0.00	***	0.00	NS	0.19
a*	NS	0.14	NS	0.22	NS	0.25
b*	*	0.01	*	0.01	*	0.01
Texture Profyle Analysis						
Hardness	NS	0.43	*	0.02	NS	0.42
Springeness	NS	0.20	NS	0.68	NS	0.34
Cohesiveness	**	0.25	NS	0.52	*	0.03
Chewiness	NS	0.03	NS	0.07	NS	0.28
Cooking loss	**	0.00	*	0.02	NS	0.45
Puncture Test						
Breaking Force	**	0.00	NS	0.13	NS	0.73
Breaking Deformation	NS	0.19	NS	0.26	NS	0.23

*** significant at P<0,001; **significant at P<0,01; NS: not significant.

^a Fitted for degrees of freedom.

Table 3: Regression models fitted for parameters from Calcium Chloride samples

Term	L*			b*			Cohesiveness			Breaking Force			Cooking Loss		
	RC*	SE*	SL*	RC*	SE*	SL*	RC*	SE*	SL*	RC*	SE*	SL*	RC	SE	SL
Constant	60.758	0.477	0.000	6.2302	0.1738	0	0.552	0.005	0.000	1.744	0.134	0.000	5.677	1.048	0.000
Linear															
SA	-0.234	0.633	0.476	0.190	0.231	0.130	-0.010	0.007	0.016	-0.023	0.178	0.000	-0.232	1.390	0.745
NaCl	-1.853	0.633	0.000	-0.576	0.231	0.001	0.011	0.007	0.062	0.453	0.178	0.003	-0.670	1.390	0.357
CC	3.057	0.633	0.000	0.002	0.231	0.986	0.001	0.007	0.702	-0.34	0.178	0.799	4.491	1.390	0.000
Quadratic															
SA ²	0.291	0.616	0.368	-0.039	0.225	0.733	0.000	0.007	0.934	0.347	0.173	0.002	-1.037	1.354	0.157
NaCl ²	0.802	0.616	0.026	0.406	0.225	0.005	-0.009	0.007	0.018	-0.131	0.173	0.161	0.778	1.354	0.277
CC ²	0.589	0.616	0.085	-0.297	0.225	0.024	-0.005	0.007	0.146	-0.001	0.173	0.996	2.009	1.354	0.014
Interactions															
SA*NaCl	0.335	0.827	0.437	-0.046	0.301	0.765	0.010	0.009	0.034	-0.197	0.232	0.120	-2.023	1.817	0.050
NaCl*CC	0.265	0.827	0.536	0.016	0.301	0.916	-0.020	0.009	0.001	-0.31	0.232	0.028	0.090	1.817	0.923
CC*SA	0.350	0.827	0.200	-0.279	0.301	0.094	0.012	0.009	0.022	-0.16	0.232	0.199	0.090	1.817	0.923

SA: Sodium Alginate (%); NaCl: Sodium Chloride (%); CC: Calcium Chloride (%)

*RC: Regression coefficient; SE: Standard error; SL: Significant level.

Table 4: Regression models fitted for parameters from Calcium Caseinate samples

Term	L*			b*			Hardness			Cooking Loss		
	RC*	SE*	SL*	RC*	SE*	SL*	RC*	SE*	SL*	RC*	SE*	SL*
Constant	60.227	0.311	0.000	6.745	0.0341	0.0000	7.913	0.525	0.000	1.180	0.080	0.000
Linear												
SA	1.306	0.412	0.000	1.089	0.453	0.001	-0.960	0.696	0.020	0.038	0.117	0.526
NaCl	-1.778	0.412	0.000	-0.689	0.453	0.012	0.542	0.696	0.151	0.014	0.117	0.861
CCa	0.084	0.412	0.694	0.327	0.453	0.180	1.199	0.696	0.006	0.248	0.117	0.002
Quadratic												
SA ²	0.670	0.401	0.008	-0.070	0.441	0.756	0.576	0.678	0.120	0.139	0.114	0.035
NaCl ²	0.454	0.401	0.043	0.242	0.441	0.297	-0.195	0.678	0.578	0.070	0.114	0.249
CCa ²	0.129	0.401	0.536	0.059	0.441	0.796	0.489	0.678	0.179	0.015	0.114	0.800
Interactions												
SA*NaCl	1.306	0.539	0.001	0.686	0.592	0.057	1.409	0.909	0.011	0.199	0.153	0.026
NaCl*CCa	0.761	0.539	0.018	0.111	0.592	0.714	0.113	0.909	0.808	0.079	0.153	0.326
CCa*SA	-0.486	0.539	0.101	0.296	0.592	0.340	-0.008	0.909	0.986	0.139	0.153	0.099

SA: Sodium Alginate (%); NaCl: Sodium Chloride (%); CCa: Calcium Caseinate (%)

*RC: Regression coefficient; SE: Standar error; SL: Significant level.

Table 5: Regresion models fitted for parameters from Calcium Lactate samples

Term	b*			Cohesiveness		
	RC*	SE*	SL*	RC*	SE*	SL*
Constant	3.013	0.332	0.0000	0.555	0.007	0.0000
Linear						
SA	0.404	0.440	0.0957	0.003	0.010	0.6037
NaCl	-1.141	0.440	0.0004	0.022	0.010	0.0011
CLa	0.247	0.440	0.2883	-0.001	0.010	0.8838
Quadratic						
SA ²	-0.157	0.429	0.4790	0.003	0.009	0.5990
NaCl ²	0.276	0.429	0.2273	-0.014	0.009	0.0123
CLa ²	0.263	0.429	0.2473	0.005	0.009	0.2904
Interactions						
SA*NaCl	0.379	0.575	0.2173	0.004	0.012	0.9530
NaCl*CLa	-0.736	0.575	0.0284	0.003	0.012	0.6813
CLa*SA	0.111	0.575	0.7070	-0.003	0.012	0.6813

SA: Sodium Alginate (%); NaCl: Sodium Chloride (%);CLa: Calcium Lactate (%).

*RC: Regression coeficient; SE: Standar error; SL: Significant level.

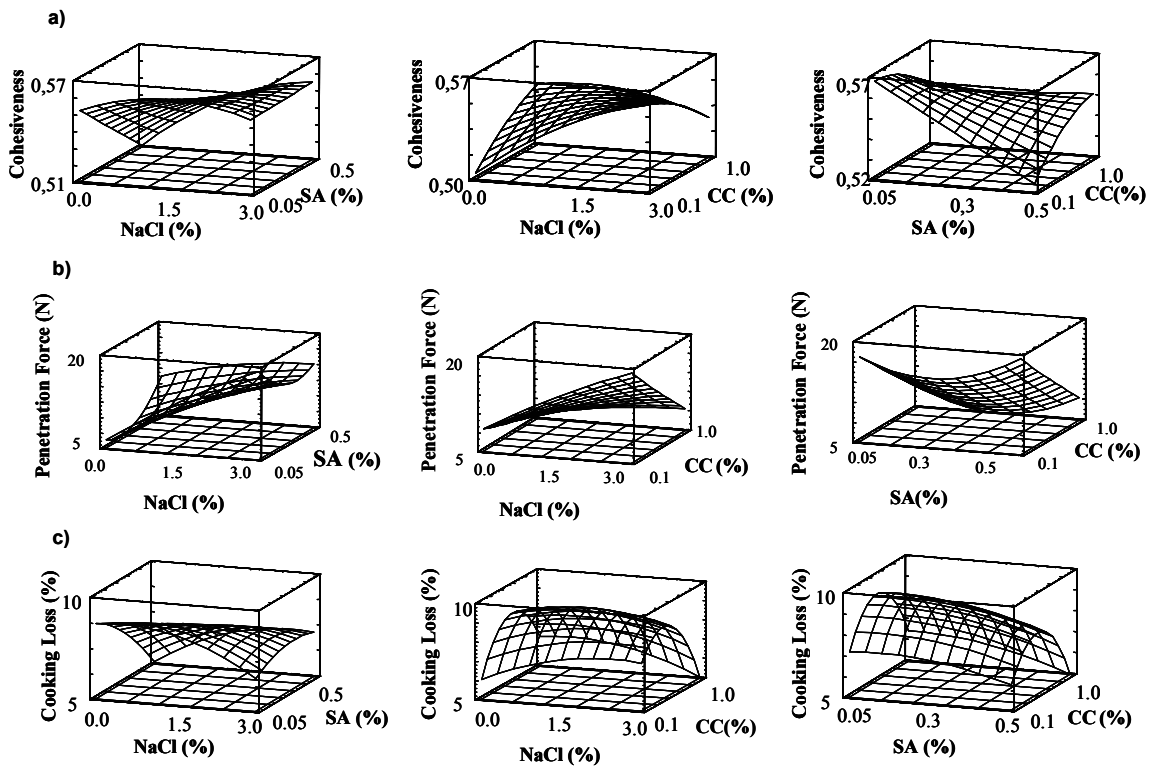


Figure 1: Response Surface for Cohesiveness (a), Penetration Force (b) and Cooking Loss (c) as a function of NaCl (%), SA (%) and CC.

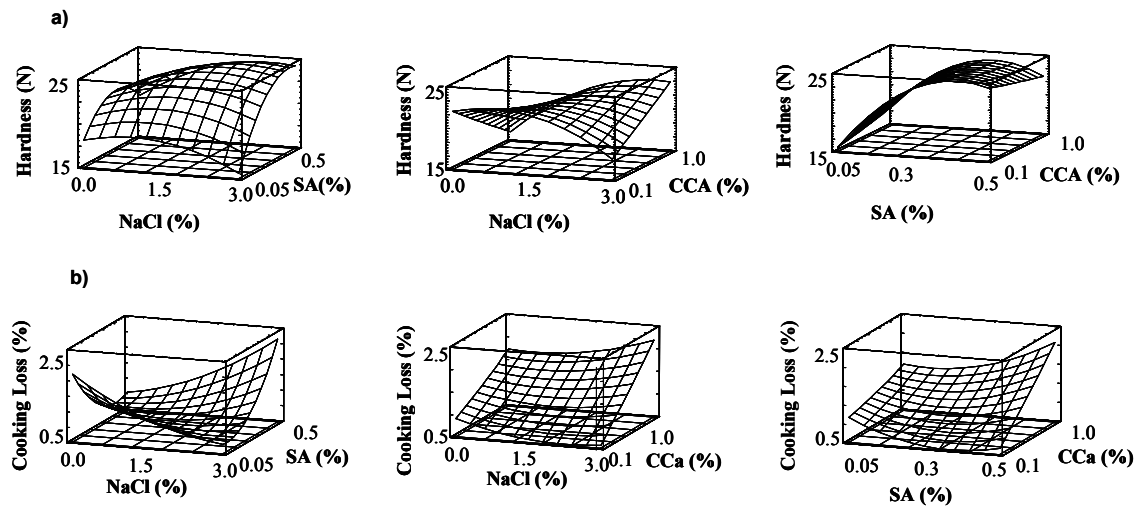


Figure 2: Response Surface for Hardness (a) and Cooking Loss (b) as a function of NaCl (%), SA (%) and CCa.

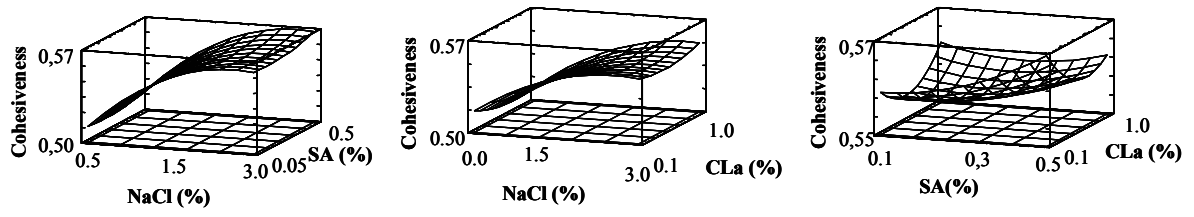


Figure 3: Response Surface for Coheriveness as a function of NaCl (%), SA (%) and CLa (%).

V.1.3.- INFLUENCIA DE ALGINATO SÓDICO Y TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA COMO AGENTES LIGANTES EN PRODUCTOS REESTRUCTURADOS DE PESCADO OBTENIDOS A BAJAS TEMPERATURAS.

“Influence of Alginate and microbial Transglutaminase as binding ingredients on restructured fish muscle processed at low temperature”.

Helena M Moreno, José Carballo and Javier Borderías.
Journal of the Science of Food and Agriculture 88: 1529-1536 (2008)

Influence of alginate and microbial transglutaminase as binding ingredients on restructured fish muscle processed at low temperature

Helena M Moreno, José Carballo and A Javier Borderías*

Departamento de Ciencia y Tecnología de la Carne y Productos Cárnicos y del Pescado y Productos de la Pesca, Instituto del Frío (CSIC), C/José Antonio Nováis 10, E-28040 Madrid, Spain

Abstract

BACKGROUND: In view of the increasing demand for fresh products in Western countries recently, there is considerable interest in commercialising restructured fish products having the appearance of fresh fish. A number of methods have been studied for the purpose of inducing cold gelification. Two of the most common methods, namely addition of alginates and addition of transglutaminases, have been studied mainly in connection with meat products. The present study deals with the use of alginate and transglutaminase as additives in cold gelification of minced hake (*Merluccius capensis*) muscle. The experiments were targeted on the effects of concentration and combined effects of additional additives on physicochemical characteristics and mechanical properties.

RESULTS: As regards mechanical properties, the effectiveness of sodium alginate was improved by addition of a low concentration (1 g kg^{-1}) of calcium chloride (CaCl_2), whereas a higher concentration (10 g kg^{-1}) reduced the binding ability of the alginate. The presence of sodium caseinate (15 g kg^{-1}) in combination with microbial transglutaminase (MTGase) was important in helping to increase the work of penetration in fish gels induced at low temperature. Examination of the chemical properties of the muscle gels showed that sodium alginate did not establish covalent protein–protein bonds, while MTGase dramatically increased the number of covalent bonds formed between adjacent muscle proteins.

CONCLUSION: With both ingredients, thermostable fish gels of good quality were produced at temperatures below 10°C . Gels induced by sodium alginate were considerably improved by addition of $1 \text{ g kg}^{-1} \text{ CaCl}_2$. However, gels induced by MTGase were better suited for the preparation of restructured products.

© 2008 Society of Chemical Industry

Keywords: sodium alginate; calcium chloride; microbial transglutaminase; sodium caseinate; restructured fishery products; gelification

INTRODUCTION

Restructured fishery products are processed from minced and/or chopped muscle, usually with added ingredients, to make products with a new appearance and texture. For some time now there have been products in the form of fingers or other shapes produced by cutting from frozen or semi-frozen fish or mince blocks, which are covered in breadcrumbs or batter and then re-frozen for using as fried products. The last 30 years have seen the development of a new generation of fishery products called analogues or substitutes. Most of them are formulated essentially from surimi.

In Europe today there is considerable demand for 'fresh products'. This demand has prompted attempts to commercialise chilled restructured products based on chopped or minced raw fish muscle, presenting

eating characteristics similar to cuts from intact muscles. Also, cold-set products are more versatile in that they can be processed in many ways, for instance as marinated products, sushi, carpaccio or as a ready-to-cook fish fillet analogue.

Different binding agents are available for the manufacture of added-value fish products from mince or small pieces of fish muscle. Each of these binding agents works in a different way, as the interaction can be different depending on the kind of ingredients and the type of fish muscle involved in the process.¹

Alginate and microbial transglutaminase (MTGase) are very suitable as binding ingredients for fish, interacting with muscle particles to produce thermostable gels at temperatures below 30°C . Alginates have been used extensively in meat products but not in fish products. Alginate is a polysaccharide extracted from

* Correspondence to: A Javier Borderías, Departamento de Ciencia y Tecnología de la Carne y Productos Cárnicos y del Pescado y Productos de la Pesca, Instituto del Frío (CSIC), C/José Antonio Nováis 10, E-28040 Madrid, Spain
E-mail: jborderias@if.csic.es

(Received 9 January 2008; revised version received 28 March 2008; accepted 28 March 2008)

Published online 13 May 2008; DOI: 10.1002/jsfa.3245

brown seaweed and is used mainly in the form of sodium alginate. Although alginates are widely used in food systems as stabilisers and to modify the rheology of foods, one of their more interesting properties is gelation. Alginate is different from other gel-forming hydrocolloids in that it forms thermostable gels without thermal treatment. Alginate gels are formed by intermolecular association of polyvalent cations (calcium principally) with dimerically associated guluronic acid block regions of the polysaccharide molecule.² It is this gel that interacts with myofibrillar proteins. Shand *et al.*³ and Montero *et al.*⁴ reported that these interactions are mainly electrostatic, between the anionic groups on the alginate and the positively charged groups on the protein. However, there is little information about the molecular mechanism whereby the functionality of myofibrillar proteins is improved by conjugation with alginates.¹ The interaction between alginates and proteins is determined by the concentration of hydrocolloids and calcium ion sources, which form thermostable gels capable of binding comminuted or ground fish muscle. The proportion of sodium alginate, the calcium ion source, the setting time and the reaction time are all variables used to achieve different kinds of texture.⁵

Another ingredient that can be used as a cold binder is MTGase. Transglutaminase (protein-glutamine γ -glutamyltransferase) is an enzyme capable of catalysing acyl transfer reactions by crosslinking, introducing proteins such as myosin, peptides and primary amines,^{6–8} and also by forming hydrophobic interactions.⁹ It is well known that MTGase catalyses covalent bonding between the ϵ -amino group of lysyl residues and the γ -carboxamide group of glutamyl residues of adjacent proteins.^{10,11} The role of MTGase in catalysing the crosslinking of myosin heavy chains has been studied, but the mechanics of the reactions is still not clear. Furthermore, little research has been done on the formation of crosslinking between individual myofibrillar proteins.¹² As an ingredient, MTGase is an extracellular enzyme produced by several microorganisms of the *Streptovorticillium* genus, *Bacillus subtilis* and a variant of *Streptovorticillium morbraense*, and it differs from endogenous transglutaminase in that it is calcium-independent. It is active over a fairly wide range of pH (4–9) and temperature (0–70 °C). Its activity peaks at 55 °C, although the optimal temperature for setting when it is added to cold water fish muscle is in the range 25–30 °C.^{13,14} Fish muscle has an endogenous transglutaminase of its own which is calcium-sensitive, and enough calcium ions must be present for the endogenous transglutaminase to be activated and setting induced at low or moderate temperatures.⁹ A number of authors have used MTGase to improve gel properties in surimi^{13,15} or to restructure seafood muscle.^{6,16} MTGase activity is also independent of salt concentration.^{14,17} Uresti *et al.*¹⁴ reported the possibility of achieving good textural properties with fish muscle using a very

low salt level. Kuraishi *et al.*¹⁷ reported that sodium caseinate combines very effectively with MTGase for crosslinking in a cool state in meat products and suggested possible means of utilising it in seafood products. Uresti *et al.*¹⁴ confirmed these data by making restructured products with fish muscle. Some previous work has already been done in our laboratory based on the above-cited research, and as a result a combination of 1 g kg⁻¹ MTGase (10 g kg⁻¹ commercial product) and 15 g kg⁻¹ sodium caseinate has been determined to be one of the best for restructuring with minced fish muscle.

The main aim of this study was to determine the importance of different variables in the gelification of minced fish muscle with a view to elaborating a raw restructured fish product. Another aim was to study the correspondence between the mechanical properties and water retention of fish muscle cold-gelled with alginate and transglutaminase and the kind of physicochemical bonds formed.

MATERIALS AND METHODS

Raw material and additives

The raw material was fillets of hake (*Merluccius capensis*) caught 2–3 months previously, frozen on board and stored at –20 °C.

Two kinds of restructured product were studied, the first with alginate and the second with MTGase. The ingredients in the first case were sodium chloride (NaCl), calcium chloride (CaCl₂) (Panreac Quimica SA, Barcelona, Spain) and sodium alginate (Degussa Texturant Systems España SA, Barcelona, Spain) in the proportions shown in Table 1. In the second case, NaCl, sodium caseinate (Julio Criado Gómez SA, Madrid, Spain) and MTGase (Activa WM (990 g kg⁻¹ maltodextrin and 10 g kg⁻¹ MTGase), Ajinomoto Co., Tokyo, Japan) were used in the proportions shown in Table 2.

Table 1. Composition of samples made with sodium alginate

Sample	NaCl (g kg ⁻¹)	Sodium alginate (g kg ⁻¹)	CaCl ₂ (g kg ⁻¹)
AC	15	0	0
A1	15	0.5	1
A2	15	0.5	10
A3	15	5	1
A4	15	5	10

Table 2. Composition of samples made with MTGase

Sample	NaCl (g kg ⁻¹)	Sodium caseinate (g kg ⁻¹)	MTGase (g kg ⁻¹)	H ₂ O (g kg ⁻¹)
MtC	15	0	0	50
Mt1	15	15	0	50
Mt2	15	0	10	50
Mt3	15	15	10	50

Sample preparation

Fillets of hake were minced in an FTS 11 meat mincer (Van Dall SRL, Milan, Italy) with a hole size of 3 mm. The mince was then mixed with the other components in a Stephan UM5 refrigerated vacuum homogeniser (Stephan und Söhne GmbH & Co., Hameln, Germany). The sequences of ingredient addition were as follows: NaCl, CaCl₂ and sodium alginate for the samples with alginate; NaCl, sodium caseinate and MTGase dissolved in water for the samples with MTGase. After each component addition the mixture was homogenised for 1 min. Finally, the full mixture was homogenised for 2 min. Round plastic plates (diameter 96 mm, depth 16 mm) were filled with the batters after mixing and vacuum packed in plastic bags. They were then placed in a refrigerator (5 °C) overnight.

Proximate analysis

Moisture, ash and fat contents in raw samples were determined in quadruplicate.¹⁸ Crude protein content was measured in quadruplicate with a LECO FP-2000 nitrogen determinator (Leco Corp., St Joseph, MI, USA).

Viscosity measurement

Apparent viscosity of muscle homogenate was measured according to Borderias *et al.*,¹⁹ with slight modifications, to determine the overall quality of frozen fillets. Thawed samples were homogenised with 50 g L⁻¹ NaCl (1:4 w/w), pH 7 (phosphate buffer). The homogenate was filtered through gauze and centrifuged at 345 × *g* for 10 min to remove air bubbles. Measurements were made at 12 rpm with an RV4 spindle, using a DV-III rheometer (Brookfield, Stoughton, MA, USA) and the Rheocalc Version 1.2 software system. Measurements were carried out in triplicate and results were expressed in centipoise (cP).

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Approximately 0.05 g of muscle sample was treated with a denatured solution consisting of 5 g L⁻¹ 2-β-mercaptoethanol, 25 g L⁻¹ sodium dodecyl sulfate (SDS), 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol L⁻¹ ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) and 0.02 g L⁻¹ bromophenol blue, following Hames,²⁰ and the final average concentration was adjusted to 2 g L⁻¹. Samples were heated for 5 min at 100 °C. Electrophoretic assays were performed using a PhastSystem apparatus with 12.5% polyacrylamide gel (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden).

Electrophoresis conditions were 10 mA, 250 V, 3 W and a temperature of 15 °C. Protein bands were stained with Coomassie brilliant blue, commercialised by Pharmacia LKB Biotechnology AB as PhastGel Blue R tablets. An aqueous solution of 300 g L⁻¹ methanol and 100 g L⁻¹ acetic acid was used for destaining, and a solution of 50 g L⁻¹ glycerol and 100 g L⁻¹ acetic acid as a preservative. The reference

standard used for molecular weights was a commercial high-molecular-weight (HMW) calibration kit from Pharmacia LKB Biotechnology AB. The disappearance rate of the myosin heavy chain band on the electrophoretic profile was analysed with the program ID-Manager Version 2.0 (TDI SA, Madrid, Spain).

Water-binding capacity

A frozen sample (2 g) was cut into small pieces and placed in a centrifuge tube (diameter 10 mm) with enough pipette filters (Gilson Inc., Middleton, WI, USA) as absorber. The muscle was thawed in the tube and then centrifuged in an MR1812 centrifuge (Jouan, Saint Nazaire, France) at 3000 × *g* for 10 min at room temperature. Water-binding capacity (WBC) was expressed as % water retained per 100 g water present in the muscle prior to centrifugation.

Mechanical properties

Puncture tests were carried out at room temperature (20–22 °C). Samples (round plastic plates 96 mm in diameter and 16 mm deep) were penetrated to breaking point seven times at separate points. Puncturing was performed using a 5 mm diameter cylindrical stainless steel plunger attached to a 50 N cell connected to the crosshead of a TA-XT Plus texture analyser (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY, USA). Breaking force (N), breaking deformation (mm) and work of penetration (N mm) were determined from force–deformation curves obtained at a crosshead speed of 0.2 mm s⁻¹.

Texture profile analysis (TPA) was performed using a TA-XT Plus texture analyser (Texture Technologies Corp.) as described by Bourne.²¹ Seven cores (diameter 19 mm, height 12 mm) of samples were axially compressed to 40% of their original height. Force–time deformation curves were derived with a 50 N load cell applied at a crosshead speed of 0.8 mm s⁻¹. Attributes were calculated as follows: hardness (Hd) = peak force required for the first compression (N); cohesiveness (Ch) = ratio of active work done under the first compression curve (dimensionless); springiness (Sp) = distance the sample recovers after the first compression (mm); adhesiveness (Adh) = negative force area of the first compression bite (Ns⁻¹). Measurements were performed seven times at room temperature (20–22 °C).

Protein solubility in different buffers

Protein concentration after solubilisation with different buffers was determined as an indirect way of analysing the kinds of physicochemical links established among proteins as a result of the addition of alginate and MTGase. The analysis of proteins was done in triplicate according to their solubility in 0.6 mol L⁻¹ NaCl (solution A) and then in a 50:50 (v/v) mixture of this and 8 mol L⁻¹ urea (solution B). The protocol was as described by Fernández-Martín *et al.*²² A 10 g sample was homogenised in an Omni-Mixer ES homogeniser (OMNI International Inc.,

Gainsville, VA, USA) for 1 min at 2–4 °C with solution A, then centrifuged in a 2JMC centrifuge (Beckman, Fullerton, CA, USA) at $20\,000 \times g$ for 30 min at 4 °C. The supernatant was removed and 50 mL of solution A was added to the precipitate, which was stirred for 1 h at 4 °C. The sample was centrifuged again at $20\,000 \times g$ for 30 min at 4 °C and the two supernatants were mixed to constitute fraction 1 (S1). Solution B (50 mL) was then added to the resulting precipitate, which was homogenised (1 min, 2–4 °C), stirred (24 h, 4 °C) under the conditions described above and then centrifuged ($20\,000 \times g$, 30 min, 4 °C) twice. The combination of the two supernatants constituted fraction 2 (S2). To summarise, the following fractions were collected: a salt-soluble fraction (S1), a urea-soluble fraction (S2) and an insoluble residue (S3). Soluble protein concentration (%) in S1 and S2 was determined by the method of Lowry *et al.*²³ According to Kauzman²⁴ and others, fraction S1 is composed of proteins remaining in a native-like conformation, intermolecularly associated via electrostatic bonds, fraction S2 is composed of aggregates intermolecularly linked by hydrophobic interactions and hydrogen bonds, and fraction S3 is composed of muscle protein aggregates linked by covalent, disulfide and other bonds and of other insoluble proteins, mainly collagen.

Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) was conducted using Statgraphics 2.1 (STSC Inc., Rockville, MD, USA). Differences among means were analysed using the Tukey using the Tukey Test ($P < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Proximate and functional analyses of fish muscle

The main constituents of the raw sample were moisture ($808.2 \pm 1.4 \text{ g kg}^{-1}$), protein ($162.5 \pm 7.7 \text{ g kg}^{-1}$), fat ($12.2 \pm 2.0 \text{ g kg}^{-1}$) and ash ($16.2 \pm 0.8 \text{ g kg}^{-1}$). As the proximate analysis shows, the muscle had very little fat and a high proportion of protein.

The apparent viscosity determined in the muscle homogenate was 4989 cP. This correlates with the functional quality of fish muscle protein.^{25,26} Based on the viscosity data, the quality of this frozen fish muscle may be rated between high and good.²⁷

Mechanical properties of restructured products

Role of alginate

Breaking force, breaking deformation and work of penetration in samples restructured with alginate are presented in Table 3. Work of penetration was significantly higher (attributed to both breaking force and breaking deformation) in all samples with alginate than in the control sample without alginate, being particularly high in samples A1 and A3 in which the level of CaCl_2 was lower (1 g kg^{-1}). In relation to this finding, Trout²⁸ reported that use of a high-calcium source lowered the binding ability of alginate. Different amounts of added alginate (0.5 and 5 g kg^{-1}) did not significantly change any of the puncture test data. This finding does not agree with Clarke *et al.*,²⁹ who reported that penetration force increased when binding agent levels increased in a beef muscle/alginate restructured product.

Values of hardness, cohesiveness, springiness and adhesiveness (Table 3) were higher in samples with alginate and CaCl_2 than in the control sample, though there were no significant differences among samples containing alginate. Clarke *et al.*²⁹ and Devatkal and Mendiratta³⁰ also reported increased hardness values when binding agents were added. It is interesting to note that samples A1 and A3 containing different levels of sodium alginate but a smaller proportion of CaCl_2 presented greater work of penetration and were more adhesive. As in the case of the puncture test, TPA values were the same irrespective of the proportion of alginate.

Role of MTGase

Breaking force, breaking deformation and work of penetration in samples restructured with MTGase are presented in Table 4. Work of penetration was higher in samples with 10 g kg^{-1} MTGase owing to increased breaking force but not breaking deformation. The presence of sodium caseinate in combination with MTGase is important to increase the work of penetration in fish gels made at cold temperatures. This was reported by O'Kennedy and Kelly³¹ and Kuraishi *et al.*¹⁷ in substrates other than fish muscle.

Sodium caseinate by itself, without the presence of MTGase, is also able to increase the work of penetration by increasing both breaking deformation

Table 3. Mechanical properties (TPA and puncture test) and WBC of restructured products made with sodium alginate

Sample ^a	Hardness (N)	Springiness (mm)	Cohesiveness	Adhesiveness (N s^{-1}) ^b	Breaking force (N)	Breaking deformation (mm)	Work of penetration (N mm)	WBC (%)
AC	$5.66 \pm 0.76\text{a}$	$3.56 \pm 0.02\text{a}$	$0.63 \pm 0.01\text{a}$	$0.004 \pm 0.05\text{a}$	$0.46 \pm 0.04\text{a}$	$5.08 \pm 0.19\text{a}$	$2.37 \pm 0.26\text{a}$	$85.96 \pm 1.65\text{b}$
A1	$7.48 \pm 0.54\text{b}$	$4.30 \pm 0.08\text{b}$	$0.75 \pm 0.01\text{b}$	$0.011 \pm 0.22\text{c}$	$1.20 \pm 0.10\text{d}$	$6.17 \pm 0.24\text{c}$	$7.40 \pm 0.83\text{d}$	$92.06 \pm 2.00\text{c}$
A2	$7.00 \pm 0.90\text{b}$	$4.35 \pm 0.05\text{b}$	$0.75 \pm 0.01\text{b}$	$0.009 \pm 0.10\text{c}$	$0.88 \pm 0.08\text{bc}$	$5.55 \pm 0.16\text{ab}$	$4.90 \pm 0.53\text{bc}$	$77.78 \pm 2.95\text{a}$
A3	$7.08 \pm 0.43\text{b}$	$4.32 \pm 0.02\text{b}$	$0.75 \pm 0.01\text{b}$	$0.014 \pm 0.10\text{b}$	$1.07 \pm 0.10\text{cd}$	$5.99 \pm 0.34\text{bc}$	$6.44 \pm 0.87\text{cd}$	$87.87 \pm 1.41\text{c}$
A4	$6.64 \pm 0.36\text{b}$	$4.38 \pm 0.05\text{b}$	$0.76 \pm 0.02\text{b}$	$0.009 \pm 0.04\text{c}$	$0.75 \pm 0.04\text{b}$	$5.39 \pm 0.16\text{a}$	$4.05 \pm 0.34\text{ab}$	$84.18 \pm 1.72\text{b}$

Different letters within a column indicate significant differences ($P \leq 0.05$).

^a See Table 1 for sample compositions.

^b Absolute value.

Table 4. Mechanical properties (TPA and puncture test) and WBC of restructured products made with MTGase

Sample ^a	Hardness (N)	Springiness (mm)	Cohesiveness	Adhesiveness (Ns ⁻¹) ^b	Breaking force (N)	Breaking deformation (mm)	Work of penetration (N mm)	WBC (%)
MtC	4.43 ± 0.77a	4.26 ± 0.03a	0.70 ± 0.01a	0.014 ± 0.07a	0.44 ± 0.055a	4.12 ± 0.27a	1.82 ± 0.27a	83.78 ± 1.70a
Mt1	5.12 ± 0.64a	4.21 ± 0.14a	0.72 ± 0.02a	0.014 ± 0.13a	0.69 ± 0.11b	5.68 ± 0.93b	3.95 ± 1.37b	89.39 ± 1.02b
Mt2	12.65 ± 0.52b	4.26 ± 0.04a	0.79 ± 0.01b	0.005 ± 0.06b	1.44 ± 0.12c	5.08 ± 0.36b	7.35 ± 1.15c	85.88 ± 1.18a
Mt3	13.66 ± 1.08c	4.33 ± 0.11a	0.79 ± 0.03b	0.007 ± 0.39a	1.91 ± 0.19c	5.57 ± 0.33b	10.66 ± 1.64d	94.22 ± 0.67c

Different letters within a column indicate significant differences ($P \leq 0.05$).

^a See Table 2 for sample compositions.

^b Absolute value.

and breaking force. This does not agree with Uresti *et al.*,¹⁴ who reported that at a similar salt concentration the breaking force was higher but not the breaking deformation, but that the resulting work of penetration was similar; in any event, in the present work the puncture test was performed up to the breaking point, while in the work of Uresti *et al.*¹⁴ it was performed at a fixed deformation.

Hardness values analysed by TPA (Table 4) increased in the presence of MTGase, much more so when MTGase was added in combination with sodium caseinate. Kuraishi *et al.*¹⁷ stated that, when caseinate is added along with MTGase, the ϵ -(γ -glutamyl)lysine groups increase dramatically. In that connection, Beltrán-Lugo *et al.*³² observed by light microscopy that sodium caseinate/MTGase produced a solid continuous phase with a relatively compact matrix. Sodium caseinate is able by itself to increase hardness, though not significantly. Adhesiveness was much lower when MTGase was added (both with and without sodium caseinate). Also, cohesiveness was greater in samples with added MTGase, but addition of sodium caseinate in the same sample did not change this value.

Water-binding capacity

Role of alginate

Values of WBC analysed by centrifugation in samples with and without alginate are presented in Table 3. In samples with added alginate, WBC was higher when samples contained 1 g kg⁻¹ CaCl₂ (A1 and A3) than when they contained 10 g kg⁻¹ CaCl₂ (A2 and A4). This is consistent with the fact that these samples scored higher in the puncture test.

Role of MTGase

Values of WBC are presented in Table 4. Samples with 15 g kg⁻¹ sodium caseinate (Mt1 and Mt3) presented better water retention values, with the sample containing 10 g kg⁻¹ MTGase (Mt3) presenting the best water retention value, which correlated with the values of work of penetration. Kuraishi *et al.*³³ stated that transglutaminase has considerable potential to improve WBC, as had previously been claimed by Fisher.³⁴ When MTGase was not accompanied by sodium caseinate (Mt2), the gels made by cool setting presented better WBC than the control, though this

difference was not significant. Sodium caseinate by itself (Mt1) helped to increase water retention as compared with the control (MtC), which is also consistent with high breaking force and breaking deformation.

Chemical properties of restructured products

Role of alginate

The values of solubility in different buffers, which reflects the types of bonds formed between alginate and proteins, are presented in Fig. 1. Samples A1 and A3, with low calcium content, presented solubility values in solutions S2 and S3 which did not differ significantly from the control sample (AC), which had no added alginate or calcium. At the same time, as reported above, these samples presented higher work of penetration and better WBC than AC, A2 and A4 (Table 3) and could therefore be considered better gels. These results suggest that the alginate established its own gel net, which somehow enhanced the gelification of the minced muscle, but not by establishing protein–protein or protein–alginate bonds. There are some contradictions in the literature regarding the kinds of bonds formed between proteins and alginates. Some researchers have reported that ionic bonds are established between negative groups of alginates and positive groups of myofibrillar proteins and amino acids,³⁵ while others, among them Montero *et al.*,⁴ have reported some interaction

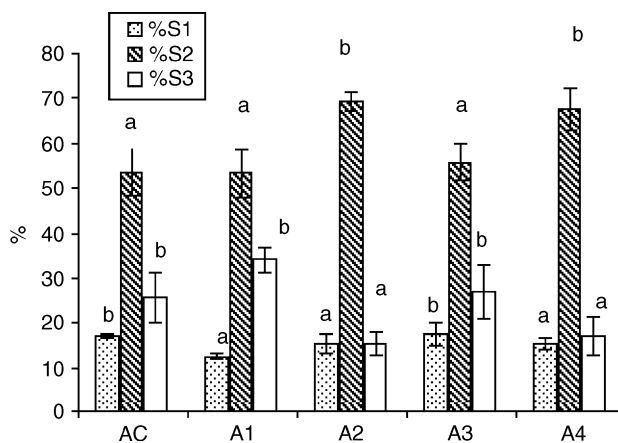


Figure 1. Percentages of bonds in samples with sodium alginate. Different letters indicate significant differences ($P \leq 0.05$). See Table 1 for sample compositions.

between alginates and proteins after analysing the microstructure by scanning microscopy. Urdangarin *et al.*¹ reported that alginate was covalently attached to myosin heavy chain through the Maillard reaction between the ϵ -amino group of protein lysine and the reducing terminus of alginate; however, in the present work, given the storage temperature, it does not seem possible that Maillard reactions could have been established. In previous (unpublished) work carried out in our laboratory, in which fresh hake (*Merluccius capensis*) muscle was restructured with added alginate, covalent protein–protein or alginate–protein bonds were established. What has probably happened in the present study is that in the raw material the protein has aggregated to some extent, as apparent viscosity values show. As a consequence, the myofibrillar proteins would be poorly suited for bonding to alginate. Solubility S2, consisting of protein molecules linked by hydrophobic interactions and hydrogen bonds, was higher in samples A2 and A4 than in the rest, while S3, consisting of protein molecules bound by covalent bonds, was lower in the same samples. This means that these were the most significant of the bonds implicated in gelification.

Role of MTGase

As regards the analysis of solubility in different buffers to determine what bonds were established in samples with added MTGase (Fig. 2), there was a clearly observable increase in S3 in samples with added MTGase (Mt2) and added MTGase/caseinate (Mt3), which means that covalent bonds were formed. Ikura *et al.*,³⁶ Motoki and Nio³⁷ and others reported that crosslinking occurs when MTGase acts on protein molecules so that ϵ -(γ -glutamyl)lysine crosslinks are formed; these bonds are more abundant when MTGase is accompanied by sodium caseinate.¹⁷ The mechanical properties were consistent with the increase in S3 and hence also with the number of covalent bonds formed. When sodium caseinate was added to mince without MTGase (Mt1), S1 increased significantly, which means that the bonds, even the weak ones, were solubilised; on the other

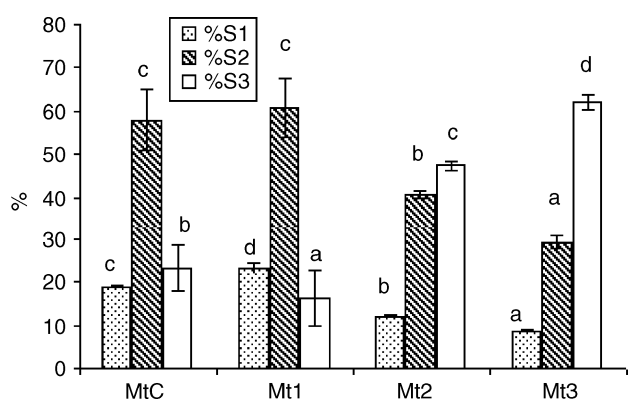


Figure 2. Percentages of bonds in samples with MTGase. Different letters indicate significant differences ($P \leq 0.05$). See Table 2 for sample compositions.

hand, puncture test values show that the work of penetration was higher. The presence of Na^+ ions probably helps to achieve better solubilisation and the formation of a more orderly net during setting, stabilised by weak bonds. Hydrophobic bonds did not change with respect to the control (MtC); in this connection, Imm and Regenstein³⁸ likewise found no increase in hydrophobicity when casein was added to a myosin dispersion.

Electrophoretic analyses

Role of alginate

The myosin heavy chain (MHC) band decreased when different proportions of sodium alginate were added to samples (Fig. 3). In samples A1 and A3, with different proportions of alginate and the lowest proportion of CaCl_2 , the reduction of the MHC band with respect to the control (AC) was greater (A1, 26.5%; A3, 27.2%) than in samples with more CaCl_2 (A2, 48.6%; A4, 35.9%) (Fig. 3). These data suggest that a smaller amount of CaCl_2 favours the diminishment of MHC, probably as a result of protein–protein or alginate–protein polymerisation. This assertion is consistent with the higher insoluble fraction (S3) found in the solubility test, indicating the formation of a larger number of covalent bonds (Fig. 1). It is also consistent with a higher breaking force and breaking deformation in samples A1 and A3 than in samples A2 and A4. Also, the higher polymerisation of samples A1 and A3 correlates with higher WBC.

Role of MTGase

A glance at Fig. 4 shows that there was a decrease in the MHC band with respect to the control (MtC) when MTGase was added (Mt2, 54.9%; Mt3, 53.6%). This decrease was accompanied by an increase in the number of polymer bands in the stacking gel but not entering the resolving gel. This was also reported by Lee *et al.*⁸ in fish samples with MTGase with setting at 25 °C.

The sample containing only sodium caseinate (Mt1) also presented an MHC band which was a little lower

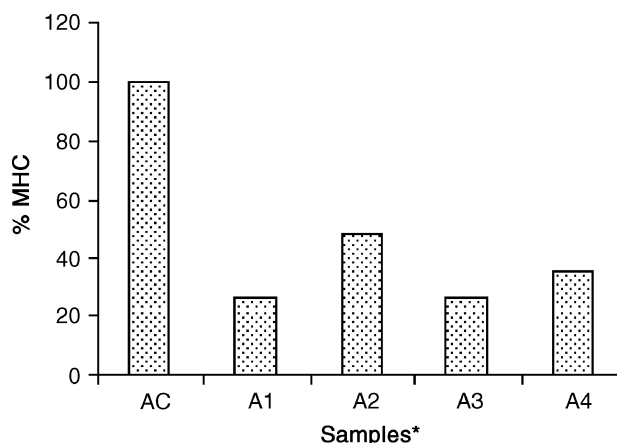


Figure 3. Percentages of myosin heavy chain in samples with sodium alginate. *See Table 1 for sample compositions.

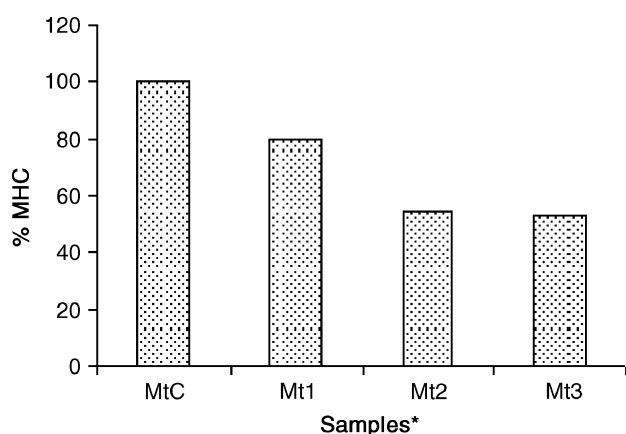


Figure 4. Percentages of myosin heavy chain in samples with MTGase. *See Table 2 for sample compositions.

than the control (79.4%). This could be because there are some kinds of links between casein and myosin, but that is not consistent with what was found in protein solubilisation (Fig. 2). Irrespective of casein–myosin bonding, it was seen earlier that the values for mechanical properties, especially breaking deformation, were higher. The reason for this could lie in the high protein flexibility demonstrated by casein even when it has not been heated.³⁸

CONCLUSIONS

Within the range of concentrations considered, mechanical properties depend more on the amount of CaCl_2 added than on the amount of sodium alginate. Texturising is more effective when 1 g kg^{-1} CaCl_2 is used rather than a higher amount (10 g kg^{-1}).

MTGase presents more intense texturising action when it is added to minced fish in combination with sodium caseinate and is allowed to set for about 24 h so that more covalent bonds can be formed. Sodium caseinate by itself presents some texturising action.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas via a Predoctoral Scholarship under programme I3P-2004.

REFERENCES

- Urdangarin M, Shigeru K, Ryo S and Hiroki S, Improved solubility and stability of carp myosin by conjugation with alginate oligosaccharide. *Fish Sci* **70**:896–902 (2004).
- Means WJ and Schmidt GR, Algin calcium gel as a raw and cooked binder in structured beef steaks. *J Food Sci* **51**:60–65 (1986).
- Shand PJ, Sofos JN and Schmidt GR, Properties of algin calcium and salt phosphate structured beef rolls with added gums. *J Food Sci* **58**:1224–1230 (1993).
- Montero P, Hurtado JL and Pérez-Mateos M, Microstructural behaviour and gelling characteristics of myosystem protein gels interacting with hydrocolloids. *Food Hydrocolloids* **14**:455–461 (2000).

- Tolstoguzov VB, Functional properties of protein–polysaccharide mixture, in *Functional Properties of Food Macromolecules*, ed. by Mitchell JR and Ledward DA. Elsevier Applied Science, pp. 385–415 (1986).
- Suklim K, Flick GJ, Marcy JE, Eigel WN, Haugh CG and Granata LA, Effect of cold-set binders: alginates and microbial transglutaminase on the physical properties of restructured scallops. *J Texture Stud* **35**:634–642 (2004).
- Pérez-Mateos M, Solas T and Montero P, Carrageenan and alginate effects on properties of combined pressure and temperature in fish mince gels. *Food Hydrocolloids* **16**:225–233 (2002).
- Lee HG, Lanier TC, Hamann DD and Knopp JA, Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein sols. *J Food Sci* **62**:20–24 (1997).
- Park JW, Ingredient technology, in *Surimi and Surimi Seafood* (2nd edn), ed. by Park JW. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 649–707 (2005).
- Seki N, Nozawa H and Ni SW, Effect of transglutaminase on the gelation of heat-denatured surimi. *Fish Sci* **64**:959–963 (1998).
- Uresti RM, Velázquez G, Vázquez M, Ramírez JA and Torres JA, Effects of combining microbial transglutaminase and high pressure processing treatments on the mechanical properties of heat-induced gels prepared from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). *Food Chem* **94**:202–209 (2006).
- Nakahara C, Nozawa H and Seki N, A comparison of cross-linking of fish myofibrillar proteins by endogenous and microbial transglutaminases. *Fish Sci* **65**:138–144 (1999).
- Ramírez JA, Santos IA, Morales OG, Morrisey MT and Vázquez M, Application of microbial transglutaminase to improve mechanical properties of surimi from silver carp. *Sci Technol Alim* **3**:21–28 (2000).
- Uresti RM, Téllez-Luis SJ, Ramírez JA and Vázquez M, Use of dairy proteins and microbial transglutaminase to obtain low-salt fish products from filleting waste from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chem* **86**:257–262 (2004).
- Jiang ST, Hsieh JF, Ho ML and Chung YC, Microbial transglutaminase affects gel properties of golden threadfin-bream and pollack surimi. *J Food Sci* **65**:694–699 (2000).
- Vácha F, Novik I, Špička J and Podola M, Determination of the effect of microbial transglutaminase on technological properties of common carp (*Cyprinus carpio* L.) meat. *Czech J Anim Sci* **51**:535–542 (2006).
- Kuraishi C, Sakamoto J, Yamazaki K, Susa Y, Kuhara C and Soeda T, Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *J Food Sci* **62**:488–490 (1997).
- AOAC, *Official Methods of Analysis* (17th edn). Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD (2000).
- Borderías AJ, Jiménez-Colmenero F and Tejada M, Parameters affecting viscosity as a quality-control for frozen fish. *Mar Fish Rev* **47**:43–45 (1985).
- Hames BD, *An Introduction to Polyacrylamide Gel Electrophoresis*. IRL Press, Oxford (1985).
- Bourne MC, Texture profile analysis. *Food Technol* **32**:62–70 (1978).
- Fernández-Martin F, Cofrades S, Carballo J and Jiménez-Colmenero F, Salt and phosphate effects on the gelling process of pressure/heat treated pork batters. *Meat Sci* **61**:15–23 (2002).
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265–275 (1951).
- Kauzman W, Some factors in the interpretation of protein denaturation, in *Advances in Protein Chemistry*, ed. by Anson ML, Edsall JT and Bailey K. Academic Press, New York, NY, pp. 1–64 (1959).
- Jiménez-Colmenero F and Borderías JA, A study of the effect of frozen storage on certain functional properties of meat and fish protein. *J Food Technol* **18**:731–737 (1983).
- Kim B and Park JW, Rheology and texture properties of surimi gels, in *Surimi and Surimi Sea Food*, ed. by Park JW and

- Dekker M. Taylor and Francis, New York, NY, pp. 491–582 (2000).
- 27 Barroso M, Careche M and Borderías AJ, Quality control of frozen fish using rheological techniques. *Trends Food Sci Technol* **9**:223–229 (1998).
 - 28 Trout RG, Color and bind strength of restructured pork chops: the effect of calcium carbonate and sodium alginate concentration. *J Food Sci* **54**:1466–1470 (1989).
 - 29 Clarke AD, Sofos JN and Schmidt GR, Effect of algin calcium, pH and muscle proteins on gelation and microstructure of gels and structured beef. *Lebensm Wiss Technol* **21**:46–53 (1988).
 - 30 Devatkal S and Mendiratta SK, Use of calcium lactate with salt-phosphate and alginate-calcium gels in restructured pork rolls. *Meat Sci* **58**:371–379 (2001).
 - 31 O’Kennedy BT and Kelly PM, Evaluation of milk protein interactions during acid gelation using a simulated yoghurt model. *Milchwissenschaft* **55**:187–190 (2000).
 - 32 Beltrán-Lugo AI, Maeda-Martínez AN, Pacheco-Aguilar R, Nolasco-Soria HG and Ocaño-Higuera VM, Physical, textural, and microstructural properties of restructured adductor muscles of 2 scallop species using 2 cold-binding systems. *J Food Sci* **70**:E78–E84 (2005).
 - 33 Kuraishi C, Yamazaki K and Susa Y, Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Rev Int* **17**:221–246 (2001).
 - 34 Fisher RA, Seafood restructuring using cold-set binding technology. Gloucester Point, Va.: Virginia Sea Grant Marine Advisory Program (VSGCP-G-99-002), pp. 1–16 (1999).
 - 35 Rourke TJ, Clarke AD, Bailey ME and Hedrick HB, Ionic interactions in algin/calcium/myofibrillar protein gels. *J Muscle Foods* **8**:33–46 (1997).
 - 36 Ikura K, Kometani T, Yoshikawa M, Sasaki R and Chiba H, Crosslinking of casein components by transglutaminase. *Agric Biol Chem* **44**:1567–1573 (1980).
 - 37 Motoki M and Nio N, Crosslinking between different food proteins by transglutaminase. *J Food Sci* **48**:561–566 (1983).
 - 38 Imm JY and Regenstein JM, Interaction of commercial dairy proteins and chicken breast myosin in an emulsion system. *J Food Sci* **62**:967–971 (1997).

BLOQUE II: EMPLEO DE TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA EN LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS TIPO REESTRUCTURADOS DE MERLUZA (*Merluccius capensis*) Y CALAMAR GIGANTE (*Dossidicus gigas*)

V.2.1.- REESTRUCTURADOS ELABORADOS A PARTIR DE MÚSCULO DE MERLUZA (*Merluccius capensis*) PICADO.

V.2.1.1.- INCORPORACIÓN DE MTGasa EN FUNCION DEL PROCEDIMIENTO DE ELABORACIÓN

Para desarrollar este apartado, se realizaron estudios de la incorporación de la MTGasa junto con caseinato sódico, en la elaboración de modelos de reestructurados procesados por homogeneización en “cutter” y por mezclado de trozos pequeños de músculo de merluza (*Merluccius capensis*). Los tamaños de partícula empleados fueron, por una parte de un tamaño inferior a 1,0 mm y por otra, un tamaño de unos 20,0 mm. Estos estudios se llevaron a cabo empleando la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) que se describe en el Anexo 1.

Los estudios se llevaron a cabo aplicando un periodo de asentamiento o setting de 4°C/24h, o de 30°C/30 min seguido de un periodo de setting de 4°C/24h. Estas temperaturas se escogieron porque el reestructurado modelo obtenido mantenía su apariencia de crudo, que es el objetivo principal de la presente Memoria. Los 30±1°C se corresponden con la temperatura más cercana a la temperatura óptima de actividad de la enzima que oscila entre 40-50°C (Ajinomoto, 2008; Ramírez y col., 2006; Uresti y col., 2004), que permite que en el reestructurado modelo obtenido no se observen diferencias en la apariencia con respecto a la apariencia del producto crudo.

La incorporación de caseinato sódico obedece a que facilita la actividad de la enzima a temperaturas de refrigeración por debajo de 10°C (Kuraishi y col., 1997), aunque su actividad es en muchos casos independiente de la temperatura a la que se elaboran los productos. Se ha incorporado para la elaboración de reestructurados de cerdo (Kuraishi y col., 1997), de geles de pescado (*Hypophthalmichthys molitrix*) (Uresti et al., 2004), en la elaboración de kebab de carne de pollo (Killic, 2003), en emulsiones cárnicas (Cofrades y col., 2006), en reestructurados cárnicos (Carballo y col., 2006), etc.

El rango de concentraciones con el que se llevó a cabo la experiencia fue: NaCl (0,0-3,0%), Caseinato sódico (0,0-1,5%) y MTGasa (0,0-1,0%). En la Tabla 1 se recoge la composición de las muestras. Dicha composición fue la misma para cada temperatura y tamaño de partícula estudiados.

Tabla 1.: Composición muestras de ambos sistemas modelo.

Muestra	NaCl (%)	MTGasa (%)	Caseinato sódico (%)
1	1,50	0,50	0,75
2	1,50	0,50	0,75
3	2,40	0,80	0,31
4	2,40	0,21	1,20
5	2,40	0,21	0,31
6	1,50	0,00	0,75
7	1,50	0,50	1,50
8	1,50	1,00	0,75
9	0,61	0,80	1,20
10	3,00	0,50	0,75
11	1,50	0,50	0,75
12	1,50	0,50	0,75
13	0,61	0,80	0,31
14	0,00	0,50	0,75
15	2,40	0,80	1,20
16	0,61	0,21	0,31
17	0,61	0,21	1,20
18	1,50	0,50	0,75
19	1,50	0,50	0,75
20	1,50	0,50	0,00

En la Figura 1 se indica el distinto proceso empleado

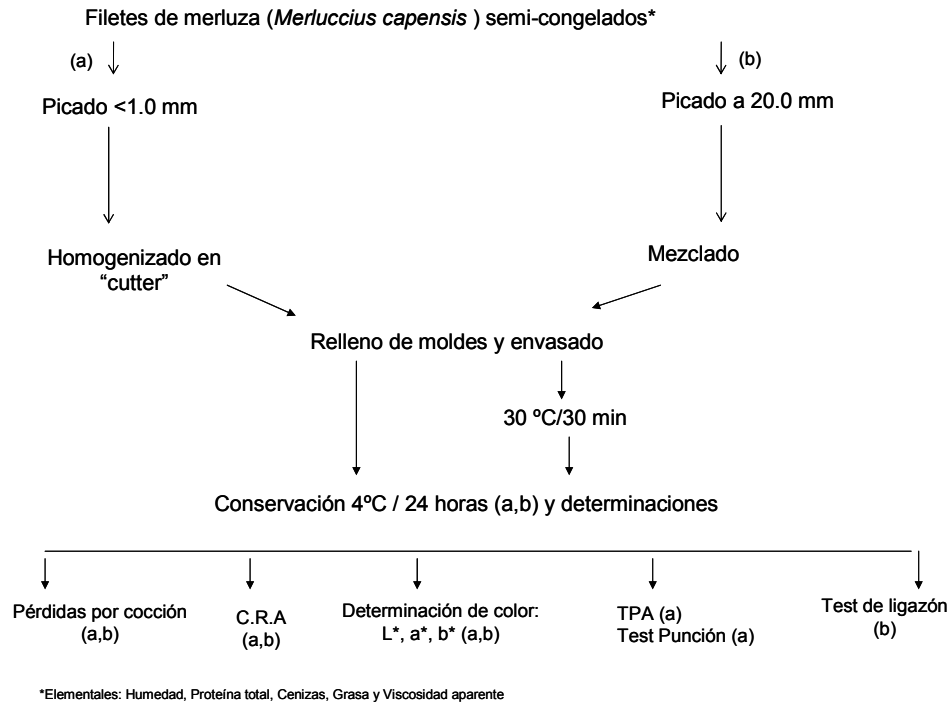


Figura 1: Procedimiento de fabricación de los reestructurados de músculo de merluza (*Merluccius capensis*) con distinto tamaño de partícula y con periodo de setting a 35°C/min o directamente setting de 4°C/24h.

La metodología de reestructuración empleada para la fabricación de ambos reestructurados se encuentra descrita en el apartado de Materiales y Métodos de la presente Memoria, así como el diseño experimental en el Anexo 1.

1. SISTEMAS MODELO DE MÚSCULO DE MERLUZA (*Merluccius capensis*) ELABORADOS MEDIANTE MEZCLADO DE TROZOS PEQUEÑOS (20 mm) DE MÚSCULO.

Estos reestructurados de tamaño de partícula grueso, se elaboraron según recoge el apartado IV.2.2. del capítulo de Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos empleando temperaturas de asentamiento de 4 y 30°C, se encuentran recogidos en la Tabla 2. Para aquellos parámetros estadísticamente significativos, se adjunta una tabla complementaria que recoge la contribución de cada variable analizada (NaCl, NaCas y MTGasa) al parámetro evaluado.

Tabla 2: Resultados del sistema modelo de trozos de músculo (20.0 mm)

Parámetro	Temperatura	Significación	R ² (%)	p-value
PROPIEDADES DE COLOR				
L*	4°	NS	0.000	0.6715
b*		NS	0.000	0.9037
L*	30°	NS	0.000	0.5215
b*		NS	19.039	0.269
PROPIEDADES MECÁNICAS				
F. ligazón	4°	**	72.751	0.0033
Elongación		NS	36.157	0.1182
T. a ruptura		**	68.846	0.0061
F. a ruptura	30°	NS	0.000	0.539
Elongación		NS	24.988	0.2093
T. a ruptura		*	66.261	0.0086
PROPIEDADES LIGANTES DE AGUA				
C.R.A	4°	NS	13.126	0.3347
Pérdidas cocción		NS	24.752	0.2115
C.R.A	30°	NS	45.840	0.063

Tal como indica la Tabla 2, en este sistema modelo, únicamente se encontraron parámetros estadísticamente significativos en algunas de las propiedades mecánicas, a las dos temperaturas ensayadas.

En la Tabla 3, se recoge la contribución de las variables al parámetro fuerza de ligazón (4°C) y trabajo a ruptura (4°C y 30°C). Se observa que la incorporación de la MTGasa presenta un efecto lineal positivo sobre la fuerza de ligazón, lo cual se traduce en un incremento en la fuerza necesaria para alcanzar el punto de ruptura al aumentar la concentración de MTGasa añadida a la muestra. Este hecho, sugiere que la enzima está contribuyendo a la formación de enlaces covalentes entre las proteínas, lo que conlleva a un incremento en las propiedades mecánicas del reestructurado obtenido (Kuraishi y col., 1997; Lee y col, 1997; Beltrán-Lugo, 2005). Por otra parte, la incorporación de concentraciones elevadas de la enzima (alrededor del 3.0%) dentro de los límites estudiados en el modelo producen un descenso de dicha fuerza (efecto cuadrático negativo).

Al incorporar NaCl se observó también un efecto cuadrático negativo en la fuerza de ligazón. La contribución cuadrática negativa de la variable NaCl podría tener explicación si consideramos que las proteínas se habían solubilizado notablemente

(puesto que estaríamos cercanos al 3,0% de NaCl), lo que les permitiría retener más agua y por ello dar lugar a geles menos rígidos. De esta manera las muestras con 1,5% de NaCl presentaron mayores fuerzas en el punto de ruptura que las que contienen 3,0% ($2,188 \pm 0,19$ N a $1,545 \pm 0,08$ N) (datos no mostrados).

Igualmente, la incorporación de caseinato sódico a altas concentraciones dentro de los límites estudiados (alrededor del 1,5%) supuso una disminución en la fuerza de ligazón (contribución cuadrática negativa) tal vez por interferir con las proteínas de alguna manera, lo que dificulta la interacción enzima-proteína y por tanto la formación de los enlaces ϵ -(γ -glutaminil)lisina.

Dado que el trabajo a ruptura es el producto de otras dos determinaciones que son, la fuerza a ruptura y la elongación (mm), la contribución de las variables a dicho parámetro es muy similar a la de la fuerza de ruptura cuando se emplea temperatura de asentamiento de 4°C. Cuando se aplica temperatura de 30°C, el trabajo a ruptura resultó ser un parámetro significativo y la contribución de las variables es idéntica a la que presentan sobre el sistema modelo con el asentamiento a 4°C (Tabla 3).

Tabla 3.: Contribución de las variables a las propiedades mecánicas.

Variables*	PROPIEDADES MECÁNICAS								
	4 °C						30°C		
	Fuerza de ligazón			Trabajo a ruptura			Trabajo a ruptura		
	RC	SE	SL	RC	SE	SL	RC	SE	SL
Constante	7.956	0.823	0.0000	140.904	8.346	0.0000	115.073	7.305	0.0000
Ef. Lineales									
NaCl	0.543	0.511	0.0597	9.860	11.074	0.1046	1.505	9.693	0.7625
MTGasa	0.869	0.511	0.0068	13.843	11.074	0.0316	11.565	9.693	0.0382
NaCas	0.232	0.511	0.3859	0.598	11.074	0.2906	1.752	9.693	0.7252
Ef.Cuadráticos									
NaCl ²	-1.029	0.497	0.0020	-23.072	10.780	0.0016	-17.859	9.436	0.0036
MTGasa ²	-1.234	0.497	0.0006	-24.680	10.780	0.0010	-18.682	9.436	0.0027
NaCas ²	-0.686	0.497	0.0202	-14.939	10.780	0.0197	-17.942	9.436	0.0035
Interacciones									
NaCl*MTGasa	0.172	0.668	0.6186	0.141	14.469	0.9849	9.112	12.665	0.1807
NaCas*NaCl	0.098	0.668	0.7762	0.856	14.469	0.9082	5.113	12.665	0.4382
NaCas*MTGasa	0.262	0.668	0.4516	5.625	14.469	0.4548	4.756	12.665	0.4700

*NaCas= Caseinato sódico

*RC: Coeficiente de regresión; SE: Error estándar; SL: Nivel de Significación.

Con estos resultados, idénticas contribuciones de las variables al sistema modelo, independientemente de la aplicación de setting a 30°C o a 4°C, cabría pensar que en los sistemas obtenidos a partir de trozos de músculo picado de tamaño de 20,0 mm, la adición de la enzima va a incrementar las propiedades mecánicas de los reestructurados obtenidos, siempre que concentración sea inferior al 0.8-1.0%. Sin embargo, no se encontraron cambios significativos en otros parámetros de interés, como son los de color (L^* y b^*), lo cual indica que el aspecto crudo del músculo de merluza con el que

se elaboran los reestructurados modelo no se ve alterado. Este último hecho también fue constatado por Beltrán-Lugo y col (2005) al estudiar la incorporación de MTGasa y caseinato sódico a diferentes especies de vieiras (*Nodipecten subnodosus*, *Argopecten ventricosus*). Esta falta de cambios en el color, es realmente interesante para el tipo de reestructurados modelo que se pretenden elaborar, dado que el objetivo principal de la presente Memoria es obtener un producto reestructurado con aspecto de fresco.

Otro hecho importante a reseñar es, que la acción de la enzima no presentó efecto significativo sobre las propiedades ligantes de agua. A este respecto, en la bibliografía, existen discrepancias sobre la contribución de la MTGasa sobre la retención de agua y se considera que ésta condicionada por el tipo de producto, de la cantidad de enzima, de las condiciones de procesado, etc. (Fisher, 1999; Kerry y col., 1999; Kuraishi y col., 2001; Cofrades y col., 2006).

2.- SISTEMAS MODELO DE MÚSCULO DE MERLUZA (*Merluccius capensis*) CON PROCESADO EN “CUTTER”.

Este tipo de reestructurados, fue elaborado según se describe en el apartado IV.2.2 de la presente Memoria y se caracterizan por ser reestructurados muy homogéneos, con tamaño de partícula pequeño, lo que hace suponer un mayor grado de interacción entre la MTGasa y las proteínas miofibrilares, que en los reestructurados anteriores elaborados con trozos. En cualquier caso, como ya ha sido comentado con anterioridad, el grado de interacción de la enzima con la proteínas depende no solo de la actividad de la enzima, sino también de otros aspectos entre los que cabe destacar los constituyentes del músculo de las diferentes especies de pescado o la conformación de la actomiosina de cada una de las especies (Morales y col., 2001; Araki y Seki, 1993, Carballo y col., 2006).

Los resultados obtenidos empleando las dos temperaturas de estudio, se encuentran recogidos en la Tabla 4. Al igual que en el apartado anterior, para aquellos parámetros cuyos valores fueron estadísticamente significativos, se adjunta una tabla complementaria que recoge la contribución de cada variable analizada (NaCl, Caseinato sódico y MTGasa) al parámetro evaluado.

En este sistema modelo de homogenizado en “cutter”, se observaron cambios significativos en el color y en la propiedades ligantes de agua, que en el sistema modelo de tamaño de partícula grueso (20,0 mm) no se encontraron (Tablas 2 y 4).

La existencia de un mayor número de propiedades mecánicas significativas en el aquellos reestructurados a los cuales se les ha aplicado una temperatura de asentamiento de 30°C durante 30 min, podría ser debido a que la enzima, a temperaturas más cercanas a su temperatura óptima de actividad que se sitúa entre lo 40-50 °C (Ramírez et al., 2000; Uresti et al., 2004, Ajinomoto, 2009), actúa más eficazmente en la formación de enlaces covalentes del tipo ϵ -(γ -glutaminil)lisina (Ando et al., 1989; Suklim et al., 2004; Park, 2005) si bien es cierto que su efectividad está descrita entre los 0-70°C (Motoki and Seguro, 1989; Ajinomoto Manual, 2009).

Tabla 4: Resultados del sistema modelo de músculo picado fino (<1.0 mm).

Parámetro	Temperatura	Significación	R ² (%)	p-value
PROPIEDADES DE COLOR				
L*	4°	NS	0.000	0.6718
b*		*	60.147	0.0178
L*	30°	NS	38.865	0.1006
b*		*	50.425	0.0443
PROPIEDADES MECÁNICAS				
Dureza	4°	*	56.350	0.0262
Adhesividad		*	52.204	0.0381
Elasticidad		NS	18.579	0.2739
Cohesividad		NS	41.183	0.0868
F. de ruptura		NS	39.987	0.0938
Deformación		NS	44.471	0.0695
Tr. Penetración		NS	46.567	0.0598
Dureza	30°	*	60.941	0.0163
Adhesividad		*	61.884	0.0147
Elasticidad		NS	19.535	0.2637
Cohesividad		NS	22.157	0.2368
F. de ruptura		**	73.563	0.029
Deformación		NS	27.685	0.1847
Tr. Penetración		***	82.028	0.0005
PROPIEDADES LIGANTES DE AGUA				
C.R.A	4°	*	55.169	0.0293
Pérdidas cocción		*	61.823	0.0148
C.R.A	30°	NS	23.546	0.2231

Centrándonos en las contribuciones significativas de las variables sobre los parámetros de color (Tabla 5), se puede observar que tras el asentamiento a 4°C durante 24horas, la adición de MTGasa a bajas concentraciones dentro de los límites del sistema estudiados (alrededor del 0.2-0.5%), no conlleva cambios en b* (tendencia a tonalidades amarillas) sin embargo a altas concentraciones (entre 0.8-1,0%) se produce un incremento en la tonalidad amarilla de los reestructurados modelo. Sin embargo, tras el asentamiento a 30°C durante 30 min, el aumento de b* es directamente proporcional a la adición de MTGasa al sistema, lo que indica que al incrementar la concentración de MTGasa, la coloración amarilla se verá también aumentada.

Tabla 5.: Contribución de las variables (NaCl, MTGasa y NaCas) a las propiedades de color.

Variables*	PROPIEDADES DE COLOR					
	4°C			30°C		
	b*			b*		
	RC	SE	SL	RC	SE	SL
Constante	0.610	0.2044	0.0137	5.305	0.250	0.0000
Ef. Lineales						
NaCl	-0.251	0.273	0.0936	-0.380	0.331	0.0445
MTGasa	0.302	0.273	0.0501	0.635	0.331	0.0033
NaCas	-0.109	0.273	0.4400	-0.220	0.331	0.2131
Ef. Cuadráticos			0.0000			
NaCl ²	0.424	0.264	0.0093	0.117	0.322	0.4835
MTGasa ²	0.489	0.264	0.0041	-0.164	0.322	0.3337
NaCas ²	0.058	0.264	0.6698	0.008	0.322	0.9628
Interacciones						
NaCl*MTGasa	-0.413	0.354	0.0422	-0.473	0.433	0.0539
NaCas*NaCl	0.090	0.354	0.6226	-0.038	0.433	0.8659
NaCas*MTGasa	0.180	0.354	0.3337	0.043	0.433	0.8482

*NaCas= Caseinato sódico

*RC: Coeficiente de regresión; SE: Error estándar; SL: Nivel de Significación.

La contribución de la enzima al parámetro dureza, cuando el asentamiento se lleva a cabo a 4°C durante 24horas y a 30°C durante 30 min, es muy similar (Tabla 6), observándose en ambos casos contribuciones lineales positivas. Esto indica que se produce un incremento de la fuerza al aumentar la concentración de la enzima. Por otra parte, tras el asentamiento a 30°C, concentraciones elevadas de la enzima (entre 0.8-1,0%) producen un descenso de la fuerza en el reestructurado modelo (efecto cuadrático negativo). En este sentido, la capacidad de la MTGasa para incrementar las propiedades

mecánicas de los productos a los que se incorpora, ha sido ampliamente descrita por diversos autores (Seki y col., 1990; Agasami y col., 1995; Guilleland y col., 1997; Kurahisi y col., 2001; Ramírez y col., 2002; Lee y Park, 2003, Carballo y col., 2006). Cuando la enzima es añadida en bajas/medias concentraciones (entre 0,2-0,5%) su efecto sobre la adhesividad es independiente de la aplicación de asentamiento a 4°C ó a 30°C y su contribución es lineal positiva (Tabla 6). Sin embargo, cuando se aplica asentamiento a 30°C, concentraciones elevadas (cercanas al 1,0%) producen un descenso de la adhesividad en los reestructurados modelos (efecto cuadrático negativo).

Los parámetros fuerza de ruptura y trabajo de penetración únicamente resultaron significativos al aplicar asentamiento a 30°C durante 30min (Tabla 4). La contribución de las distintas variables a ambos parámetros (Tabla 7) fue similar, encontrándose efectos lineales positivos por el empleo de la MTGasa y el caseinato sódico (Kuraishi y col., 1997).

Tabla 7.: Contribución de las variables (NaCl, MTGasa y NaCas) a las propiedades mecánicas, análisis de penetración (Fuerza de ruptura y Trabajo de penetración).

Variables*	PROPIEDADES MECANICAS					
	30°C					
	Fuerza de ruptura			Trabajo de penetración		
	RC	SE	SL	RC	SE	SL
Constante	2.080	0.136	0.0000	11.435	0.681	0.000
Ef. Lineales						
NaCl	0.157	0.180	0.1114	1.368	0.903	0.013
MTGasa	0.382	0.180	0.0017	2.096	0.903	0.001
NaCas	0.296	0.180	0.0082	1.865	0.903	0.002
Ef. Cuadráticos						
NaCl ²	0.100	0.175	0.2794	0.531	0.879	0.255
MTGasa ²	-0.405	0.175	0.0010	-2.462	0.879	0.000
NaCas ²	0.012	0.175	0.8960	-0.173	0.879	0.703
Interacciones						
NaCl*MTGasa	-0.086	0.235	0.4819	-0.238	1.180	0.695
NaCas*NaCl	0.210	0.235	0.1048	1.991	1.180	0.007
NaCas*MTGasa	-0.176	0.235	0.1669	-0.815	1.180	0.198

*NaCas= Caseinato sódico

*RC: Coeficiente de regresión; SE: Error estándar; SL: Nivel de Significación.

Al igual que ocurre en el sistema modelo obtenido a partir de la reestructuración con partículas de 20.0 mm de músculo de pescado, la incorporación de altas cantidades de MTGasa, dentro de los límites del sistema estudiado (0.8-1.0%), hicieron disminuir tanto la fuerza de ruptura, como el trabajo de penetración (efecto cuadrático negativo) (Tabla7)

Tabla 6.: Contribución de las variables (NaCl, MTGasa y NaCas) a las propiedades mecánicas, TPA (Dureza y Adhesividad).

Variables*	PROPIEDADES MECÁNICAS											
	4°C						30°C					
	Dureza			Adhesividad			Dureza			Adhesividad		
	RC	SE	SL	RC	SE	SL	RC	SE	SL	RC	SE	SL
Constante	11.078	0.538	0.0000	-0.643	0.074	0.0000	17.836	1.435	0.0000	-0.165	0.033	0.0005
Ef. Lineales												
NaCl	-0.154	0.714	0.6763	-0.168	0.099	0.0066	1.118	1.904	0.2675	0.011	0.044	0.6232
MTGasa	1.559	0.714	0.0014	0.182	0.099	0.0041	4.405	1.904	0.0009	0.101	0.044	0.0010
NaCas	0.863	0.714	0.0363	0.017	0.099	0.7383	2.045	1.904	0.0572	-0.008	0.044	0.7234
Ef. Cuadráticos												
NaCl ²	-0.570	0.695	0.1319	0.049	0.096	0.3306	-0.273	1.854	0.7746	0.002	0.043	0.9306
MTGasa ²	-0.092	0.695	0.7971	-0.061	0.096	0.2345	-2.348	1.854	0.0297	-0.088	0.043	0.0021
NaCas ²	0.477	0.695	0.2004	0.036	0.096	0.4749	1.208	1.854	0.2216	0.002	0.043	0.9178
Interacciones												
NaCl*MTGasa	-0.686	0.933	0.1726	-0.011	0.128	0.8708	0.242	2.488	0.8497	-0.011	0.057	0.7060
NaCas*NaCl	0.489	0.933	0.3199	0.050	0.128	0.4599	1.707	2.488	0.1999	0.001	0.057	0.8121
NaCas*MTGasa	-0.131	0.933	0.7851	0.023	0.128	0.7312	-0.811	2.488	0.5293	0.024	0.057	0.4196

*NaCas= Caseinato sódico

*RC: Coeficiente de regresión; SE: Error estándar; SL: Nivel de Significación.

Al realizar el estudio en las propiedades ligantes de agua (pérdidas por cocción y capacidad de retención de agua) se observa que, ambos parámetros sólo son significativos a 4°C (Tabla 4).

Tabla 8.: Contribución de las variables (NaCl, MTGasa y NaCas) a las propiedades ligantes de agua.

Variables*	PROPIEDADES LIGANTES DE AGUA					
	4°C					
	Pérdidas por cocción			C.R.A		
	RC	SE	SL	RC	SE	SL
Constante	8.465	0.894	0.0000	2.781	0.716	0.003
Ef. Lineales						
NaCl	-1.466	1.187	0.0330	2.202	0.950	0.0009
MTGasa	1.796	1.187	0.0127	0.203	0.950	0.6777
NaCas	-0.607	1.187	0.3302	0.137	0.950	0.6978
Ef. Cuadráticos						
NaCl ²	1.695	1.155	0.0150	1.856	0.925	0.0025
MTGasa ²	0.660	1.155	0.2795	-0.060	0.925	0.8989
NaCas ²	0.252	1.155	0.6718	-0.288	0.925	0.5466
Interacciones						
NaCl*MTGasa	-1.339	1.550	0.1147	-0.198	1.241	0.7566
NaCas*NaCl	0.823	1.550	0.3134	0.012	1.241	0.9848
NaCas*MTGasa	-1.255	1.550	0.1365	0.418	1.241	0.5159

*NaCas= Caseinato sódico

*RC: Coeficiente de regresión; SE: Error estándar; SL: Nivel de Significación.

Como ya se comentó en el punto VI.3.2.2.A correspondiente al apartado de Materiales y Métodos, la determinación de la capacidad de retención de agua (CRA) se lleva a cabo por centrifugación de la muestra. En este caso, la adición de la enzima favoreció la retención de agua (efecto lineal positivo), lo que no fue observado cuando se determinaron las pérdidas por cocción (Tabla 8), donde la incorporación de la enzima produce un aumento de las pérdidas (efecto lineal positivo). La explicación que se puede dar a este hecho, se deriva de que posiblemente los factores de mayor influencia a la hora de determinar las pérdidas por cocción, sean la temperatura y el tiempo de tratamiento. En esta experiencia, las muestras son calentadas a 90°C durante 30 min, y parece que la red proteica formada con la MTGasa, se contrajese al ser sometida a dicha temperatura dificultando así la retención de agua en la misma y por tanto liberándola.

Los resultados obtenidos en este apartado, hacen suponer que al trabajar con un sistema modelo de músculo de pescado picado (<1.0mm) la adición de MTGasa conlleva cambios de color (b*) pero sensorialmente hablando no llamativos, independientemente de la temperatura de asentamiento aplicada. Así mismo se observan aumentos en algunas de las propiedades mecánicas siempre que la concentración de

MTGasa no supere el 1,0%. Sin embargo su contribución a las propiedades ligantes de agua parecen estar más condicionadas por el asentamiento aplicado.

Comparando los resultados obtenidos por ambos sistemas modelo, tanto del procesado mediante mezclado de trozos de músculo de alrededor de 20 mm como en el de masa elaborada por procesamiento en “cutter”, puede indicarse que el tipo de procesado es muy influyente en la contribución de la enzima sobre las propiedades mecánicas del producto, independientemente del tipo de asentamiento que se lleve a cabo.

A modo de conclusión general de este estudio preliminar de inclusión de MTGasa junto con caseinato sódico a un sistema de músculo de pescado, con distinto sistema de procesado, puede indicarse que adiciones de la enzima de hasta un 1% incrementan las propiedades mecánicas e incluso pueden llegar a mejorar la CRA. La adición de caseinato sódico al sistema modelo es recomendable hasta valores de 1,5%.

V.2.1.2.- ESTUDIO DE DOS PROCESADOS DIFERENTES DEL MÚSCULO DE MERLUZA (*Merluccius capensis*) EMPLEANDO DOS CALIDADES DIFERENTES DEL MISMO EN LA ELABORACIÓN DE REESTRUTURADOS EMPLEANDO TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA.

“Cold gelification of two different quality minced hake (*Merluccius capensis*) muscles at different setting times by adding Microbial Transglutaminase”.

Moreno, H.M., Carballo, J. and Borderías, A.J.

Journal of the Science of Food and Agriculture (Aceptado. Marzo, 2009)

Cold gelification of two different quality minced hake (*Merluccius capensis*) muscles at different setting times by adding Microbial Transglutaminase.

Helena M Moreno, José Carballo and A Javier Borderías*

Departamento de Ciencia y Tecnología de la Carne y Productos Cárnicos y del Pescado y Productos de la Pesca, Instituto del Frío (CSIC), C/ José Antonio Nováis, 10, 28040 Madrid, Spain.

***Corresponding author. Tel.: +3491 5492300; Fax; +3491 5493627. E-mail address: jborderias@if.csic.es (J. Borderías)**

Running Title: Cold gelification of minced hake by adding Microbial Transglutaminase.

Abstract

BACKGROUND: Microbial transglutaminase (MTGase) can improve the mechanical and functional properties of restructured fish products without using thermal gelification. The present study seeks to determine whether MTGase action on minced hake muscle with different particle sizes can be affected by the protein quality of raw materials.

RESULTS: As regards mechanicals properties, both quality and particle size restructured products attained an adequate consistency after setting for 24 hours at 5°C. The quality of the sample's protein is important when large particles are used for restructuring, but not when sample is homogenized with fine particles. Also, there were

strong correlations between MTGase residual activity, mechanical properties and electrophoretic band density and Water Binding Capacity (WBC) did not change significantly with MTGase addition.

CONCLUSION: The studied combination of 10 g kg⁻¹ of MTGase, 15 g kg⁻¹ of Sodium Chloride (NaCl) and 7.5 g kg⁻¹ of Sodium Caseinate was suited to obtain a minimally processed raw restructured fish products with two different quality and particle size. Restructured products made from the biggest size of particle quality of the protein had an important role over final properties, but in finely homogenized product the quality is not as important as in the other case.

Key words: Fish muscle, Microbial Transglutaminase, restructured product, physical properties, protein quality

INTRODUCTION

The ability to effectively bind fish pieces and smaller particles together is very important for the production of different restructured fish products.¹ Restructuring makes it possible to obtain products of high commercial value from different sources such as non-commercial fish species and trimmings from filleting of commercial fish species.^{2,3}

There are several additives with the ability to bind different muscle particles that can be used to improve the mechanical and functional properties of restructured fish products, but Microbial transglutaminase (MTGase) is one of the more used ingredients and makes for easy processing.³ In fact this additive has been extensively used in meat and poultry products⁴ but very little in seafood products, a field in which more knowledge is

needed. Transglutaminase catalyzes an acyl transfer reaction between γ -carboxamide groups of glutamine residues of proteins and primary amines, such as lysine, making it possible to create large polymeric protein molecules.^{3,5-9} Due to this, it has the ability to modify the functional properties of myofibrillar proteins and thus improving mechanical properties.¹⁰

The enzyme is active over a fairly wide pH range (4-9) and at temperatures from 0 to 70°C, although it presents maximum activity at 55°C. Uresti *et al.*¹¹ reported that in minced fish muscle setting for 2 hours at 25°C was a convenient combination for optimum gelation when MTGase was added. Most authors increase the temperature of the product to more than 80-90°C after 30-60 min of setting to inactivate the enzyme.^{2,3,12} Moreno *et al.*³ reported that the enzyme can be made to work at 5°C for up to 48 hours so as to avoid changes in the muscle colour and excessive growth of microorganisms, so that it can be commercialized as a fresh rather than a thermally treated product. Sodium caseinate, which represents a favourable substrate for the enzyme, has been used to improve MTGase action at refrigerated temperatures.^{10,13}

Fish is a highly perishable product and very often the muscle used as a raw material for restructured products has been frozen or refrozen so as to be stored for long periods of time, which seriously damages its protein functionality. There are not references about the importance of raw material in the resulting characteristics of restructured seafood products when MTGase is used. Katayama *et al.*¹⁴ reported that sausages made with low-quality meat with MTGase did not exhibit improved hardness as compared to that made with normal meat, which suggests that the raw material is important in the quality of restructured.

The aim of this study was to determine the importance of the functionality of the raw material for the physical properties of a raw-appearing restructured fish muscle product

made with different particle sizes and with MTGase added. Different setting times, up to 48 hours at 5°C without further heating, were also studied.

MATERIALS & METHODS

Raw materials and ingredients of samples

Frozen stored (-20°C) hake fillets (*Merluccius capensis*) were used to make two kinds of restructured products: the first (H) was made with good quality frozen hake muscle; the second (L) was made with the same muscle but after being frozen and tempered up to around -5°C (to prevent drip loss and also maintain the same water content) 5 times to produce a lower quality raw material. In both cases the ingredients used were: Sodium Chloride 15 g kg⁻¹ (Panreac Quimica, S.A.; Barcelona, Spain), Sodium Caseinate 7.5 g kg⁻¹ (Julio Criado Gómez, S.A. Madrid, Spain), MTGase 10 g kg⁻¹ (Activa WM (99% maltodextrine and 10 g kg⁻¹ MTGase) Ajinomoto Co.; Tokyo, Japan) and 50 g kg⁻¹ water to dissolve the enzyme.

Sample preparation

Two lots with different muscle particle sizes were made from each quality category (H and L): particles of 20.0 mm diameter (lot H1 and lot L1) and <1.0 mm diameter (lot H2 and lot L2). In all cases the muscle was ground in a meat mincer (FTS 11 Model, Van Dall SRL, Milan).

To prepare lots H1 and L1, fish muscle was mixed with the other components in a refrigerated mixer homogenizer (Hobart N-504, Hobart Corporation, USA). With this type of homogenizer the muscle fibres are not disintegrated and the final texture of the product is more natural.

To prepare lots H2 and L2, the muscle pieces were homogenized with the other components in a refrigerated vacuum homogenizer (Stephan UM5, Stephan u. Söhne GmbH & Co., Hameln, Germany). With this type of homogenizer the muscle is completely disintegrated. In all lots the addition sequence was: sodium chloride, sodium caseinate and finally MTGase dissolved in 50 g kg⁻¹ water. The batter was homogenized for 1 min with each component. Finally, the whole mixture was homogenized for 2 min more. Round plastic plates (depth 16 mm; Ø 96 mm) were filled with the batter then placed in chilled storage (5°C) for setting during 1, 6, 24 and 48 hours.

Proximate Analysis

Moisture, ash, and fat contents of the raw material were determined in quadruplicate.¹⁵ Crude protein content was measured in quadruplicate by a LECO FP-2000 Nitrogen Determinator (Leco Corporation, St Joseph, MI, USA).

Viscosity measurement

The apparent viscosity was determined according to Borderías et al.¹⁶ in order to determine the functional quality of the muscle. Thawed samples were homogenized with 50 g kg⁻¹ NaCl (1:4), pH=7 (phosphate buffer). The homogenate was filtered through gauze and centrifuged for 10 min at 345 x g to remove air bubbles. Measurements were made with a RV4 spindle, using a Brookfield model DV-III rheometer (Stoughton, MA) and rheocalc V 1.2 software. Measurements were carried out in triplicate and results were expressed in centipoises (cP).

Electrophoresis analysis (SDS-PAGE)

Electrophoresis analysis was performed in samples of muscle qualities after setting for 1, 6, 24 and 48 hours. Approx. 0.05 g of the sample was treated with a denatured solution consisting of 50 g L⁻¹ 2-β-mercaptoethanol, 25 g L⁻¹ sodium dodecyl sulphate (SDS), 10 mM Tris-HCl, 1mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 0.02 g L⁻¹ bromophenol blue following Hames¹⁷ and the final average concentration was adjusted to 2 g L⁻¹. The samples were heated for 5 min at 100°C. Electrophoresis assays were performed on a PhastSystem apparatus (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden) using 12.5% polyacrylamide gels supplied by Pharmacia.

Electrophoresis conditions were 10 mA, 250V and 3.0 W and temperature 15°C. Protein bands were stained with Coomassie brilliant blue, commercialized by Pharmacia as “PhastGel Blue R” tablets. An aqueous solution of 300 g L⁻¹ methanol and 100 g L⁻¹ acetic was used for destaining, and a solution of 50 g L⁻¹ glycerol and 100 g L⁻¹ acetic acid as a preservative. The reference standard used for molecular weights was a commercial high molecular weight (HMW) calibration kit from Pharmacia, consisting of: myosin (220 kDa), α₂-macroglobulin (170 kDa), β-galactosidase (116kDa), transferrin (76kDa) and glutamic dehydrogenase (53 kDa). The disappearance rate of the myosin heavy chain band in the electrophoresis profile was analysed by the programme ID-Manager v. 2.0 (TDI S.A, Madrid, Spain).

Water Binding capacity (WBC)

A sample (2g) of either quality frozen for each length of time (1, 24, 48 hours) was cut into small pieces and placed in a centrifuge tube (Ø=10 mm) along with enough pipette filters (Gilson, Inc. Middenton, WI 53562 USA) to acts as absorbers. The muscle was thawed in a tube and then centrifuged in a Jouan MR1812 centrifuge (Saint Nazaire, France) for 10 min at 3000 x g at room temperature (20-22°C). Water Binding Capacity

(WBC) was expressed as per cent water retained per 100 g water present in the muscle prior to centrifuging.

Transglutaminase activity

Transglutaminase activity was performed in the high quality muscle sample after setting for 1, 6, 24 and 48 hours. Twenty grams of the restructured product was homogenized with 200ml of a buffer solution composed of 5mM EDTA, 10mM-2- β -mercaptoethanol and 20mM Tris-HCl (pH 7.5) for 2 min at 10.000 rpm using an Omnimixer (Omnimixer ES, homogenize. OMNI International) following the method of Lee et al.⁸ The homogenate was centrifuged at 4°C and 20.000 x g for 20 min. The supernatant was separated from the precipitate and again centrifuged in the same conditions. The last supernatant contained the MTGase extract. This supernatant was used to determine residual transglutaminase activity, following the colorimetric hydroxamate assay method.⁵ The final reaction mixture contained 100 μ l of 1.0M buffer Tris-acetic (pH 6.0), 75 μ l 0.2M CBZ-L-glutaminyglycine (pH 6.0), and 25 μ l 0.1M CaCl₂, 2.0M Hydroxylamine and 0.02M EDTA tetrasodium, 25 μ l of supernatant and 225 μ l of distilled water. After 10 min of incubation at 37°C, ferric chloride-trichloroacetic acid reagent was added to stop the reaction. Finally, the yellowness was measured at 525 nm in a spectrophotometer UV-1601 (Model CPS-240, Shimadzu, Japan) as described by Montero *et al.*¹⁸ L-glutamic acid- γ -monohydroxamic acid was used as a standard for calibration. Although one unit of transglutaminase activity is defined as the amount of enzyme needed to produce 1 μ mol of hydroxamic acid/min, in the present work the results are expressed as per cent of residual activity with respect to the activity at 1H.

Mechanical properties

In view of the different physical characteristics of the samples with different particle sizes, Binding Tests were carried out on lots H1 and L1 and Puncture Tests and Texture Profile Analyses (TPA) on lots H2 and L2.

For the Binding Test, three round tempered samples (depth 16 mm; diam 96 mm) were measured at a time to assess the ability of the muscle pieces to adhere to one another (strength), in a procedure similar to the one described by Field *et al.*¹⁹ The strength (S) was measured as the peak force (N) required for a 1.9 cm ball, at a cross head speed of 100 mm/min (in a 50 N load cell), to break through a fish slice mounted on a ring of 3.2 cm inner diameter. Elongation (E) was estimated as the distance (mm) travelled by the ball after contact with the sample surface before the ball bursts through (peak force).

For Puncture Tests, samples (round plastic plate, depth 16 mm; diam 96 mm) were penetrated to breaking point six times at separate points. Puncturing was performed using a 5 mm diameter cylindrical stainless steel plunger attached to a 50 N cell connected to the crosshead of texture analyzer. Breaking Strength (BS) in N and Breaking Deformation (BD) in mm were determined on the force-deformation curves. Force-deformation curves were obtained at 0.2 mm/s crosshead speed.

Texture Profile Analysis (TPA) was performed as described by Bourne.²⁰ Five sample cores (diameter 19 mm; height 16 mm) were axially compressed to 40% of their original height without reaching breaking point. Force-time deformation curves were derived with a 50 N load cell applied at a crosshead speed of 0.8 mm s⁻¹. Attributes were calculated as follows: hardness (Hd) = peak force (N) required for the first compression; cohesiveness (Ch) = ratio of active work done under the first compression curve (dimensionless).

All mechanical properties were analysed using a TA-XT plus Texture Analyzer (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY, USA) at room temperature (20-22°C).

Statistical Analysis

One-way analysis of variance were carried out with the SPSS[®] computer programme (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and differences between pairs of means at different quality parameter values were evaluated by the Bonferroni test using a 95% confidence interval. Two way ANOVA was conducted on the rest of data using Statgraphics 2.1 (STSC Inc., Rockville, MD). The difference among means was analysed using Tukey's HSD test ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Proximate and functional analysis of fish muscle

The main constituents of the raw sample were: moisture $810.11 \pm 4.7 \text{ g kg}^{-1}$, protein $162.5 \pm 7.8 \text{ g kg}^{-1}$, fat $11.3 \pm 20 \text{ g kg}^{-1}$ and ash $15.1 \pm 0.2 \text{ g kg}^{-1}$. The apparent viscosity was determined in raw fish of both qualities (H and L). Viscosity was $6647 \pm 493 \text{ cP}$ in sample H and $284 \pm 44 \text{ cP}$ in sample L. The degree of protein aggregation of proteins correlated with the apparent viscosity.^{21,22} From these viscosity data, following the example of Barroso *et al.*²³ the quality of this frozen fish muscle was rated between high and good for the sample H, and between poor and very poor for the sample L.

Microbial transglutaminase activity in restructured product.

After 1, 3, 6, 12, 24 and 48 hours of exposure to the enzyme in the H2 high quality restructured product, the residual activity was measured to check the loss of activity over a range of times up to 48 hours. The results showed that the inflection point of the curve was at 6 hours, with values continuing to decrease up to 24 hours (Fig. 1). These

results suggest that 6 hours could be enough time for MTGase to act, although there would be some residual activity. Similarly, Carballo *et al.*²⁴ reported that when MTGase was added to meat muscle some residual enzyme activity remained after 24 hours; however, in fact in most of the studies published on meat products, the MTGase was only allowed to act for anything from a few hours to around 24 hours.^{25,26}

Mechanical properties of restructured products

Mince with large particle sizes (Lots H1 and L1)

Binding properties of restructured products are shown in Table 1. The highest strength was found in sample H1 at 24 hours. With low quality raw material (Lot L1) maximum strength was found between 1 and 6 hours, after which it was significantly lower than in lot H1. The low residual activity maintained between 6 and 24 hours (Fig. 1) would appear to be enough to establish bonds in the more functional protein contained in Lot H1. Another explanation could be that the protein by itself, regardless of whether MTGase is added, is able to set after partial solubilization induced by the addition of salt. Also, Katayama *et al.*¹⁴ reported that the breaking strength of meat sausages with low quality protein was lower than in the normal quality product.

There were very few significant differences between both lots H1 and L1 in elongation during setting. The only significant increase occurred between 1 and 6 hours; afterwards elongation declined again in the samples with low quality raw material but was maintained during 48 hours of setting in those with good raw material. Between 24 and 48 hours the elongation values were significantly higher in samples with good quality raw material (H1) than in L1. This suggests that the combined action of the added MTGase and the binding properties of the proteins themselves could be enough to keep

the large particles of both muscle qualities bound. These binding properties would not be possible without the presence of MTGase (data not shown).

Small particle size (Lots H2 and L2)

Mechanical properties, puncture tests and texture profile analyses were performed on restructured samples with small muscle particles (results shown in Table 2). Breaking force rose until 48 hours of setting. Samples with high quality raw material presented higher values than those with poorer material, but only between 24 and 48 hours, and the difference was small. Breaking deformation during setting was not significantly influenced by the quality of the raw material (Lots H2 and L2). When fish muscle is finely homogenized, the effect of the fish quality seems to be negligible. This could be because the MTGase and proteins in the batter interact better; this would facilitate protein-protein bonding and thus improve the mechanical properties. Similar results were reported by Montero *et al.*¹⁸ in the studies of gels made from minced horse mackerel muscle and ingredients. Texture profile analysis (Table 2) showed that hardness increased in both samples H2 and L2 over the setting time. Comparing the hardness of these samples, significant differences were found only after 48 hours, although these differences were small. This differs from the findings of Katayama *et al.*¹⁴, who reported that meat sausages made from low quality raw material were clearly harder than those made from high quality material. The differences in the results are probably due to the different raw materials (meat and fish muscle). Cohesiveness in both restructured products increased throughout the first six hours of setting. Beltrán-Lugo *et al.*²⁷, similarly reported that MTGase increased cohesiveness values in restructured adductor muscles of scallops. Cohesiveness values in samples made from

low and high quality raw materials were not significantly different after the given setting times.

In short, it appears that when muscle is finely comminuted with MTGase, there is no clear relationship between mechanical properties of restructured product and raw material quality.

Water Binding capacity

The WBC data (Table 3) for samples ground to a large particle size (H1 and L1), measured with respect to the total water in the sample, were slightly higher in the case of samples made with high quality than with low quality material up to 24 h of setting; however, by the end of 48 h the differences between the two lots were not significant. In samples homogenized to a smaller particle size (H2 and L2) the WBC was much greater than in samples with larger particles, probably because the more intense homogenization creates a structure or network better able to physically hold the water; also, if salt solubilizes the protein more effectively, better nets can be formed. MTGase does not seem to have any effect given that there was no significant increase in WBC throughout the setting time during which MTGase was active. This agrees with Téllez-Luis *et al.*²⁸, who reported that the proportion of NaCl in minced silver carp muscle with added NaCl and MTGase was more important for water retention than the amount of MTGase. Kuraishi *et al.*²⁹, Pietrasik²⁵ and other authors have found that MTGase enhances water binding capacity; however, these authors were working with meat muscle and did not perform the study in the presence of salt. Other authors, also studying meat muscle, have reported that the combined action of MTGase and salt increases drip^{24,30}.

Electrophoresis analysis

Figure 2 shows the per cent relative density of the Myosin Heavy Chain (MHC) band in relation to all the protein bands obtained in each sample throughout the 48 hours of setting time in very finely homogenized samples of both qualities (H2 and L2). The MHC band density decreased throughout setting in samples of both qualities, indicating myosin polymerization; this also agrees with Telléz-Luis *et al.*²⁸ The rate of polymerization correlated closely with MTGase activity (Fig. 1), which is also consistent with the mechanical properties. Katayama *et al.*¹⁴ also found that MHC actually disappeared in the low quality meat sample and reported that “something obstructed the heat-induced gel formation because low quality raw material resulted in less hard sausages”.

CONCLUSIONS

A good quality restructured fish mince can be achieved by adding 100 g kg⁻¹ MTGase, 15 g kg⁻¹ salt and 7.5 g kg⁻¹ sodium caseinate after setting at 5°C during 24 hours. When the restructured product is made with large muscle particles (around 20 mm), the functional quality of the protein is very important in order to achieve a restructured product with good mechanical properties. However, when muscle is finely homogenized to a very small particle size, the quality of the protein is not as important as in the former case because homogenization increases the ratio of proteins to other batter ingredients.

The mechanical properties of restructured products presented a good inverse relationship with the residual activity of the added MTGase. At all events the

mechanical improvements were due not only due to MTGase action, but also to the intrinsic ability of proteins to gelify after being solubilized by NaCl action.

MTGase had no noticeable effect on the water binding capacity, which was most affected by the degree of comminution.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) for the Predoctoral Scholarship under program I3P-2004 and to DIPVPP- Department of technological innovation and valorization of fisheries products (IPIMAR, Lisbon, Portugal) for the assistance in some part of the methodology.

REFERENCES

1. Motoki M, Nio N, Crosslinking between Different Food Proteins by Transglutaminase. *J Food Sci* **48**(2):561-566 (1983).
2. Ramírez JA, Del Ángel A, Velázquez G, Vázquez M, Production of low-salt restructured fish products from Mexican flounder (*Cyclopsetta chittendeni*) using microbial transglutaminase or whey protein concentrate as binders. *Eur Food Res Technol* **223**(3):341-345 (2006).
3. Moreno HM, Carballo J, Borderías AJ, Influence of Alginate and Microbial Transglutaminase as binding ingredients on restructured fish muscle processed at low temperature. *J Sci Food Agric* **88**:1529-1536 (2008).
4. Motoki M, Seguro K, Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Sci Technol* **9**(5):204-210 (1998).
5. Folk JE, Cole, PW, Structural requirements of specific substrates for guinea pig liver transglutaminase. *J Biol Chem* **240**: 523-524 (1965).
6. Kumazawa Y, Seguro K, Takamura M, Motoki M, Formation of ϵ -(γ -Glutamyl) Lysine cross-link in cured horse mackerel meat induced by drying. *J Food Sci* **58**(5):1062-1064 (1993).
7. Bursey RG, Transglutaminase, a cross-linking enzyme for meat and poultry. *Meat Industry Research Conference Proceedings*, 45-50 (1997).
8. Lee HG, Lanier TC, Hamann DD, Knopp JA, Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein sols. *J Food Sci* **62**(1):20-24 (1997).
9. Ramírez JA, Del Ángel A, Uresti RM, Velázquez G, Vázquez M, Low-salt restructured products from striped mullet (*Mugil cephalus*) using microbial transglutaminase or whey protein concentrate as additives. *Food Chem* **102**(1):243-249 (2007).

10. Flanagan J, Gunning Y, FitzGerald RJ, Effect of cross-linking with transglutaminase on the heat stability and some functional characteristics of sodium caseinate. *Food Res Int* **36**:267-274 (2003).
11. Uresti RM, Velázquez G, Vázquez M, Ramírez JA, Torres JA, Effects of combining microbial transglutaminase and high pressure processing treatments on the mechanical properties of heat-induced gels prepared from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). *Food Chem* **94**(2):202-209 (2006).
12. Seki N, Nozawa H, Ni SW, Effect of transglutaminase on the gelation of heat-denatured surimi. *Fish Sci* **64**(6):959-963 (1998).
13. Kuraishi C, Sakamoto J, Yamazaki K, Susa Y, Kuhara C, Soeda T, Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *J Food Sci* **62**(3):488-490, 515 (1997).
14. Katayama K, Chin KB, Yoshihara S, Muguruma M, Microbial transglutaminase improves the the porperty of meat protein and sausage texture manufactured with low-quality pork loins. *Aust J Anim Sci* **19**(1):102-108 (2006).
15. AOAC. *Official Methods of Analysis* (17th edn). Association of Official Analytical Chemist Gaithersburg, MD (2000).
16. Borderías AJ, Jiménez-Colmenero F, Tejada M, Parameters affecting viscosity as a quality-control for frozen fish. *Mar Fish Rev* **47**(4):43-45 (1985).
17. Hames BD, *An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis*. Oxford: IRL IRL Press, Oxford (1985).
18. Montero P, López-Caballero ME, Pérez-Mateos M, Solas MT, Gómez-Guillén MC, Transglutaminase activity in pressure-induced gelation assisted by prior setting. *Food Chem* **90**(4):751-758 (2005).
19. Field RA, Williams JC, Prasad VS, Cross HR, Secrist JL, Brewer MS, An

- objective measurement for evaluation of bind in restructured lamb roasts. *J Texture Stud* **15**(2):173-178 (1984).
20. Bourne MC. Food Texture and Viscosity. Concept and Measurement (2nd edn). Inst Food Technol, Chicago, 107-187. (2002).
 21. Jiménez-Colmenero F, Borderías JA, A study of the effect of frozen storage on certain functional properties of meat and fish protein. *J Food Technol* **18** :731-737 (1983).
 22. Kim B, Park JW, Rheology and texture properties of surimi gels in *Surimi and Surimi Sea Food*, ed by Park JW, Dekker M , New York; 491-582 (2000).
 23. Barroso M, Careche M, Borderías AJ, Quality control of frozen fish using rheological techniques. *Trends Food Sci Technol* **9**(6):223-229 (1998).
 24. Carballo J, Ayo J, Jiménez-Colmenero F, Microbial transglutaminase and caseinate as cold set binders: Influence of meat species and chilling storage. *LWT* **39**:692-699 (2005).
 25. Pietrasik Z, Jarmoluk A, Effect of sodium caseinate and k-carrageenan on binding and textural properties of pork muscle gels enhanced by microbial transglutaminase addition. *Food Res Int* **36**:285-294 (2003).
 26. Killic B, Effect of microbial transglutaminase and sodium caseinate onj quality of chicken doner kebab. *Meat Sci* **63**:417-421 (2003).
 27. Beltrán-Lugo AI, Maeda-Martínez AN, Pacheco-Aguilar R, Nolasco-Soria HG, Ocaño-Higuera VM, Physical, textural, and microstructural properties of restructured adductor muscles of 2 scallop species using 2 cold-binding systems. *J Food Sci* **70**(2): E78-E84. (2005)
 28. Téllez-Luis SJ, Uresti RM, Ramírez JA, Vázquez M, Low-salt restructured fish products using microbial transglutaminase as binding agent. *J Sci Food Agric*

- 82(9):953-959 (2002).**
29. Kuraishi C, Yamazaki K, Susa Y. Transglutaminase: Its utilization in the food industry. *Food Rev Int* **17(2):221-246 (2001).**
 30. O'Kennedy BT, Kelly PM, Evaluation of milk protein interactions during acid gelation using a simulated yoghurt model. *Milchwissenschaft* **55(4):187-190 (2000).**

Table 1: Properties of big particles (20 mm) restructured product.

Determinations	High quality (H1)				Low quality (L1)			
	1	6	24	48	1	6	24	48
Strength (N)	1.69 a ₁	2.84 b ₁	7.09c ₁	7.08c ₁	2.19 a ₁	5.48b ₂	5.98b ₂	5.52b ₂
Elongation (mm)	10.41a ₁	14.93b ₁	15.26b ₁	15.56b ₁	12.36a ₂	15.5b ₁	13.63bc ₂	12.71ac ₂

Different letters a, b, c, etc indicate significant differences thorough storage time (P≤0.05).

Different numbers 1, 2, 3, etc indicate significant differences between L and H samples (P≤0.05).

Table 2: Properties of small particles (<1 mm) restructured product.

Determinations	High quality (H2)				Low quality (L2)			
	1	6	24	48	1	6	24	48
Breaking Strength (N)	0.35a ₁	0.61b ₁	1.31c ₁	1.51d ₁	0.38a ₁	0.52b ₁	1.11c ₁	1.25d ₂
Breaking deformation (mm)	4.31a ₁	4.34a ₁	4.92a ₁	4.89a ₁	5.659a ₁	6.54a ₁	4.92a ₁	6.23a ₁
Hardness (N)	3.29a ₁	6.68b ₁	10.13c ₁	11.12c ₁	1.67a ₁	6.8b ₁	10.62c ₁	12.93d ₂
Cohesiveness (Nmm)	0.69a ₁	0.69a ₁	0.78b ₁	0.8b ₁	0.48a ₂	0.75b ₂	0.77c ₁	0.8c ₁

Different letters a, b, c, etc indicate significant differences thorough storage time (P≤0.05).

Different numbers 1, 2, 3, etc indicate significant differences between L and H samples (P≤0.05).

Table 3: WBC values of both restructured products

WBC (%)	High quality (H)			Low quality (L)		
	1	24	48	1	24	48
20 mm	81.34a ₁	83.08b ₁	83.07ab ₁	80.92a ₁	79.77a ₂	87.14b ₂
<1 mm	91.21a ₁	86.55a ₁	88.54a ₁	94.47a ₂	89.08b ₂	93.83a ₂

Different letters a, b, c, etc indicate significant differences thorough storage time (P≤0.05).

Different numbers 1, 2, 3, etc indicate significant differences between L and H samples (P≤0.05).

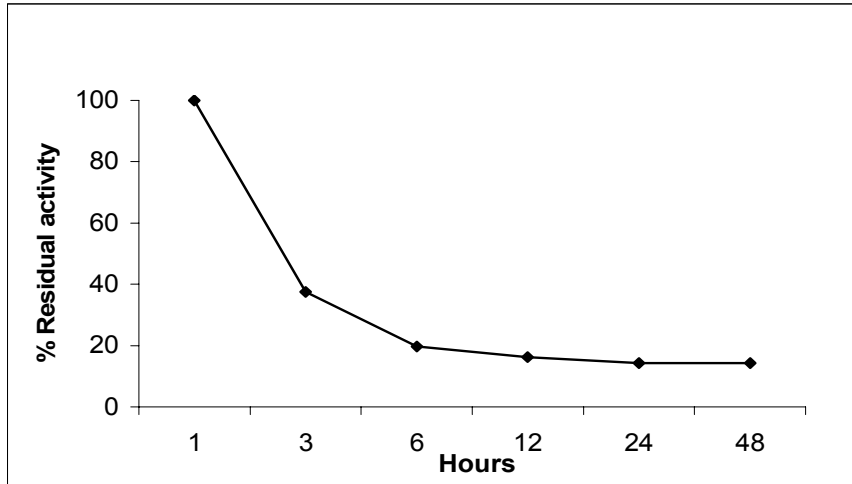


Figure 1: Percentage of MTGase residual activity.

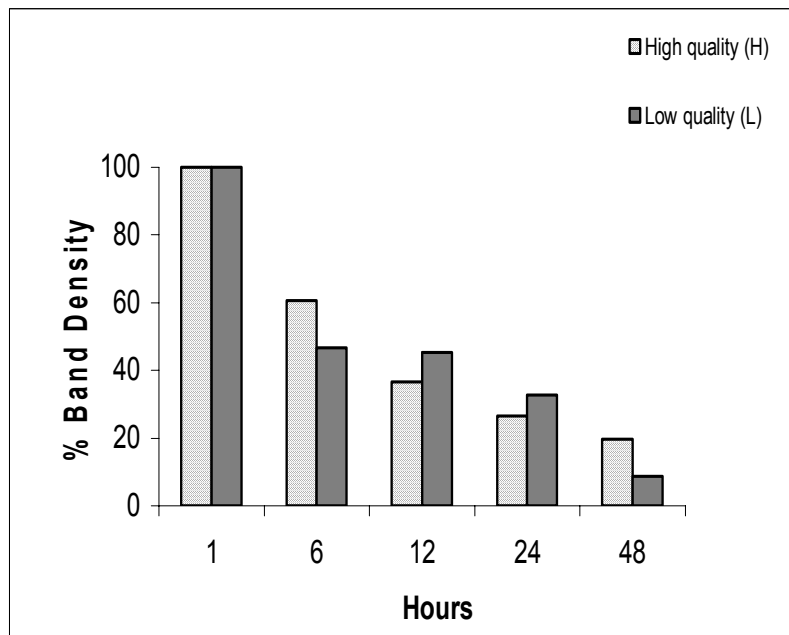


Figure 2: Percentage of MHC Band Density.

**V.2.1.3.- GELIFICACIÓN EN FRIO DE MÚSCULO DE MERLUZA
EMPLEANDO TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA Y EL EFECTO DE LA
CONCENTRACIÓN DE CLORURO SÓDICO Y EL pH.**

“Gelation of fish muscle using Microbial transglutaminase and the effect of sodium chloride and pH levels.”

H.M. Moreno, J. Carballo and J. Borderías.

Journal of Muscle Food. Aceptado Julio 2008

GELATION OF FISH MUSCLE USING MICROBIAL TRANSGLUTAMINASE AND THE EFFECT OF SODIUM CHLORIDE AND pH LEVELS

H.M. MORENO, J. CARBALLO and J. BORDERÍAS

**Departamento de Ciencia y Tecnología de la Carne y Pescado, Instituto del Frío
(CSIC), C/ José Antonio Nováis, 10, 28040 Madrid, Spain.**

***Corresponding author. Tel: +3491 5492300; Fax: +3491 5493627. E-mail address:
jborderias@if.csic.es (A.J. Borderías)**

ABSTRACT

Texturizing products by protein setting reinforced by Microbial Transglutaminase (MTGase), which forms covalent bonds between proteins, makes it possible to obtain minimally processed products in a raw state that can be commercialized in fresh or cooked products. In the present paper microbiological analysis determined that restructured products would have a shelf life of up to 14 days (at 2 °C) if the pH of the samples were 6.0. The physicochemical properties of restructured fish muscle with added MTGase (0.5%-1.0%) set at 5 °C for 48 hours at different pH (6 and 6.8) and sodium chloride concentrations (0.5%, 1.5%, 4.0%) were studied. pH had the greatest effect on the raw product's mechanical properties at low or medium NaCl concentrations, while at high NaCl concentrations no differences between either pH were found. More than 0.5% MTGase had very little effect on the mechanical properties of restructured muscle.

PRACTICAL APPLICATIONS

The main aim is to establish bases for using fish fillet trimmings and minced muscle to prepare restructured products that can be commercialized in a raw state. One possibility is to process this kind of products with technologies normally used in whole fish muscle such as smoked fish fillets, carpaccios or marinated products. In addition, these raw restructured products can be commercialized to be cooked as a normal fresh fish fillet or pieces of fillet in a variety of preparations. Nowadays, most restructured products are thermically treated and this limits their consumption. One way of achieving raw restructured products is to use Microbial Transglutaminase to bind small pieces of the muscle. Knowledge of the effect of the combined action of salt and Transglutaminase on fish muscle would be important to develop products with the right consistence. It would also be important for these products to have a low pH to extend their shelf life.

Key words: Sodium Chloride, pH, Microbial Transglutaminase, Restructured Fish products.

INTRODUCTION

The recent increase in demand for “fresh products” has prompted the study of restructured products based on chopped or minced raw fish muscle with an appearance and eating characteristics similar to cuts from intact muscles instead of the cooked appearance that most restructured products currently have. These cold-set products could be cooked in the same way as fish fillets or processed in many ways, for instance as marinated products, “sushi”, carpaccio, or as a ready-to-cook fish fillet analog.

There are some different methods that can be used to prepare this kind of value-added fish products; one of them is the addition of Microbial Transglutaminase (MTGase). It is well known that MTGase catalyzes covalent bonds between the ϵ -amino group of lysyl residues and the γ -carboxamide group of glutamyl residues of adjacent proteins (Seki *et al.* 1998; Uresti *et al.* 2006). MTGase is an extracellular enzyme produced by several microorganisms of the *Streptomyces spp.*, among others.

A large number of papers have been published on meat-based products using MTGase to bind pieces of meat muscle, but not many have studied its action on fish muscle. Moreover, all of them have studied the action of the enzyme at its optimum temperature condition which is 25-35 °C (Jiang *et al.* 2000; Uresti *et al.* 2004; Ramirez *et al.*, 2006; Ramirez *et al.* 2007) and after up to 60-70 °C. The present work studies gelation of fish muscle at 5 °C with different concentrations of MTGase added.

Gelation of muscle to which MTGase is added will be due to both the action of MTGase and the ability of myofibrillar protein to set in the presence of salt and, in both instances, everything will depend on endogenous TGase and parameters such as ionic strength, pH, and temperature. Owing to the low temperature setting chosen, to maintain the muscle's raw appearance and not activate microbial growth, polymerization will be potentiated by adding sodium caseinate to enhance MTGase activity (Kuraishi *et al.* 1997).

Furthermore, lowering final pH in the batter can be used as a tool to control or reduce microorganism growth in the restructured product with the idea of increasing its shelf life in chilled storage. It should also be highlighted that the few antimicrobial additives allowed by EU laws, namely benzoates and sorbates, are more active at low pH. Low pH does not have any effect on MTGase activity because its range of activity is between 5 to 8, and this holds true even at pH 4 or 9 (Motoki and Seguro, 1998; Ramírez *et al.*

2000 and Tellez-Luis *et al.* 2004). Anyway, although MTGase is able to work in a range of pH, some pH values could modify myofibrillar protein functionality and impair the quality of the final product (Shikha *et al.* 2006).

Additionally, different kinds of restructured products have a different percentage of salt in their formulas, which can also be used to control microflora growth. MTGase activity when it is added to a muscular substrate is believed to be independent of NaCl concentration (Kuraishi *et al.* 1997; Tellez-Luis *et al.* 2002; Uresti *et al.* 2004), but the final texture properties will also depend on salt-induced gelation that determines protein swelling and solubilization, which will affect the posterior bonding.

The aim of this work was to determine the effect of different NaCl and pH levels on restructured fish muscle to which different concentrations of Microbial Transglutaminase were added at a gelation temperature of 5 °C during different setting times.

MATERIALS AND METHODS

Raw materials and additives

Like raw material, frozen stored (-20°C) blocks of hake fillets (*Merluccius capensis*) captured two or three months before the starting of work were used.

Ingredients added to elaborate the restructured lots were: sodium chloride (Panreac, Quimica, S.A.; Barcelona, Spain), sodium caseinate (Julio Criado Gómez, S.A. Madrid, Spain), citric acid (Panreac, Quimica, S.A.; Barcelona, Spain) and MTGase (Activa WM (99% maltodextrine and 1% MTGase from *Streptoverticillium sp.*) with an activity of aprox. 100 U g⁻¹ (Ajinomoto Co.; Tokio, Japan) were used.

Sample preparation

Hake fillets were ground in a meat mincer (FTS 11 Model, Van Dall SRL, Milano, Italy) with a size of hole of 20 mm. Then the mince was mixed with the others components in a refrigerated homogenizer (Hobart N-504, Hobart Corporation, U.S.A). Sequence of adding were: sodium chloride, sodium caseinate and MTGase solved in an small portion of water (5%) which is added to all formula. Proportion of different ingredients in each lot are in Table 1. With each component of the sample the mixture is homogenized for 1 min. After adding all ingredients the batter is homogenized again for 2 min. To low dawn the initial pH to pH 6, a 60% solution of citric acid was added. Plastic plates of 16 mm deep and round shape ($\varnothing=96$ mm) were full of samples after mixing and placed in plastic bags. Afterwards, they were placed in a chilled room (5°C) during different periods of setting time (1, 6, 24 and 48 hours). More than 48 h have not studied because have seen in previous work in the lab, that changes were not significant. Lots at pH 6.8 were named H1, H2, H3, H4, H5 and H6 and lots at pH 6 were named L1, L2, L3, L4, L5 and L6 depending on both cases, of ingredients added following Table 1.

Proximate Analysis and pH

Moisture, fat and ashes of the raw sample were determinated (AOAC 2000) in cuatruplicated. Crude protein content was measured in quatruplicate by a LECO FP-2000 Nitrogen Determinator (Leco Corporation, St Joseph, MI, USA). The pH value of restructured samples was determined following Vyncke (1981).

Viscosity measurement

Apparent viscosity of muscle homogenate was measured according to Borderías *et al.* (1985) with slight modifications, to know the overall quality of frozen fillets (Barroso *et al.* 1998). Thawed samples were homogenized with 5% NaCl (1:4) in a phosphate buffer, pH 7. The homogenate was filtered through a gauze and centrifuged for 10 min at 345xg to remove air bubbles. Measurement were made with a RV4 spindle, using a Brookfield model DV-III rheometer (Stoughton, MA) and Rheocalc V 1.2 software system. Measurements were carried out in triplicate and results were expressed in centipoises (cP).

Microbiological analyses

To carry out the microbial analysis two samples at different pH (samples L1 y H1) were made. Samples were chilled during 21 days at 2-3 °C. Analysis were performed days 1,7,14 and 21 following norm AENOR (1999). The sample preparation was done in a vertical laminar-flow cabinet (model AV 30/70, Telstar, Madrid, Spain). For each sample, 10g (in duplicate) was taken and placed in a sterile plastic bag (Sterilin, Stone, Staffordshire, UK) with 90 ml of peptone water (0.1%) with 0.85 % NaCl (Panreac Quimica, S.A. Barcelona, Spain). After 1 min in a stomacher blender (Colworth 400, Seward, London, UK), appropriate decimal dilutions were pour-plated on the following media: Plate Count Agar (PCA), (Merk, Germany) for total viable count (30 °C for 3-5 days); and Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG) (Merck, Germany) for Enterobacteriaceae (37 °C for 24h). Counts were expressed as logarithms of colony forming units per gram (log CFC/g).

Water Binding capacity (WBC)

A frozen sample (2g) was cut into small pieces and placed in a centrifuge tube ($\varnothing=10$ mm) with enough pipet filter (Gilson, Inc. Middenton, WI 53562 USA) as absorber. The muscle was thawed in a tube and then centrifuged in Jouan MR1812 centrifuge (Saint Nazaire, France) for 10 min at 3000xg at room temperature. Water Binding capacity (WBC) was expressed as percent water retained per 100g water present in the muscle prior of centrifuging.

Electroforesis (SDS-PAGE)

Aprox. 0.05 g of muscle samples were treated with a denatured solution consisting of 5% 2- β -mercaptoethanol, 2.5% sodium dodecyl sulphate (SDS), 10 mM Tris-HCl, 1mM ethyl-enediaminetetraacetic acid (EDTA) and 0.002% bromophenol blue, following Hames (1985), and the final average concentration was adjusted to 2 mg/ml. The samples were heated for 5 min at 100°C. Electrophoresis assays were performed on a PhastSystem apparatus (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden) using 12.5% polyacrylamide gels supplied by Pharmacia LKB Biotechnology AB.

Electrophoretics conditions were 10 mA, 250V and 3.0 W and temperature 15°C. Protein bands were stained with Coomassie brillanty blue, commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB as “PhastGel Blue R” tablets. An aqueous solution of 30% methanol and 10% acetic was used for destaining, and a solution of 5 % glycerol and 10% acetic acid as a preservative. The reference standar used for molecular weights was a commercial high molecular weight (HMW) calibration kit from Pharmacia LKB Biotechnology AB, consisting of: myosin (220 kDa), α_2 -macroglobulin (170 Kda), β -galactosidase (116kDa), transferrin (76kDa) and glutamic dehydrogenase (53 kDa). The

disappearing rate of the myosin heavy chain band on the electrophoresis profile was analyzed by the programme ID-Manager v. 2.0 (TDI S.A, Madrid, Spain).

Mechanical properties

Binding strength was carried out at room temperature. Four cylindrical samples (16 mm deep and round shape 96 mm) by each time were measured to assess the ability of the muscle pieces to adhere to one another (bind strength), in a procedure similar to that of Field *et al.* (1984). The bind strength (BS) was measured as the peak force (N) required for a $\varnothing=1.9$ cm ball, at a cross head speed of 100 mm/min (in a 50 N load cell), to break through a fish slice mounted on a ring of 3.2 cm inner diameter. Elongation was estimated as the distance (mm) travelled by the ball after contact with the sample surface before the ball burst through (peak force). The analysis was performed using TA-XT plus Texture Analyser (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY, USA).

Sensory Analysis

For sensory analysis, the texture profile method was used. Samples from different lots (pieces 2 cm thick) were grilled in a frying pan with a drop of sunflower oil for 3-4 min until they were more than 70 °C in their centers. The samples were given to the semi-trained group of six panelists, who were asked to evaluate the different texture parameters of the lots on a non-structured 10 cm scale. After the first 3 bites firmness (force required to compress the material between the teeth or between tongue and palate) and wetness (ability to release drip on first compression) were evaluated. Next, with the other bites and until swallowing, hardness (resistance to break down on chewing to a state for swallowing) and succulence (sensation of juiciness in the mouth

just before being swallowed) were evaluated. Each point marked by the six panelists was converted to a numerical scale from 0 to 10.

Statistical Analysis

One-way analysis of variance were carried out with the SPSS[®] computer programme (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) , and differences between pairs of mean at different pH parameters values were evaluated by the Bonferroni test using a 95% confidence interval. Two way ANOVA was conducted in the rest of data analysis using Statgraphics 2.1 (STSC Inc., Rockville, MD). The difference among means was analysed using a Tukey HSD test ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Proximate and functional analysis of fish muscle

The major constituents of the raw sample were: moisture $80.82 \pm 0.14\%$, protein $16.25 \pm 0.77\%$, fat $1.22 \pm 0.22\%$ and ashes $1.62 \pm 0.08\%$. The apparent viscosity determined in a muscle homogenated in 5% NaCl was 4989 ± 100 cP. From these viscosity data, the functional quality of this fish muscle could be rated between high and good (Barroso *et al.* 1998). It is known that the functional protein quality of muscle is of great importance in the physicochemical properties of the resulting restructured product.

Microbiological analyses throughout chilled storage

Table 2 shows the bacterial count (total viable count and enterobacteriaceae) throughout chilled storage. It is observed that while the total count after 5 °C of storage in lot H1 (pH 6.8) is around 10^6 cfu/g after 7 days, in lot L1 (pH 6) the total count is 10^3 cfu/g.

Lot L1 reaches values of 10^6 CFU/g at 21 days of storage. Bearing in mind that the microbial limits recommended by Official Spanish Recommendations (B.O.E., 1991) is 10^6 , lowering pH to 6 should be important to keep the samples more than one week in cold storage and achieve a reasonable commercialization time.

Water binding capacity

Water binding capacity (WBC) data are shown in Table 3. At the beginning of the setting period when MTGase did not have enough time to work, it is observed that the increase in salt concentration causes higher WBC, which is explained by the fact that chloride ions bind to myofibrillar proteins and raise the electrostatic repulsion between filaments, thereby causing expansion of the filament lattice (Hamm, 1972). At 48 hours of setting time, mean data differences between most samples with different MTGase levels are not significant at either pH (Table 3). Moreover, other authors have not found any water binding capacity improvement with the addition of MTGase to the muscle of pork (O'Kennedy, 2000), poultry (Kerry et al 1999) and beef (Cofrades et al, 2006). Fisher (1999) and Kuraishi *et al.* (2001) also stated that transglutaminase had the potential to improve WBC. These differences could be due to the level and type of MTGase used and the processing conditions.

WBC values are lower at low pH (although the differences are not always statistically significant), which corresponds to a more exudative appearance in the samples at pH 6. This is because when pH is close to 5-5.5, corresponding to the isoelectric point of the major myofibrillar proteins, the electrostatic repulsions between filaments are the lowest leading to a shrunk filament lattice in contrast to higher muscle pH (Offer and Knight, 1988).

Electrophoresis analysis

Table 4 shows the density percentage of the Myosin Heavy Chain (MHC) band in relation to all the protein bands obtained in each sample throughout 48 hours of setting time in all lots at pH 6.8. It is seen that the greater the concentration of NaCl in the sample, the higher the density of the MHC band. This could be because high salt concentration increases the electrostatic repulsion between myofilaments (Hamm, 1972) and the myosin molecule is depolymerized (Offer and Trinick, 1983) resulting in more difficult polymerization. It could also be that when the concentration of NaCl is higher, more swelling loosens the structure and the myosin tails are more separated (Offer and Knight 1988) resulting in more difficult polymerization. This could explain why samples with a higher concentration of salt have a lower strength than the rest (Table 5).

Band density is lower after 48 hours because of the polymerization of solubilized proteins from the action of the added MTGase and internal TGase. Other bonds that are established are cleaved by the electrophoresis buffer used. The difference between the density of bands just after elaboration of samples and after 48 hours gives us the percentage of polymerization in this period. In samples with enough NaCl to solubilize proteins at a high degree (samples H3 to H6), this difference is lower when 1% MTGase is used. This means that higher concentration of 0.5% MTGase, did not results in a higher polymeization.

Binding test

Binding test parameter values are shown in Tables 5 and 6. The binding strength of the different samples present changes throughout the study period (48 hours), especially at pH 6.8. During the setting time of 48 h, strength rises sharply in the samples with 0.5

and 1.5 % salt, but the rise is lower when the salt concentration is 4%. Kuraishi *et al.* 1997 and Jiménez-Colmenero *et al.* (2005) reported that soluble myofibrillar proteins are a good substrate for cross-linking reactions with MTGase, but this is not what happened in samples H5 and H6 with 4% NaCl, which is an optimum concentration to solubilize myofibrillar proteins. The electrophoresis study showed that these two samples present denser HMC bands, which means lower polymerization and also lower polymerization after 48 hours. It seems that there is a critical concentration of salt solubilization for MTGase activity and with much solubilization steric difficulties could occur as explained earlier.

Strength is significantly higher in samples with pH 6.8 than a lower pH, except in samples with 4% salt. Similar results were obtained by Shikha *et al.* (2006) in whalley Pollack surimi and they reported that this was due to the denaturation of the fraction of MHC myofibrillar protein by pH shifting. They reported that the degradation might be due to cathepsin L protease that is more active in the acid region. In addition, Lee *et al.* (1997) reported that internal transglutaminase is more active at neutral pH. The Ajinomoto Co., Inc. manual reported too that MGTase is more active at pH7 but also at pH 6 and even pH 5. Also, Ho *et al.* (2000) reported that MTGase extracted from some species of microorganisms has maximum activity at pH 6. With all these pH data, it looks as if the lowering of the breaking strength at low pH is because protein molecules have lower net charge and fewer bonds are established between them, rather than because of the lower MTGase activity.

The MTGase concentration used is higher than what other authors use in fish muscle substrate (Yongsawatdigul *et al.* 2005; Uresti *et al.* 2004) who use around 0.3%, equivalent to 0.3 Ug^{-1} , while in the present paper 0.5-1.0%, equivalent to $0.5-1.0 \text{ Ug}^{-1}$ was used. The reason why the authors of the present study used a higher (greater)

concentration is because other previous experiments on hake muscle carried on by them self. In Tables 5 and 6 it is observed that there is a trend, not always significant, of higher strength when more (1%) MTGase is added.

In samples with 4% NaCl (H5, H6, L5 and L6), the bind strength is independent of the pH studied (Table 7). In samples that were set for 48 hours strength is lower than the rest of the samples at pH 6.8 and higher than the rest at pH 6. With lower salt concentration (H1- H4 and L1- L4) the bind strength depends on the concentration of salt when pH is 6.8 but not when it is 6.0. This could be explained by the fact that at neutral pH, myofibrillar proteins swell and partially solubilize with 1.5 % NaCl but not with 0.5 %. This does not happen at low pH because the protein molecules are aggregated due to the net charge (Ham, 1972). This can only be partially modified when more salt is added (4% in samples L5 and L6).

Concerning the elongation results (Tables 5 and 6), there are also changes during the setting time up to 48 hours, but these changes are proportionally lower than for the bind strength. The trend in this data in relation to MTGase concentration, pH and salt concentration is very similar to the strength data. However, 4% salt concentration at pH 6.8 does not affect elongation to the same extent as it does bind strength.

In samples at low pH, high (4%) salt concentration is very important to prepare a product with sufficient mechanical properties to keep it intact during commercialization and obtain sufficient texture to be consumed in both a raw and cooked state.

Sensory Analysis

The sensory analysis results are shown in Table 8. No differences were observed in the firmness of the different cooked samples with the exception of samples H2 and L1 containing a very small amount of salt (0.5% NaCl). Cooking preparation at 70-80 °C is sufficient to establish enough bonds to maintain sample firmness, especially when the

samples contain 1.5 % NaCl or more. No effect is observed in cooked sample firmness in relation to the amount of MTGase studied.

Differences in wetness, the same as for WBC, do not correspond to the concentration of MTGase added. Wetness only depends on the pH in the samples with a smaller amount of salt (H1, H2, L1 and L2) and MTGase (samples H1 and L1). Wetness in the cooked samples is related to WBC because for both aspects there is a trend in the samples with less amount of salt to have more drip-release.

Also, the hardness and succulence values seems to depend more on the amount of salt than on the pH and amount of MTGase.

CONCLUSIONS

Within the range of NaCl and MTGase concentrations studied and pH values considered, it could be concluded that a concentration of 0.5 % MTGase is sufficient to obtain good mechanical properties in raw hake muscle restructured products, and higher concentrations do not have clearly greater effects when the setting is done at 5 °C for 48 hours.

From the microbiological point of view, pH 6 in raw restructured products seems ideal because the shelf life is extended to 14 days at 2 °C instead of 7 days in samples at pH 6.8. Anyhow, restructured products with 0.5 and 1.5% NaCl prepared at pH 6 have considerably less bind strength and elongation in a raw state than samples prepared at pH 6.8, which makes it difficult for them to remain intact during commercialization and, for instance, be sliced if this is the purpose of the product. Also, samples at pH 6 exude some more drip. When 4% NaCl concentration was used, the mechanical properties studied in the raw restructured product were similar for both pH studied

(poorer than other samples with less salt concentration at pH 6.8 and higher than other samples with less concentration at pH 6).

The water binding capacity of raw samples depends on the salt concentration and pH of the samples but not on MTGase concentration.

The texture of the restructured product after heating at 70-80 °C will depend more on the amount of salt than on the other parameters studied.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas for the Predoctoral Scholarship under program I3P-2004. Thanks to S.I.E. from Instituto del Frío (CSIC) for the help in the statistical analysis.

REFERENCES

- AENOR. 1999. Norma AF V 08-051. Microbiological Standards Recopilation of Food and assimilated and other physical-chemical parameters of health.
- AOAC. 2000. In: AOAC, editor. . 17th ed. Maryland, USA: Association of Official Analytical Chemistry.
- B.O.E . 1991. Official State Bulletin 195, 15/08/91. By approving the microbiological standards, limits on heavy metals content and analytical methods for determination of heavy metals for fishery products and aquaculture.
- BORDERÍAS, A.J., JIMÉNEZ-COLMENERO, F. and TEJADA, M. 1985. Parameters Affecting Viscosity as a Quality-Control for Frozen Fish. *Mar. Fish. Rev.* 47(4),43-45.

- BARROSO, M., CARECHE, M. and BORDERÍAS, A.J. 1998. Quality control of frozen fish using rheological techniques. *Trends Food Sci. Technol.* 9(6), 223-229.
- FISHER, R.A. 1999. Seafood restructuring using cold-set binding technology. VSGCP-G-99-002:16.
- COFRADES, S., AYO, J., SERRANO, A., CARBALLO, J. and JIMÉNEZ-COLMENERO, F. 2006. Walnut, microbial transglutaminase and chilling storage time effects on salt-free beef batter characteristics. *Eur. Food Res. Technol.* 222, 458-466.
- FIELD, R.A., WILLIAMS, J.C., PRASAD, V.S., CROSS, H.S., CROSS, H.R., SECRIST, J.L. and BREWER, M.S. 1984. An Objective Measurement for Evaluation of Bind in Restructured Lamb Roasts. *J. Texture Stud.* 15(2), 173-178.
- HAMES, B.D. 1985. *An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis.* : Oxford: IRL Press. 1-86.
- HAMM, R. 1972. *Kolloidchemie des Fleisches. Das Wasserbindungsvermögen des Muskeleiweisses in Theorie und Praxis.*
- HO, M.L., LEU, S.Z., HSIEH, J.F. and JIANG, S.T. 2000. Technical Approach to Simplify the Purification Method and Characterization of Microbial Transglutaminase Produced from *Streptovorticillium ladakunum*. *J. Food Sci.* 65(1), 76-80.
- JIANG, S.T., HSIEH, J.F., HO, M.L. and CHUNG, Y.C. 2000. Microbial transglutaminase affects gel properties of golden threadfin-bream and pollack surimi. *J. Food Sci.* 65(4), 694-699.
- JIMÉNEZ-COLMENERO, F., AYO, M.J. and CARBALLO, J. 2005. Physicochemical properties of low sodium frankfurter with added walnut: effect of transglutaminase combined with caseinate, KCL and dietary fibre as salt replacers. *Meat Science* 69, 781-788.

- KERRY, J.F., MORRISSEY, P.A. and BUCKLEY, D.J. 1999. The rheological properties of exudates from cured porcine muscle: effects of added polysaccharides and whey protein/polysaccharide blends. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1260-1266.
- KURAIISHI, C., SAKAMOTO, J., YAMANAZAKI, K, SUSAY., KUHARA, C. and SOEDA, T. 1997. Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *J. Food Sci.* 62(3),488-490+515.
- KURAIISHI, C., YAMAZAKI, K. and SUSAY, Y. 2001. Transglutaminase: Its utilization in the food industry. *Food Rev.* 17(2), 221-246.
- LEE, H.G., LANIER, T.C., HAMMANN, D.D and KNOPP, J. A. 1997. Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein sols. *J. Food Sci.* 62(1), 20-24.
- MOTOKI, M. and SEGURO, K. 1998. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Sci. Technol.* 9 (5), 204-210.
- OFFER, G. and TRINICK, J. 1983. On the mechanism of Water Holding in Meat: The swelling and the Shrinking of Myofibrils. *Meat Sci.* 8, 245-281.
- OFFER, G. and KNIGHT, P. 1988. The structural basis of water-holding in meat. Part 1: General principles and water uptake in meat processing. In R. Lawrie (Ed), *Developments in meat science*, vol.4, 63-171. London: Elsevier Applied Science.
- RAMÍREZ J.A., DEL ANGEL, A., VELÁZQUEZ, G. and VAZQUEZ, M. 2006. Production of low-salt restructured fish products from Mexican flounder (*Cyclopsetta chittendeni*) using microbial transglutaminase or whey protein concentrate as binders. *Eur. Food Res. Technol.* 223(3), 341-345.
- RAMÍREZ J.A., DEL ANGEL, A., VELÁZQUEZ, G. and VAZQUEZ, M. 2007. Low-salt restructured products from striped mullet (*Mugil cephalus*) using microbial

transglutaminase or whey protein concentrate as additives. *Food Chem.* 102(1), 243-249.

RAMÍREZ, J.A., SANTOS, I.A., MORALES, O.G., MORRISEY, M.T. and VÁZQUEZ, M. 2000. Application of Microbial Transglutaminase to improve mechanical properties of surimi from silver carp. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 3(1), 21-28.

SEKI, N., NOZAWA, H. and Ni, S.W. 1998. Effect of transglutaminase on the gelation of heat-denatured surimi. *Fish Sci.* 64(6), 959-963.

SHIKA, F.H., HOSSAIN, M.I., Morioka, K., KUBOTA, S. and ITOH, Y. 2006. Effect of decreasing pH on gel microstructure of walleye pollack surimi. *Fish Sci.* 72(5), 1127-1129.

TÉLLEZ-LUIS, S.J., URESTI, R.M., RAMÍREZ, J.A. and VÁZQUEZ, M. 2002. Low-salt restructured fish products using microbial transglutaminase as binding agent. *J. Sci. Food Agric.* 82(9), 953-959.

URESTI, R.M., TÉLLEZ-LUIS, S.J., RAMÍREZ, J.A. and VÁZQUEZ, M. 2004. Use of dairy proteins and microbial transglutaminase to obtain low-salt fish products from filleting waste from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chem.* 86(2), 257-262.

URESTI, R.M., VELÁZQUEZ, G, VÁZQUEZ, M., RAMIREZ J.A and TORRES, J.A. 2006. Effects of combining microbial transglutaminase and high pressure processing treatments on the mechanical properties of heat-induced gels prepared from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). *Food Chem.* 94, 202-209.

VYNCKE, W. 1981. Influence of Citric-Acid on the Shelf-Life of Saithe and Redfish. *Revue De L Agriculture* 34(1), 149-154.

YONGSAWATDIGUL, J. and PARK, J.W. 2004. Effects of alkali and acid solubilization on gelation of characteristics of rockfish muscle proteins. *J. Food. Sci* 69(7),C312-C319.

TABLE 1.
COMPOSITION OF SAMPLES AT DIFFERENT pH

Samples*	% NaCl	% Sodium caseinate	% MTGase	% H ₂ O
L1/ H1	0.5	0.75	0.5	5.0
L2/ H2	0.5	0.75	1.0	5.0
L3/ H3	1.5	0.75	0.5	5.0
L4/ H4	1.5	0.75	1.0	5.0
L5/ H5	4.0	0.75	0.5	5.0
L6/ H6	4.0	0.75	1.0	5.0

*L (pH 6) and H (pH 6.8)

TABLE 2.
MICROBIAL ANALYSES DURING CHILLING STORAGE OF RESTRUCTURED PRODUCTS

Storage (Days)	Microbial counts			
	Total viable count (log CFU/g)		Enterobacteriaceae (log CFU/g)	
	L1*	H1*	L1*	H1*
1	3.568 ^a ₁	3.568 ^a ₁	2.079 ^a ₁	1.954 ^a ₁
7	3.414 ^b ₁	6.342 ^a ₂	2.301 ^a ₁	2.001 ^a ₁
14	5.749 ^b ₂	6.699 ^a ₂	2.845 ^a ₁	2.001 ^a ₁
21	6.898 ^b ₃	7.505 ^a ₃	4.202 ^b ₂	2.778 ^a ₁

Different letters a, b, c, etc indicate significant differences between different pH samples L and H (P≤0.05).

Different numbers 1, 2, 3, etc indicate significant differences between different storage days (P≤0.05).

* Sample codes as Table 1.

TABLE 3.
WBC OF SAMPLES AT pH 6 and pH 6.8

Samples*	pH 6.8			pH 6		
	1	24	48	1	24	48
L1/ H1	70.9±3.9 ^a ₁	75.3±0.9 ^a ₁	77.3±4.4 ^a _{1,2}	57.4±1.4 ^a _{1,3}	67.6±2.9 ^a ₁	71.1±3.3 ^a ₁
L2/ H2	67.6±0.4 ^a _{1,3}	72.6±4.1 ^a ₁	75.7±2.5 ^a _{1,2}	56.8±3.2 ^a ₁	75.1±4.8 ^b ₁	68.6±1.3 ^{ab} _{1,2}
L3/ H3	71.9±0.4 ^a ₁	80.9±0.9 ^{ab} ₁	84.1±2.3 ^b ₁	64.6±3.4 ^a ₂	58.5±2.9 ^b ₁	57.6±2.1 ^b ₂
L4/ H4	78.7±0.4 ^a _{1,2}	80.0±2.9 ^a ₁	73.5±5.7 ^a ₂	57.6±6.1 ^a _{1,2}	59.2±0.8 ^a ₁	60.9±5.6 ^a _{1,2}
L5/ H5	84.4±1.6 ^a ₂	80.5±3.9 ^a ₁	76.6±5.7 ^a _{1,2}	71.1±1.6 ^a _{2,3}	69.2±1.4 ^a ₁	69.5±0.9 ^a _{1,2}
L6/ H6	82.8±1.6 ^a _{2,3}	82.2±0.7 ^a ₁	73.4±0.3 ^a ₂	68.4±0.9 ^a _{1,2,3}	69.6±3.9 ^a ₁	73.4±3.6 ^a ₁

Different letters a, b, c, etc indicate significant differences thorough storage time (P≤0.05).

Different numbers 1, 2, 3, etc indicate significant differences between L and H samples (P≤0.05).

* Sample codes as Table 1.

TABLE 4.
PERCENTAGE OF MYOSIN HEAVY CHAIN OF ELECTROPHORETIC BANDS

Sample*	% NaCl	% MTG	Time (Hours)	% MHC
H1.1	0.5	0.5	1	15.09
H1.2			48	8.52
H2.1	1.5	1	1	15.23
H2.2			48	10.11
H3.1	1.5	0.5	1	12.51
H3.2			48	8.09
H4.1	4	1	1	18.19
H4.2			48	16.44
H5.1	4	0.5	1	21.47
H5.2			48	15.06
H6.1	4	1	1	20.43
H6.2			48	19.26

*Sample codes as Table 1

TABLE 5.
BINDING TEST OF RESTRUCTURED PRODUCTS AT pH 6.8

Samples*	Strength (N)				Elongation (mm)			
	1	6	24	48	1	6	24	48
H1	0.96 ±0.14 ^a ₁	1.33±0.11 ^a ₁	4.20±0.85 ^b ₁	4.43±0.65 ^b ₁	11.77±0.98 ^a _{1,2}	13.30±0.71 ^{ab} _{1,2}	16.99±1.71 ^c ₁	15.90±1.22 ^{bc} ₁
H2	1.06±0.14 ^a ₁	2.85±0.24 ^b ₂	4.29±0.83 ^c ₁	5.68±0.34 ^d ₂	12.24±1.33 ^a _{1,2}	16.14±0.45 ^b ₂	15.99±0.42 ^b ₁	16.41±0.69 ^b ₁
H3	1.10±0.10 ^a ₁	2.28±0.13 ^b ₂	4.44±0.38 ^c ₁	5.85±0.62 ^d ₂	13.52±0.85 ^a ₁	14.17±0.37 ^a _{1,2}	15.63±0.88 ^a ₁	15.61±0.97 ^a ₁
H4	1.31±0.13 ^a ₁	2.80±0.28 ^b ₂	5.67±0.35 ^c ₂	7.31±0.56 ^d ₃	14.36±1.10 ^a ₁	14.49±0.99 ^a _{1,2}	15.73±0.60 ^a ₁	14.59±0.28 ^a ₁
H5	0.64±0.18 ^a ₁	1.13±0.05 ^a ₁	1.64±0.19 ^a ₃	2.84±0.13 ^b ₄	9.91±0.69 ^a ₂	11.67±0.30 ^a ₁	12.42±0.26 ^{ab} ₂	14.60±0.79 ^b ₁
H6	0.98±0.03 ^a ₁	1.42±0.09 ^a ₁	1.85±0.10 ^a ₃	3.08±0.21 ^b ₄	11.77±0.98 ^{ab} _{1,2}	13.54±0.88 ^{ab} _{1,2}	11.11±0.02 ^a ₂	14.57±0.64 ^b ₁

Different letters a, b, c, etc indicate significant differences thorough the storage time (P≤0.05).

Different numbers 1, 2, 3, etc indicate significant differences between L and H samples (P≤0.05).

* Sample codes as Table 1.

TABLE 6.
BINDING TEST OF RESTRUCTURED PRODUCTS AT pH 6

Samples*	Strength (N)				Elongation (mm)			
	1	6	24	48	1	6	24	48
L1	0.36±0.07 ^a _{1,2}	0.52±0.05 ^a ₁	0.86±0.13 ^b ₁	1.12±0.15 ^b _{1,3}	7.72±1.21 ^a ₁	8.41±0.81 ^{ab} ₁	9.80±0.54 ^b ₁	10.57±0.99 ^b ₁
L2	0.37±0.02 ^a _{1,2}	0.77±0.05 ^b ₁	1.12±0.24 ^c _{1,2}	1.26±0.38 ^c _{1,3}	8.57±0.92 ^a _{1,4}	9.88±1.27 ^{ab} _{1,3}	10.72±1.34 ^b ₁	10.10±0.31 ^{ab} ₁
L3	0.34±0.04 ^a ₁	0.66±0.06 ^{ab} ₁	0.88±0.31 ^b ₁	0.79±0.18 ^b ₂	7.58±0.77 ^a _{1,3}	8.42±0.36 ^{ab} ₁	9.91±0.50 ^b ₁	9.39±0.58 ^{ab} ₁
L4	0.46±0.07 ^a _{1,2}	0.73±0.04 ^a ₁	1.33±0.11 ^b ₂	1.42±0.28 ^b ₃	8.93±1.01 ^a _{1,2}	10.18±0.99 ^{ab} _{1,2}	11.54±0.68 ^b _{1,3}	11.25±0.91 ^b _{1,2}
L5	0.67±0.06 ^a ₂	1.13±0.06 ^b ₂	1.69±0.22 ^c ₃	2.20±0.16 ^d ₄	10.85±0.45 ^a _{2,3,4,5}	10.98±0.43 ^a _{2,3,4}	11.69±1.05 ^a _{1,2}	12.70±0.60 ^a _{2,3}
L6	0.86±0.07 ^a ₂	1.49±0.11 ^b ₃	2.43±0.10 ^c ₄	2.92±0.25 ^d ₅	12.17±1.12 ^a ₅	12.44±0.37 ^a ₄	13.26±0.46 ^a ₂	13.35±1.66 ^a ₃

Different letters a, b, c, etc indicate significant differences thorough storage time (P≤0.05).

Different numbers 1, 2, 3, etc indicate significant differences between L and H samples (P≤0.05).

* Sample codes as Table 1.

TABLE 7.
MEANS SIGNIFICANT BETWEEN ANALYSIS DATA OF SAMPLES AT DIFFERENT pH.

Samples ^a	1H			6H		24H			48H		
	WBC	Strength	Elongation	Strength	Elongation	WBC	Strength	Elongation	WBC	Strength	Elongation
H1/L1	**	**	***	**	***	NS	***	***	NS	***	***
H2/L2	***	*	**	***	***	*	***	***	NS	***	***
H3/L3	*	**	***	***	***	**	***	***	*	***	***
H4/L4	NS	**	***	***	***	***	***	***	***	***	***
H5/L5	**	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	*	***
H6/L6	***	NS	NS	NS	NS	**	NS	*	*	NS	NS

*** significant at P<0,001; ** significant at P<0,01; * significant at P<0,05; NS: not significant

^a Samples codes as Table 1

TABLE 8: RESULTS TEST PANEL

Samples	Parameters tested			
	Firmness	Wetness	Hardness	Suculence
H1	4.5±1.1	5.7±0.9	5.4±1.4	3.2±1.5
H2	3.8±1.4	5.5±1.1	4.0±1.2	4.9±1.2
H3	6.3±1.1	4.5±0.5	5.6±1.0	5.0±0.9
H4	5.2±0.9	4.4±0.8	4.9±0.8	6.2±0.7
H5	6.8±1.1	3.6±1.4	6.0±1.0	5.0±0.9
H6	5.6±0.8	5.1±1.4	6.0±0.5	5.7±0.8
L1	3.7±0.8	7.3±1.3	4.2±0.8	3.5±0.7
L2	4.2±1.0	5.1±1.1	5.1±1.7	2.0±1.2
L3	6.1±1.1	5.1±0.9	5.6±0.9	5.4±1.0
L4	5.4±1.1	4.5±1.0	5.6±1.2	4.5±1.5
L5	5.8±0.5	4.1±1.4	5.6±0.6	5.6±1.1
L6	5.9±1.2	4.9±0.8	5.9±1.3	5.8±0.9

*Sample codes as Table 1

V.2.2.- REESTRUCTURADOS ELABORADOS A PARTIR DE SURIMI DE CALAMAR GIGANTE (*Dosidicus gigas*).

V.2.2.1.-MEJORA DE LA GELIFICACIÓN EN FRÍO Y TÉRMICA DE GELES DE SURIMI DE CALAMAR DIGANTE (*Dosidicus gigas*).

“Improvement of cold and thermally induced gelation of giant squid (*Dosidicus gigas*) surimi.”

Helena M^a Moreno, Carlos Cardoso , M^a Teresa Solas, A. Javier Borderías

Enviado a Journal of Aquatic Food Product Technology (En revisión Febrero, 2009)

IMPROVEMENT OF COLD AND THERMALLY INDUCED GELATION OF GIANT SQUID (*Dosidicus gigas*) SURIMI.

Helena M Moreno¹, Carlos Cardoso², M^a Teresa Solas³, A. Javier Borderías^{1*}

¹ Departamento de Ciencia y Tecnología de la Carne y Pescado, Instituto del Frío (CSIC), C/José Antonio Nováis, 10, 28040 Madrid, Spain

² Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas, INRB I.P./L-IPIMAR, Avenida de Brasília, 1449-006 Lisboa, Portugal

³ Departamento de Biología Celular. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense, 28040, Madrid, Spain

*Corresponding author: Tel: +3491 5492300; Fax: +3491 5493627. E-mail address: jborderias@if.csic.es (A.J. Borderías)

ABSTRACT. Depending on the season of capture, giant squid (*Dosidicus gigas*) surimi processed by isoelectric precipitation presents low gel strength. Addition of Microbial Transglutaminase and application of High Isostatic Pressure (300 MPa) to improve physicochemical properties were assayed for purposes of making “suwari” gels and heated gels, with a view to making restructured products which look raw or cooked.

The physicochemical properties of both pressurized and unpressurized gels induced by application of 30 °C/1 hour improved when MTGase was added. In contrast, addition of MTGase was less effective in gels subsequently heated at 90 °C/30 min after 30 °C/1 hour. High pressure treatment for 30 min at 300 MPa and 15 °C helped to produce gels

with better gels mechanical and water binding properties, whether treated for 30 °C/1h only or for 30 °C/1h plus 30 min heat treatment at 90 °C. High pressure treatment also reduced lightness.

KEYWORDS: gelation, giant squid surimi, high pressure, microbial transglutaminase, physicochemical properties.

INTRODUCTION

Depending on season and biological features (for instance size), gels made from giant squid surimi (*Dosidicus gigas*) present lower gel strength than surimi from other species and are therefore unsuitable for the preparation of certain analogue products which require specific textural properties (Sánchez-Alonso et al., 2007a; Lanier, 1986). It is therefore highly desirable to improve their physicochemical properties, either by adding gelation-promoting ingredients or by using specific processing technologies.

A large variety of restructured fish products having a raw or cooked appearance can be prepared with this kind of surimi. The recent increase in demand for “fresh products” has prompted the study of restructured raw-processed products. Such cold-set products could be cooked afterwards by the consumer in the same way as fish fillets or processed in many different ways, for instance as marinated products, “sushi”, carpaccio, or as a ready-to-cook fish fillet analogue. Nowadays there are successful products with a cooked appearance on the market made by thermal gelation (presently the most common way of processing seafood analogues). For this reason it is important to study surimi squid muscle gelation at low temperatures (“suwari” gels) and at high temperatures (heated gels).

There are various methods that can be used to enhance surimi gelation at low and high processing temperatures. One of these is to add Microbial Transglutaminase (MTGase), which has been used as a way of improving physicochemical properties and texture in many different restructured products (Montero et al., 2005, Moreno et al., 2008). This enzyme catalyses covalent bonding between the ϵ -amino group of lysyl residues and the γ -carboxamide group of glutaminyl residues of adjacent proteins (Seki et al., 1998; Uresti et al., 2006). The optimal temperature for MTGase activity is 50 °C (Ramírez et al., 2006; Uresti y col., 2004a), but at this temperature the muscle acquires a cooked appearance. The highest temperature at which appearance does not change is 30 °C. Also, the autolysis rate in this species is not high at 30 °C (Konno et al 2003; Dublan-García 2006), mainly because part of enzymes have been eliminated in the isoelectric precipitation process (Sánchez-Alonso et al, 2007b; Konno et al 2003).

Besides ingredients, high isostatic pressure (HP) would help to induce protein gelation without heat treatment to achieve products resembling raw fish (Uresti et al., 2004b), through the refolding of proteins and the establishment of new interactions favouring protein aggregation, which are necessary for the formation of a three-dimensional gel network (Gilleland et al., 1997; Pérez-Mateos et al. 1997). It has been stated that high pressure can help to prepare better gels (heat treated or not) with higher gel strength from fish surimi (Cárlez et al., 1995; Uresti et al., 2004b; Okamoto et al, 2005). As regards the possibility of proteolytic activity increasing during pressurization, Hernández-Andrés et al. (2005) reported that pressurization of squid (*Todaropsis eblanae*) muscle at 300 MPa did not increase proteolytic activity at 30 °C and that this activity increased considerably only when the temperature was raised from 35 °C to 65 °C.

Some authors claim that the enzyme is relatively pressure sensitive and could not be involved in high pressure gelation or in gelation following high pressure treatment (Shoji et al., 1990). In contrast, subsequent studies have demonstrated that transglutaminase activity is not hindered by 100-300MPa and that it remains active enough to continue working during later setting (Nonaka et al., 1997; Ashie and Lanier, 1999).

One of the problems with the use of high pressure is that some authors have reported that pressures higher than 200 Mpa may induce a change in colour, lending the product a cooked appearance (Montero et al. 2007). In previous unpublished works, the authors of this paper verified that high pressure can be applied up to 300MPa to squid muscle without inducing colour changes.

Combinations of transglutaminase and high pressure, coupled or not with heating, have been studied by various authors (Ashie and Lanier, 1999; Uresti et al. 2004b; Montero et al., 2005; Uresti et al., 2006), leading to the conclusion that setting at around 25 °C prior to high pressure treatment is suitable for the preparation of gels with improved mechanical properties.

The objective of the present work is to enhance the physicochemical characteristics of surimi gels made from low quality giant squid surimi by applying MTGase and/or HP to either heat treated or set-only (30 °C) products.

MATERIALS AND METHODS

Raw materials and additives

The surimi was made from frozen giant squid muscle (*Dosidicus gigas*) made by isoelectric precipitation following a method patented by CSIC (2004), with some

changes in the procedure suggested by industrial processors PSK-Océanos, Vigo, Spain. Briefly, the procedure for surimi preparation consists of the following stages: (a) partial solubilization of squid muscle in 0.5 M phosphoric acid, pH 3-3.3; (b) filtration through a refiner to remove any remaining connective tissue; (c) protein precipitation at pH 4.8 after addition of sodium bicarbonate, collecting the precipitate in a decanter; (d) mixing with cryoprotectants (4 % saccharose, 4 % sorbitol and 0.5 % sodium tripolyphosphate); (e) packing in trays and freezing at -20 °C; (f) storage at -20 °C. The pH of this surimi is around 5 and it needs to be neutralized at the time of gelation. The squid were caught in the Pacific Ocean close to the west coast of Mexico and shipped in frozen state to Spain. The surimi was made at a factory in Spain.

Ingredients added to prepare the different surimi samples were: sodium chloride (Panreac, Quimica, S.A.; Barcelona, Spain), sodium caseinate (Julio Criado Gómez, S.A. Madrid, Spain), calcium hydroxide (Panreac, Quimica, S.A.; Barcelona, Spain) and MTGase Activa WM (99 % maltodextrin and 1 % MTGase from *Streptovercillium sp.*) with an activity of approx. 100 U.g⁻¹ (Ajinomoto Co.; Tokyo, Japan).

Sample preparation

Giant squid surimi was tempered, chopped and homogenized for 1 minute in a refrigerated (4-6 °C) vacuum homogenizer (Stephan UM5, Stephan u. Söhne GMBH & Co., Hameln, Germany), then neutralized (the surimi pH was around 5) by mixing it for 2 minutes with 0.7 % Ca(OH)₂. Then, 3 % NaCl (recommended by the producer) was added and the sample homogenized for 1 minute more. After that, 1.5 % sodium caseinate was mixed with the dough for 1 min. Finally, 0.0, 0.5 % or 1.0 % of MTGase, depending on the lot, previously dissolved in water, was added and the whole batter was homogenized for 1 minute more. Moisture was adjusted to 75 %. The resulting samples

were stuffed into 35-mm Krehalon casings (Amcor group Flexibels Hispania S.L., Barcelona, Spain). Lots (C: 0.0 % MTGase, A: 0.5 % MTGase and B:1.0 % MTGase) (Table 1) were prepared and subjected to four different treatments. The first treatment was 30 °C/1 h + 5 °C/24 h (lots C1, A1 and B1), the aim being to enhance MTGase activity at a temperature that does not induce colour changes that deviate from a raw appearance. From a practical point of view, this treatment would be used in products intended for sale as raw. The second treatment is 30 °C/1 h + 90 °C/30 min + 5°C/24 h (lots C2, A2 and B2). The aim of this treatment is to let the MTGase act and then heat the sample; this represents the traditional gelation process. In practical terms it would be used to make pasteurized products. The third treatment is 30 °C/1 h + High Pressure (300 MPa/30 min/15 °C) + 5 °C/24 h (lots C1HP, A1HP and B1HP), and the aim is to assess the effect of high pressure without jeopardizing a raw appearance. The fourth treatment is 30 °C/1 h + High Pressure (300 MPa/30 min/15 °C) + 90 °C/30 min + 5 °C/24 h (lots C2HP, A2HP and B2HP). The aim is to assess the effect of high pressure on samples with a cooked appearance. In addition, 3 more lots (C0, A0 and B0) were prepared by applying 5°C/24h without any other HP or heat treatment.

Proximate Analysis and pH

Ash, fat, crude protein and moisture content of raw samples were determined (AOAC, 2000) in quadruplicate. Crude protein content was measured by a LECO FP-2000 Nitrogen Determinator (Leco Corporation, St Joseph, MI, USA). The pH value of restructured samples was determined following Vyncke (1981) with an Orion model 720A pH-meter.

Microbiological Analyses

Microbiological analyses were performed on the control (B0) and on unpressurized lots containing 1 % MTGase (B1, B2) in order to study the effect of the different treatments on the initial microbial charge.

Analyses were performed after 24 h at chilled temperature (5 °C) following AENOR standard AF V 08-051 (1999). Samples were prepared in a vertical laminar-flow cabinet (model AV 30/70, Telstar, Madrid, Spain). For each sample, 10 g (in duplicate) was placed in a sterile plastic bag (Sterilin, Stone, Staffordshire, UK) with 90 ml of peptone water (0.1 %) and 0.85 % NaCl (Panreac Quimica, S.A. Barcelona, Spain). After 1 min in a stomacher blender (Colworth 400, Seward, London, UK), appropriate decimal dilutions were pour-plated on the following media: Plate Count Agar (PCA), (Merk, Germany) for total viable count (30 °C/3-5 days); and Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG) (Merck, Germany) for *Enterobacteriaceae* (37 °C/24 h). Counts were expressed as the logarithm of colony forming units per gram (log CFC/g).

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Cubes of 2-3 mm were cut from the gels for microscopic examination. Samples were fixed with a mixture (1:1 v/v) of formaldehyde (4 %) and glutaraldehyde (0.2 %) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.3) and post-fixed with OsO₄, ashed and dried in increasing concentrations of acetone, and critical-point dried as described by Sánchez-Alonso et al. (2007b). Samples were then sputter-coated (Balzer, SCD004) with gold/palladium and examined in a Jeol Scanning Microscope (Jeol, JSC 6400, Akishima, Tokyo, Japan) at 20 kV. The examined lots were C1, A1, B1, C1HP, A1HP, B1HP, C2, A2, B2, C2HP, A2HP and B2HP.

Mechanical Properties

Puncture Test and Texture Profile Analysis (TPA) were performed to determine mechanical properties of surimi gels.

TPA was performed using a TA-XT plus Texture Analyzer as described by Bourne (2002). The analyses were done at two different compression levels, 40 % and 80 % of the original height, both at room temperature. Four sample cores (diameter 35.0 mm; height 35.0 mm) were axially compressed to 40 % of their original height without breaking. In all cases breaking point was reached when samples were compressed to 80 %. Force-time deformation curves were derived with a 50 N load cell applied at a crosshead speed of 0.8 mm.s^{-1} . Attributes at 40 % of compression were analysed: Hardness (Hd) = peak force (N) required for the first compression; Cohesiveness (Ch) = ratio of active work done under the second compression curve to work done under the first compression curve (dimensionless). For 80 % compression: Rupture force (RF)= peak force (N) at rupture point, and Rupture distance (RD)= distance (mm) at rupture point.

Puncture Testing was carried out at room temperature (20-22 °C) as in the previous test. Samples (diameter 35.0 mm; height 35.0 mm) were penetrated up to breaking point six times at different points. Puncturing was performed using a 5 mm diameter cylindrical stainless steel plunger attached to a 50 N cell connected to the crosshead on a TA-XT plus Texture Analyzer (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY, USA). Breaking Force (N) and Breaking Deformation (mm) were determined from the force-deformation curves. Force-deformation curves were derived at 0.2 mm.s^{-1} crosshead speed.

Lots analysed were C0, A0, B0, C1, A1, B1, C2, A2, B2, C1HP, A1HP, B1HP, C2HP, A2HP and B2HP.

Water Binding Capacity (WBC)

A frozen sample (2 g) was cut into small pieces and placed in a centrifuge tube ($\varnothing=10$ mm) with enough filter paper (2 filter paper Whatman n° 1 $\varnothing=90$ mm) as absorber. The sample was thawed in a tube and then centrifuged in a Jouan MR1812 centrifuge (Saint Nazaire, France) for 10 min at $3000\times g$ at room temperature. Water Binding Capacity (WBC) was expressed as per cent water retained per 100 g water present in the muscle prior to centrifuging (Moreno et al., 2008). Lots analysed were C0, A0, B0, C1, A1, B1, C2, A2, B2, C1HP, A1HP, B1HP, C2HP, A2HP and B2HP.

Electrophoresis Assay (SDS-PAGE)

Approx. 0.05 g of muscle sample was treated with a denaturing solution consisting of 5 % (w/v) 2- β -mercaptoethanol, 2.5 % (w/v) sodium dodecyl sulphate (SDS), 10 mM Tris-HCl, 1mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 0.002 % (w/v) bromophenol blue, according to Hames (1985), and the final average concentration was adjusted to 2 mg/ml. The samples were heated for 5 min at 100 °C. Electrophoresis assays were performed on a PhastSystem apparatus (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden) using 12.5 % polyacrylamide gels supplied by Pharmacia LKB Biotechnology AB.

Electrophoretic conditions were 10 mA, 250 V and 3.0 W and temperature 15 °C. Protein bands were stained with Coomassie brilliant blue, commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB as “PhastGel Blue R” tablets. An aqueous solution of 30 % methanol and 10 % acetic acid was used for destaining and a solution of 5 % glycerol and 10 % acetic acid as a preservative. The reference standard used for molecular weights was a commercial high molecular weight (HMW) calibration kit from Pharmacia LKB Biotechnology AB, consisting of: myosin (220 kDa), α_2 -macroglobulin

(170 kDa), β -galactosidase (116 kDa), transferrin (76 kDa) and glutamic dehydrogenase (53 kDa). The rate of disappearance of the myosin heavy chain band in the electrophoresis profile was estimated by the programme ID-Manager v. 2.0 (TDI S.A, Madrid, Spain). Lots analysed were C1, A1, B1, C2, A2, B2, C1HP, A1HP, B1HP, C2HP, A2HP and B2HP.

Colour Measurement

Gel colour was determined on a HunterLab Mini Scan MS/S-4000S colorimeter (Hunter Associated Laboratory Inc., Reston, VA) using the CIE Lab scale (D65/10°), where L* is the parameter that measures lightness of the gels (diameter 35.0mm; height 35.0mm) as described by Park (1995). Lots analysed were C0, A0, B0, C1, A1, B1, C2, A2, B2, C1HP, A1HP, B1HP, C2HP, A2HP and B2HP.

Statistical Analysis

A general linear model (factorial ANOVA, three-dimensional full factorial design) was used to determine significant differences ($p \leq 0.05$) among products with different levels of MTGase and subjected to different thermal treatments, and between pressurized and unpressurized versions of each product. Multiple comparisons were done by Tukey HSD test. All statistical treatment was performed with STATISTICA[®] software from StatSoft, Inc. (Tulsa, OK, USA), version 6.1, 2003.

RESULTS AND DISCUSSION

Proximate Analysis

The major constituents of the surimi were water (78.08 ± 0.13 %) and protein (20.15 ± 0.77 %), followed by fat (0.88 ± 0.03 %) and ash (0.80 ± 0.02 %).

Microbiological Analyses

Bacterial counts (total viable count and *enterobacteriaceae*) after the three different treatments are shown in Table 2. Only thermally induced gel samples (B2) showed statistical differences in the total count and Enterobacteriaceae. Treatment at 30 °C/1h (B1) did not increase microorganism growth as compared to samples at 5 °C/24h (C0).

Scanning Electron Microscopy (SEM)

In the case of “suwari” gels (30 °C/1 h), the gel matrix of lots A1 and B1 (Figures 2 and 3) was better formed than lot C1, which had more open alveoli (Figure 1). When C1 samples were processed under high pressure, lot C1HP presented a better mesh structure than lot C1 (Figure 1). The difference between lots B1 and B1HP or between A1 and A1HP is likewise not so obvious, although the mesh was better formed in pressurized samples (Figures 4, 5 and 6).

In the case of heated gels (90 °C/30 min), which correspond to samples C2, A2 and B2, differences in structure were not so evident, except in pressurized samples (C2HP, A2HP and B2HP), whose structure was denser (pictures not shown).

In general, gels made in the presence of MTGase possessed a more orderly fibrillar structure than gels made without MTGase, regardless of whether pressurized or not. This finding agrees with that of Benjakul et al. (2008) in a study aimed at improving gelling properties of minced fish by adding MTGase.

Mechanical Properties

Before turning to the discussion, it must be stressed that when data obtained from lots C0, A0 and B0 (5 °C/24 h) were compared with C1, A1 and B1 (30 °C/1 h + 5 °C/24 h), it was observed that samples set at 5 °C were less firm, although deformation values were quite similar (data not shown). Because of this and also because, as Table 2 shows, microbiological growth did not increase after setting at 30 °C/1 h, studies of the samples were carried out at 30 °C/1 h with and without further treatment at 90 °C/30 min.

Results of TPA at 40 % and 80 % are shown in Table 3. With and without HP treatment and in absence of heat treatment, statistical differences were found in hardness when 0.5 % or 1.0 % of MTGase was added (A1 and B1) in comparison to the control (C1), but not between 0.5 % (A1) and 1.0 % (B1), which indicates that 0.5 % of MTGase could be enough to achieve good firmness. Also in samples treated at 5 °C/24 h, hardness increased with MTGase concentration (from 7.54 N to 16.44 N). In samples that were heated at 90 °C after a period of setting in which MTGase acted (A2 and B2), hardness did not increase, probably because the bonds formed in the heating process masked the effects of the bonds formed by the MTGase during setting.

In general, samples heated at 90 °C/30 min presented higher hardness values than samples treated at 30 °C/1 h without further heating. In this respect, Cárlez et al. (1995) and Okamoto et al. (2005) reported similar results studying the gelation of fish myofibrillar proteins. This issue was also examined by Heremans et al. (1997), who attributed the fact to extensive protein unfolding in heated gels, leading to a more stable network with increased interactions.

Gel samples heated at 90 °C/30 min both with and without HP processing and containing MTGase were not significantly harder than others without MTGase. As expected, heat treatment inactivated any remaining MTGase activity (Ando et al., 1989),

but contrary to the authors' expectations, bonds established by MTGase activity during setting were not reinforced by heating. In this connection, many authors have reported different points of view on MTGase activity in samples treated with HP. On the other hand, when MTGase was added, cohesiveness (Table 3) was not affected by HP treatment. This was also reported by Uresti et al. (2006) in a study of mechanical properties of gels prepared from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). As regards the role of MTGase, many authors have studied its ability to improve mechanical properties (Motoki and Seguro, 1998; Kuetemeyer et al., 2005; Cofrades et al., 2006; Ramírez et al., 2006), and in the present work addition of MTGase made "suwari" gels more cohesive. However, heated gels did not show any improvement in cohesiveness with MTGase addition. Furthermore, heated gels were less cohesive, suggesting that the protein net formed by MTGase action was negatively affected by a subsequent bond net established during heating.

TPA analyses were performed under 80 % compression to determine rupture force and rupture distance (Table 3). The effects of HP and heat treatment on rupture force were similar to those observed on hardness at 40 % compression only more obvious. and MTGase significantly improved the rupture force of the non-heated gels, even in samples treated at 5 °C/24 h (11.21 N to 73.77 N). As in the case of cohesiveness, heat treatment reduced rupture deformation in all samples containing MTGase, regardless of the MTGase concentration. In fact, a comparison with TPA results under 40 % compression reveals similar relative contributions by the different processing factors.

According to the Puncture Test (Table 3), MTGase addition, pressurization and heat treatment enhanced breaking force; also, MTGase addition in samples treated at 5 °C/24 h produced similar results (from 0.35 N to 1.35 N). In contrast, breaking deformation was reduced significantly more in heated gels than in "suwari" gels,

especially in the samples with higher MTGase contents. MTGase plus HP treatment improved this parameter. These results suggest that pressure treatment produces an orderly structure in the sample matrix, which is reflected in stronger gels with better breaking force and only a moderate improvement of breaking deformation; similar results have been reported by Uresti et al. (2004b).

The three groups of rheological parameters determined showed different sensitivity to each of the studied factors: hardness responded positively to HP and heat treatment, while compression up to rupture (80 %) and puncture test were more sensitive to MTGase addition, particularly in “suwari” gels, and showed some negative effects from heat treatment. The different types of rheological measurement have been extensively reviewed by Lee and Chung (1989). According to these authors, while the compression test measures the overall binding property of the gel material, the puncture test evaluates the degree of compactness or density of the actomyosin network formed. Interestingly, this study showed that TPA with 80 % compression, which is necessarily compression beyond rupture, seemed to correlate better with the puncture test than with TPA at 40 % compression. Thus, the forces measured up to rupture, whether by compression or penetration, indicate that the density of the actomyosin network was strongly enhanced by MTGase. This is consistent with the SEM results reported above, where the presence of MTGase induced a more orderly actomyosin network.

Water Binding Capacity

Results are presented in Table 4. In addition, a comparison of the data from samples processed at 5 °C/24 h (lots C0, A0 and B0) with those of samples processed at 30 °C/1 h (C1, A1 and B1) revealed quite similar values.

In general, a comparison of samples with and without HP treatment showed statistically higher values in samples with HP treatment (61.62 ± 10.32 vs 54.55 ± 11.76 %). Fernández-Martín et al. (1998) and Uresti et al. (2004b) reported similar behaviour in pressurized processing. However, this HP effect was not so strong with addition of MTGase. Moreover, in the case of “suwari” gels, WBC was improved by MTGase addition both with and without HP treatment, but there were no differences depending on the level of added MTGase. This clearly indicates that MTGase improved WBC at concentrations up to 0.5 % in giant squid surimi gels, much as it did for most of the mechanical properties. No differences were found in heated gels either with or without HP treatment. Kuraishi et al. (2001) asserted that transglutaminase had considerable potential to improve WBC, as had previously been claimed by Fisher (1999) and in some previous works by Moreno et al. (2008) in restructured hake mince products. However, other authors have reported no improvement of WBC despite MTGase addition in muscle of pork (O’Kennedy and Kelly, 2000) and beef (Cofrades et al., 2006). In the present case there was likewise no improvement when MTGase was added at concentrations higher than 0.5 %. However, in the case of treatment at 5 °C/24 h (lots C0, A0 and B0), increasing levels of MTGase addition up to 1.0 % produced significant increases in WBC (from 51.02 to 69.45 and 78.28 %, for 0.0, 0.5 and 1.0 % MTGase added, respectively).

Electrophoresis Assay (SDS-PAGE)

Table 5 shows the effect of MTGase concentration and type of treatment on changes in myosin heavy chain and polymers. In samples treated at 30 °C/1 h + 5 °C/24 h (lots C1, A1 and B1), the myosin heavy chain band (MHC) was less dense with added MTGase, indicating that MTGase polymerizes the myosin through the formation of covalent ϵ -

amino-(γ -glutamyl) lysine bonds (Lanier et al., 2005). Comparison of the MHC bands in samples C1 and C1 HP showed that density was similar. Shoji et al. (1990) reported that even although TGase was inactivated by high pressure (300 MPa), the strength of the gels was higher. In the present case setting took place prior to HP treatment, so the MTGase was able to act before HP treatment, although it is also possible that some MTGase remained active afterwards, as mentioned by Nonaka et al. (1997) and Ashie and Lanier (1999). Then again, HP treatment induces actomyosin unfolding, which can facilitate hydrophobic interactions during subsequent low temperature storage (Pérez-Mateos et al., 1997; Lanier et al., 2005).

In the heated gels (lots C2, A2 and B2), the MHC band was quite similar to the band in the “suwari” gels because electrophoresis was performed with buffer containing mercaptoethanol, so that the disulphide bonds formed during the heating process were cleaved. For this reason it is assumed that most of bonds formed during heating were disulphide bonds.

Colour measurement

As Table 4 shows, lightness decreased when HP treatment was applied. Other authors (Ashie and Lanier, 1999; Dong et al., 2003) have reported that gels become more opaque as a consequence of HP treatment, thus increasing lightness, but these authors used higher pressures than in the present work. L^* values increased in thermally induced gels, which is consistent with the claim of Uresti et al. (2004a) and Benjakul et al. (2008) that thermal gels exhibit greater muscle protein denaturation than cold set gels. The addition of MTGase presented no clear effect on lightness, nor any adverse effect on the other colour parameters of the resulting gel (Benjakul et al., 2008).

CONCLUSIONS

The addition of MTGase resulted in “suwari” gels (without heat treatment) with better mechanical properties, water binding capacity and actomyosin polymerization. When gels were heated, there was no clear effect of MTGase addition on the studied physicochemical properties. Also, in “suwari” and heated gels, high pressure treatments (300 MPa/30 min/15 °C) produced better physicochemical properties and a better-formed net structure. Lightness values were higher after heat treatment and slightly lower with HP, but the addition of MTGase did not induce any clear change.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas for a Predoctoral Scholarship under program I3P-2004. The participation of author Carlos Cardoso, from IPIMAR (Portugal), in this research work was funded by the SEAFOODplus project under its 3rd internal call for training activities and mobility actions.

REFERENCES

- AENOR. 1999. Norm AF V 08-051. Microbiological Standards Recopilation of Food and assimilated and other physical-chemical parameters of health.
- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H., Motoki, M. 1989. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 53(10): 2613-2617.
- AOAC. 2000. Official Method of Analysis, 17th edition, Assoc Official Analytical

Chemistry. Maryland, USA.

- Ashie, I.N.A. and Lanier, T.C. 1999. High pressure effects on gelation of surimi and turkey breast muscle enhanced by microbial transglutaminase. *J. Food Sci.* 64(4): 704-708.
- Benjakul, S., Phatcharat, A., Tammattina, A., Visessanguan, W. and Kishimura, H. 2008. Improvement of gelling properties of lizardfish mince as influenced by microbial transglutaminase and fish freshness. *J. Food Sci.* 73(6): S239-S246.
- Bourne, M. C. 2002. *Food Texture and Viscosity. Concept and Measurement.* 2nd edition. Inst Food Technologist, Chicago, Usa, pp. 107-187.
- Cárlez, A., Borderías, A.J., Dunay E. and Cheftel, J.C. 1995. High pressure gelation of fish myofibrillar proteins. In: *Food macromolecules and colloids*, E. Dickinson and D. Lorient, Eds. Royal Society of Chemistry, Cambridge, England, pp. 400-409.
- Cofrades, S., Ayo, J., Serrano, A., Carballo, J. and Jiménez-Colmenero, F. 2006. Walnut, microbial transglutaminase and chilling storage time effects on salt-free beef batter characteristics. *Eur. Food Res. Technol.* 222: 458-466.
- CSIC. 2004. Inventors: Careche, M., Borderias, A.J. and Sánchez-Alonso, I. Method of producing a functional protein concentrate from cephalopod muscles and product thus obtained, which is used in the production of similar products and other novel products. Spanish Patent ES 2 208 105 A1 (01/06/2004).
- Dublán-García, O., Cruz-Camarillo, R. Guerrero-Legarreta, I. and Ponce-Alquiciría, E. 2005. Effect of refrigerated storage on proteolytic activity and physicochemical and microstructural properties of Giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle. *J. Muscle Food* 17: 291-310.
- Dong, F.M., Cook, A.R. and Herwing, R.P. 2003. High hydrostatic pressure treatment

- of finfish to inactivate *Anisakis simplex*. J. Food Prot. 66(10): 1924-1926.
- Fernández-Martín, F., Pérez-Mateos, M. and Montero, P. 1998. Effect of pressure/heat combinations on blue whiting (*Micromesistius poutassou*) washed mince: Thermal and mechanical properties. J. Agric. Food Chem. 46(8): 3257-3264.
- Fisher, R. A. 1999. Seafood restructuring using cold-set binding technology. Gloucester Point, Va.: Virginia Sea Grant Marine Advisory Program (VSGCP-G-99-002), pp. 1-16.
- Gilleland, M.G., Lanier, T.C. and Hamann, D.D. 1997. Covalent bonding in pressure-induced fish protein gels. J. Food Sci. 62(4): 713-716.
- Hames, B.D. 1985. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In Anonymous, vol. Gel electrophoresis of protein. A practical approach. Oxford: IRL Press. pp. 1-86.
- Heremans, K., Van Camp, J. and Huyghebaert, A. 1997. High pressure effects on proteins. In Food proteins and their applications, S. Damodaran and A/ paraf (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York. pp. 473-502.
- Hernández-Andrés, A., Gómez-Guillén, C., Montero, P. and Pérez-Mateos, M. 2005. Partial characterization of protease activity in squid (*Todaropsis eblanae*) mantle: Modification by high-pressure treatment. J. Food Sci. 70(4): C239-C245.
- Konno, K., Young-Je, C., Yoshioka, T., Shinho, P. And Seki, N. 2003. Thermal denaturation and autolysis profiles of proteins of mantle muscle of jumbo squid *Dosidicus gigas*. Fish. Sci. 69(1): 204-209.
- Kuetemeyer, C., Froeck, M., Werlein, H.D. and Watkinson, B.M. 2005. The influence of salts and temperature on enzymatic activity of microbial transglutaminase. Food Control 16(8): 735-737.

- Kuraishi, C., Yamazaki, K. and Susa, Y. 2001. Transglutaminase: Its utilization in the food industry. *Food Rev. Int.* 17(2): 221-246.
- Lanier, T.C. 1986. Functional properties of surimi. *Food Technol.* 40(3):107-114, 124.
- Lanier, T.C., Carvajal, P. and Yongsawatdigul, J. 2005. Surimi gelation Chemistry. In *Surimi and Surimi Seafood*. Ed. Jae W. Park. Taylor & Francis group. Second edition, pp. 435-477.
- Lee, H.G. and Chung, L. 1989. Analysis of surimi gel properties by compression and penetration test. *J. Text. Stu.* 20(3): 363-368.
- Montero, P., López-Caballero, M.E., Pérez-Mateos, M., Solas, M.T. and Gómez-Guillén M.C. 2005. Transglutaminase activity in pressure-induced gelation assisted by prior setting. *Food Chem.* 90(4): 751-758.
- Montero, M.P., Gómez-Guillén, MC. and Borderías A.J. 2007. Uso de la alta presión en miosistemas. Importancia en el procesado de pescado. In: *Aplicación de tecnologías emergentes de procesado mínimo en el sector pesquero*. Ed by Centro Tecnológico del Mar. Fundación CETMAR. Vigo. España pp 157- 175.
- Moreno, H. M., Carballo, J. and Borderías, A. J. 2008. Influence of Alginate and Microbial Transglutaminase as binding ingredients on restructured fish muscle processed at low temperature. *J. Sci. Food Agric.* 88: 1529-1536.
- Motoki, M. and Seguro, K. 1998. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends Food Sci. Tech.* 9(5): 204-210.
- Nonaka, M., Matsuura, Y., Nakano, K. and Motoki, M. 1997. Improvement of the pH-solubility profile of sodium caseinate by using Ca^{2+} independent microbial transglutaminase with gelatin. *Food Hydrocol.* 11(3): 347-349.
- O'Kennedy, B. T. and Kelly, P. M. 2000. Evaluation of milk protein interactions during acid gelation using a simulated yoghurt model. *Milchwissenschaft.* 55: 187-190.

- Okamo, K. T., Hagura, Y. and Suzuki, K. 2005. Estimation of cryo-cutting conditions for frozen surimi gel using DSC. *Food Sci. Technol. Res.* 11(2): 236-239.
- Park, J. W. 1995. Surimi Gel Colors as Affected by Moisture-Content and Physical Conditions. *J. Food Sci.* 60(1): 15-18.
- Pérez-Mateos, M., Lorenço, H.M., Montero, P. and Borderías A. J. 1997. Rheological and chemical studies on high pressure-induced gels from blue whiting (*Micromesistius poutassou*) muscle. *J. Agric. Food. Chem.* 4544-4549.
- Ramírez, J. A., Del Ángel, A., Velázquez, G. and Vázquez, M. 2006. Production of low-salt restructured fish products from Mexican flounder (*Cyclopsetta chittendeni*) using microbial transglutaminase or whey protein concentrate as binders. *Eur. Food Res. Technol.* 223(3): 341-345.
- Sánchez-Alonso, I.; Solas, T.; Borderias, A.J. 2007a. Technological implications of addition of wheat dietary fibre to giant squid (*Dosidicus gigas*) surimi gels. *J. Food Engineering* 81: 404-411.
- Sánchez-Alonso, I., Careche, M. And Borderías, A.J. 2007b. Method for producing a functional protein concentrate from giant squid (*Dosidicus gigas*) muscle. *Food Chem.* 100(1): 48-54.
- Seki, N., Nozawa, H. and Ni, S. W. 1998. Effect of transglutaminase on the gelation of heat-denatured surimi. *Fish. Sci.* 64(6): 959-963.
- Shoji, T., Saeki, H., Wakameda, A., Nakamura, M. and Nonaka, M.1990. Gelation of salted paste of Alaska pollack by high hydrostatic pressure and change in myofibrillar protein in it. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 56 (12): 2069-2076.
- Uresti, R. M., Velazquez, G., Vázquez, M., Ramírez, J. A., and Torres, J. A. 2006. Effects of combining microbial transglutaminase and high pressure processing treatments on the mechanical properties of heat-induced gels prepared from

- arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). Food Chem. 94(2): 202-209.
- Uresti, R. M., Tellez-Luis, S. J., Ramírez, J. A., and Vázquez, M. 2004a. Use of dairy proteins and microbial transglutaminase to obtain low-salt fish products from filleting waste from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Food Chem. 86(2): 257-262.
- Uresti, R. M., Velazquez, G., Vázquez, M., Ramírez, J. A., and Torres, J. A. 2004b. Effects of high-pressure treatments on the mechanical and functional properties of restructured products from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). J. Sci. Food Agric. 84(2): 1741-1749.
- Vyncke, W. 1981. Influence of Citric-Acid on the Shelf-Life of Saithe and Redfish. Revue De L Agriculture. 34(1): 149-154.

TABLE 1: Composition of the gel products.

Samples	NaCl (%)	Ca(OH) ₂	Sodium caseinate (%)	MTGase (%)
C (control)	3.0	0.7	1.5	0.0
A	3.0	0.7	1.5	0.5
B	3.0	0.7	1.5	1.0

TABLE 2: Microbiological results of gel products with 1.0 % MTGase after different treatments.

Treatments	Microbial counts	
	Total viable count (Log CFU/g)*	<i>Enterobacteriaceae</i> (Log CFU/g)*
5°C/24h	3.972 ^a	2.591 ^a
30°C/1h+5°C/24h	3.809 ^a	2.452 ^a
30°C/1h+90°C/30min+5°C/24h	2.512 ^b	1.001 ^b

* Different letters mean statistical differences ($p < 0.05$)

TABLE 3: Mechanical properties of the gel products.

Samples*	Hardness (N) [†]	Cohesiveness [†]	Rupture force (N) [‡]	Rupture Distance (mm) [‡]	Breaking force (N)	Breaking deformation (mm)
C1	12.69 ± 1.53 ^a	0.61 ± 0.10 ^a	14.89 ± 0.65 ^a	11.21 ± 0.19 ^a	0.47 ± 0.02 ^a	4.42 ± 0.87 ^a
C2	71.43 ± 3.80 ^c	0.69 ± 0.01 ^{ab}	83.86 ± 16.16 ^{bc}	13.82 ± 1.31 ^{bc}	2.81 ± 0.20 ^f	5.64 ± 0.23 ^b
A1	22.70 ± 0.46 ^b	0.81 ± 0.00 ^{cd}	61.63 ± 4.39 ^b	18.94 ± 0.16 ^e	1.27 ± 0.01 ^b	7.40 ± 0.14 ^{ef}
A2	66.95 ± 6.87 ^c	0.72 ± 0.00 ^{bc}	76.95 ± 8.71 ^{bc}	12.97 ± 0.97 ^{ab}	2.52 ± 0.14 ^{ef}	6.41 ± 0.23 ^{bcde}
B1	26.31 ± 0.99 ^b	0.86 ± 0.03 ^d	112.94 ± 12.17 ^{cd}	19.49 ± 0.38 ^e	1.73 ± 0.03 ^c	8.20 ± 0.12 ^f
B2	74.65 ± 0.73 ^c	0.74 ± 0.01 ^{bc}	87.60 ± 6.48 ^{bc}	13.95 ± 0.72 ^{bc}	2.87 ± 0.10 ^f	6.81 ± 0.29 ^{de}
C1 HP	15.85 ± 2.00 ^a	0.71 ± 0.01 ^b	20.55 ± 1.02 ^a	14.85 ± 0.35 ^{bcd}	0.84 ± 0.03 ^{ab}	5.82 ± 0.07 ^{bcd}
C2 HP	110.37 ± 2.72 ^e	0.72 ± 0.00 ^{bc}	132.76 ± 13.80 ^{de}	14.49 ± 1.56 ^{bcd}	4.01 ± 0.09 ^g	5.70 ± 0.09 ^{bc}
A1 HP	22.07 ± 2.24 ^b	0.80 ± 0.00 ^{bcd}	70.06 ± 5.28 ^b	18.80 ± 0.59 ^e	1.92 ± 0.15 ^{cd}	10.04 ± 0.43 ^g
A2 HP	97.42 ± 3.34 ^d	0.75 ± 0.00 ^{bc}	161.97 ± 19.01 ^e	15.37 ± 0.32 ^{cd}	3.95 ± 0.35 ^g	6.74 ± 0.56 ^{cde}
B1 HP	21.85 ± 2.10 ^b	0.85 ± 0.03 ^d	332.54 ± 33.48 ^f	22.36 ± 0.72 ^f	2.35 ± 0.09 ^{de}	11.28 ± 0.09 ^h
B2 HP	92.74 ± 5.60 ^d	0.73 ± 0.01 ^{bc}	169.15 ± 7.69 ^e	16.27 ± 0.67 ^d	4.16 ± 0.17 ^g	7.40 ± 0.37 ^{ef}

† TPA - 40%;‡TPA - 80%. * * Different letters within the same column mean statistical differences (p<0.05).

TABLE 4: WBC and lightness (L*) of the gel products.

Samples*	WBC (%)	L*
C1	44.87 ± 3.21 ^a	73.49 ± 0.19 ^{bc}
C2	48.79 ± 4.11 ^{ab}	83.11 ± 1.21 ^f
A1	69.46 ± 5.87 ^{de}	74.80 ± 0.31 ^{cd}
A2	48.66 ± 3.89 ^{ab}	82.39 ± 0.67 ^{ef}
B1	70.53 ± 1.84 ^{de}	76.60 ± 1.08 ^d
B2	45.00 ± 0.32 ^a	80.56 ± 0.94 ^e
C1 HP	61.49 ± 4.27 ^{cd}	70.42 ± 1.23 ^a
C2 HP	55.92 ± 3.32 ^{bc}	80.59 ± 1.29 ^e
A1 HP	75.47 ± 3.15 ^e	72.10 ± 1.14 ^{ab}
A2 HP	53.31 ± 4.60 ^{abc}	81.25 ± 1.05 ^{ef}
B1 HP	73.12 ± 2.56 ^e	70.81 ± 1.20 ^a
B2 HP	50.44 ± 3.52 ^{ab}	82.89 ± 0.50 ^{ef}

* Different letters means statistical differences (p<0.05)

TABLE 5: Percentage Myosin heavy chain in the SDS-PAGE patterns.

Samples*	Retained (%)	MHC (%)	Others (%)
C1	31.64	35.1	33.26
C2	40.11	28.11	31.78
A1	36.46	30.01	33.53
A2	38.26	30.87	30.87
B1	43.29	28.2	28.51
B2	40.1	29.54	30.36
C1 HP	31.18	35.28	33.54
C2 HP	38.28	30.51	31.21
A1 HP	50.99	24.78	24.23
A2 HP	39.87	30.23	29.90
B1 HP	39.64	30.36	30.00
B2 HP	51.95	23.15	24.90

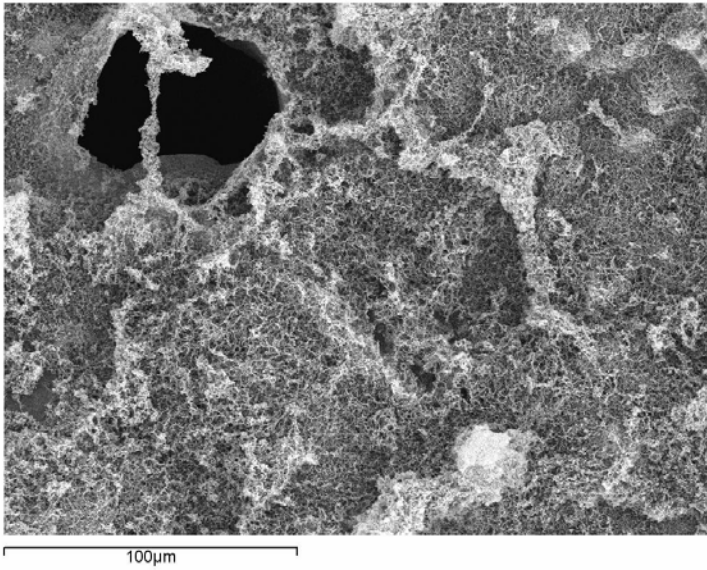


FIGURE 1: Scanning electron micrograph of sample C1 (magnification: x500).

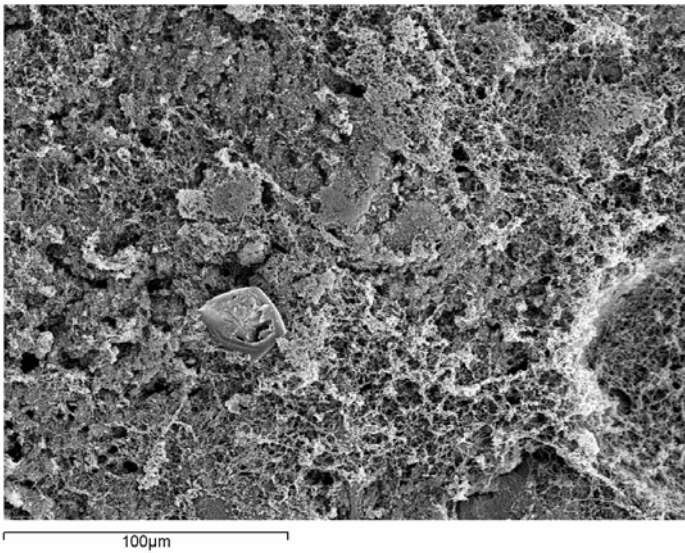


FIGURE 2: Scanning electron micrograph of sample A1 (magnification: x500).

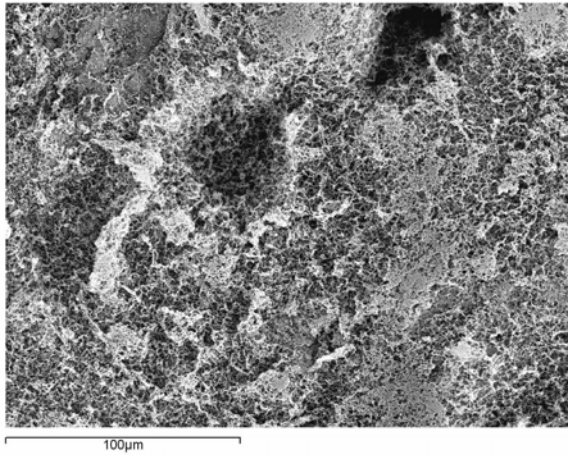


FIGURE 3: Scanning electron micrograph of sample B1 (magnification: x500).

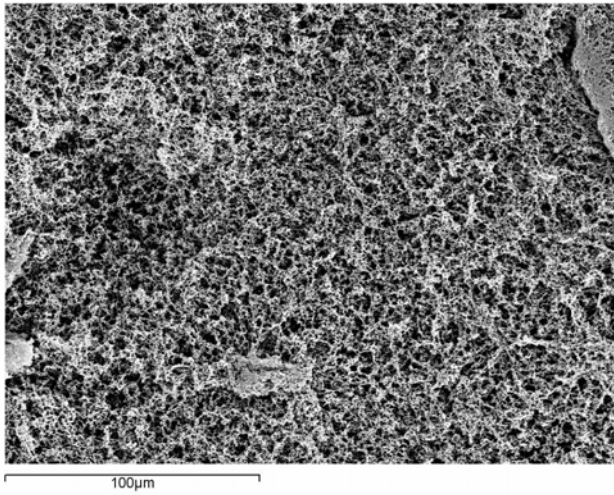


FIGURE 4: Scanning electron micrograph of sample C1HP (magnification: x500).

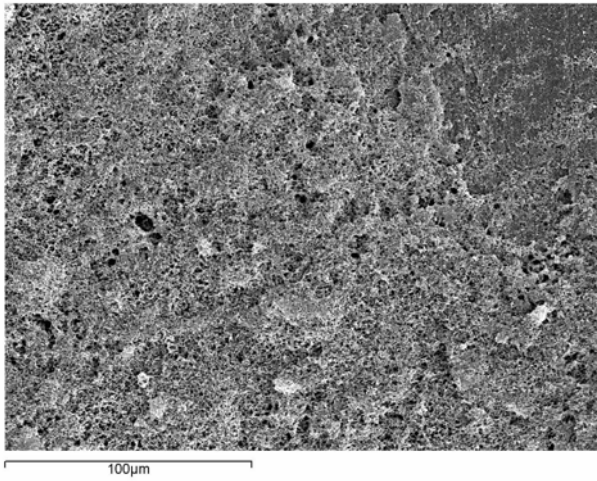


FIGURE 5: Scanning electron micrograph of sample A1HP (magnification: x500).

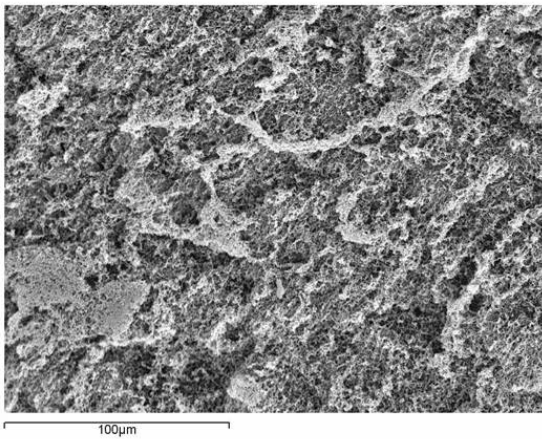


FIGURE 6: Scanning electron micrograph of sample B1HP (magnification: x500).

BLOQUE III: ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONSERVACIÓN DE PRODUCTOS REESTRUCTURADOS ELABORADOS A PARTIR DE MÚSCULO DE MERLUZA (*Merluccius capensis*; *Merluccius merluccius*) Y TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*).

V.3.1.- ESTUDIO DE LOS CAMBIOS EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DURANTE LA CONSERVACIÓN EN REFRIGERACIÓN DE REESTRUCTURADOS MODELO DE MÚSCULO DE MERLUZA ELABORADOS CON ALGINATO SÓDICO Y TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA.

“Physicochemical changes during chilled storage of restructured fish models made with sodium alginate and microbial transglutaminase.”

Helena M Moreno; José Carballo and A. Javier Borderías.

Pendiente enviar a Journal Food Quality.

**PHYSICOCHEMICAL CHANGES DURING CHILLED STORAGE OF
RESTRUCTURED FISH MODELS MADE WITH SODIUM ALGINATE OR
MICROBIAL TRANSGLUTAMINASE.**

Helena M. Moreno Conde

José Carballo Santaolalla

**A. Javier Borderías Juárez: Corresponding author. Tel.: +3491 5492300; Fax;
+3491 5493627. E-mail address: jborderias@if.csic.es (J. Borderías)**

**Departamento de Ciencia y Tecnología de la Carne y Productos Cárnicos y del
Pescado y Productos de la Pesca, Instituto del Frío (CSIC), C/ José Antonio
Nováis, 10, 28040 Madrid, Spain.**

ABSTRACT

By restructuring and adding sodium alginate or MTGase using cold gelation technology, it can be obtained a raw product from minced and/or chopped fish muscle that is suitable for being used as the basis of new restructured products with different physicochemical properties and even different compositions. In products of this kind, for marketing as raw products, careful consideration must be given to shelf-life and the changes that may take place during chilled storage. Changes in both visual appearance and physicochemical properties have to be controlled.

After 21 days storage at 5°C, microbial growth limited the shelf life to 7-14 days, although the TVB value remained within legal limits up to 21 days. Mechanical

properties increased during that time but cooking yield decreased as storage time progressed.

PRACTICAL APPLICATIONS

The aim was to study the chilled storage of restructured models based on cold gelation of fish fillet trimmings and minced muscle with added Microbial transglutaminase or Sodium alginate. These restructured products could be marketed as raw fillet portion analogs or, with further processing, as carpaccio, marinates or smoked products. The models studied here are not final products but the base with which to prepare them. By observing the behaviour of these models during chilled storage, producers can make recommendations to consumers as to how to achieve the best sensory properties.

Key words: sodium alginate, microbial transglutaminase, prototypes of restructured products, chilled storage.

INTRODUCTION

Restructured fishery products can be processed from minced and/or chopped muscle in order to obtain new products from underutilized species or subproducts after filleting commercial species, with new and different appearances and textures. Various attempts have been made during the last few years to produce value-added fish products from low-commercial-value cuts. These restructured fish products, seafood analogues in many cases, are mainly induced by heating and therefore appear cooked. An important factor that has to be considered is that nowadays, consumers are more interested in “fresh products”. This has prompted the need to make restructured products from

chopped or minced raw fish muscle using technologies whereby restructured products can be made without applying higher temperatures than 30-35 °C so that they still appear raw. Also, these new fresh products are highly versatile in that they can be processed in many different ways, such as marinated products, “sushi”, carpaccio, or as a ready-to-cook fish fillet analogue. Two types of ingredient, alginate and MTGase, have been considered to achieve protein gelation at temperatures low enough not to induce changes in the raw appearance or in the flavour of the product. Although each works in a different way and its action depends on the other ingredients in the formula and the type of fish muscle involved in the process (Urdangarin et al., 2004), it is possible to elaborate a minimally processed product at low temperature with either of them. Alginate is a hydrocolloid which is able to form thermo-stable gels without thermal treatment in the presence of calcium cations (Means and Schmidt, 1986). It is believed that this gel interacts in some way with myofibrillar proteins. In fact, Shand (1993) and Montero et al. (2000) reported that these interactions are mainly electrostatic, occurring between the anionic groups on the alginate and the positively charged groups on the protein. On the other hand, Microbial Transglutaminase (protein-glutamine γ -glutamyltransferase) is an enzyme capable of catalyzing acyl-transfer reactions by cross-linking of proteins such as myosin, peptides and primary amine by forming covalent bonds between the ϵ -amino group of lysyl residues and the γ -carboxamide group of glutamyl residues of adjacent proteins (Lee et al., 1997a; Suklim et al., 2004; Park, 2005). The optimal activity of this enzyme is reached at 40-50 °C (Ramírez et al., 2000; Uresti et al., 2004) although its activity has been reported from 0-70°C (Motoki and Seguro, 1989; Ajinomoto, 2009). Moreover, Kuraishi et al. (1997) and Kuraishi et al. (2001) reported that MTGase can be activated by adding sodium caseinate, which enhances formation of cross-linking at temperatures lower than 30°C in

meat products, and they suggested possible ways of using it in seafood products. Uresti et al. (2004) confirmed these data in experiments to make restructured products with silver carp muscle.

It is reasonable to suppose that if these ingredients could enhance protein bonding, this would produce changes in the substrate that could modify the pattern of spoilage during storage because of the change in substrate, and also because the microbiological load is altered. However, it has not been found studies that analyse the influence of both ingredients, alginates and MTGase, on stability in chilled storage.

The aim of this work was to study the behaviour during chilled storage of models of restructured hake muscle made by addition of MTGase or sodium alginate at low temperature, with structural differences depending on muscle particle size, and salt percentage.

MATERIALS & METHODS

Raw materials and ingredients of samples

Frozen stored (-20°C) hake fillets (*Merluccius capensis*) were used to make the two kinds of restructured fish muscle models. The first (M) was made after reducing the muscle pieces into very small particles (<1.0mm) using a cutting process. The second (P) was made with pieces of the same muscle of around 20 mm. Restructured products were made with either sodium alginate or MTGase as binders, and the comminution process was also different in either case.

In the case of restructuring with sodium alginate (Lots MA and PA), the ingredients added were: sodium alginate (Degussa Texturant Systems España, S.A.; Barcelona, Spain), calcium chloride (Panreac Quimica, S.A.; Barcelona, Spain), sodium chloride

(Panreac Quimica, S.A.; Barcelona, Spain) and corn starch (Clearam CH-20, DADELLOS, S.L., Valencia, Spain). In the case of restructuring with MTGase (Lots MM and PM), the ingredients added were: sodium caseinate (Julio Criado Gómez, S.A. Madrid, Spain) and microbial transglutaminase (MTGase) dissolved in water (Activa WM [99% maltodextrine and 1% MTGase] Ajinomoto Co.; Tokyo, Japan).

The proportions of the ingredients and the composition of all samples are shown in Tables 1 and 2. These different formulates were chosen in order to prepare models of different prototypes for several types of products. For instance, given its better mechanical properties, lot MM could serve as a model for smoked or marinated products with a salt content of 4%. Lots MA, PA and PM could serve as models for different fillet analogues.

Sample preparation

For lots MA and MM, the muscle pieces were finely homogenized with the ingredients in a refrigerated vacuum cutter (Stephan UM5, Stephan u. Söhne GmbH & Co., Hameln, Germany). The order of addition and homogenization time for samples prepared with sodium alginate was as follows: NaCl plus 1min homogenization, CaCl₂ plus 1min homogenization, sodium alginate and again 1min homogenization, and finally 1 min more with the corn starch. The final batter was homogenized again for one min more (see Table 1 for composition). In the case of samples with added MTGase (MM), the ingredients were incorporated as follows: NaCl plus 1min homogenization, sodium caseinate plus 1min homogenization, MTGase dissolved in water (5% of the total sample) and 1 min homogenization again, and finally 1 min more with the corn starch. The final dough was homogenized for one min more (see Table 2 for composition).

To prepare lots PA and PM, the muscle pieces were ground in a meat mincer (FTS 11 Model, Van Dall SRL, Milan) through a plate with 20.0 mm holes, then mixed with the other components in a refrigerated kneading machine (Hobart N-504, Hobart Corporation, USA). In this way the muscle fibres were not disintegrated as in the previous cases, and the restructured retained its fibrousnesses, making for a more natural final texture. The order of ingredient addition was the same as described above, and the composition of the samples was as shown in Table 1 and Table 2.

Round plastic plates (depth 16 mm; Ø 96 mm) were filled with the resulting batters and then placed in chilled storage (5°C). Samples stored at chilling temperatures were kept at 5 °C for up to 21 days. Analyses were performed on days 1, 3, 7, 14 and 21.

Proximate Analysis

Moisture, fat and ash contents of fish muscle were determined (AOAC, 2000) in quadruplicate. Crude protein contents was measured in quadruplicate with a LECO FP-2000 Nitrogen Determinator (Leco Corporation, St Joseph, MI, USA).

Viscosity measurement

Apparent viscosity was determined according to Borderías et al. (1985) in order to determine the functional quality of the raw material proteins. Thawed samples were homogenized with 5% NaCl (1:4), pH=7 (phosphate buffer). The homogenate was filtered through gauze and centrifuged for 10 min at 345 x g to remove air bubbles. Measurements were made with a RV4 spindle, using a Brookfield model DV-III rheometer (Stoughton, MA) and Rheocalc V 1.2 software. Measurements were carried out in triplicate and results were expressed in centipoises (cP).

Microbiological analyses

Samples were analysed in duplicate at different stages of chilled storage and they were kept chilled at 5°C for 21 days. Analyses were performed on days 1, 3, 7, 14 and 21 following standard AFNOR AF V 08-051 (1999). Sample preparation was carried out in a vertical laminar-flow cabinet (model AV 30/70, Telstar, Madrid, Spain). For each sample, 10g (in duplicate) was taken and placed in a sterile plastic bag (Sterilin, Stone, Staffordshire, UK) with 90 ml of peptone water (0.1%) with 0.85 % NaCl (Panreac Quimica, S.A. Barcelona, Spain). After 1 min in a stomacher blender (Colworth 400, Seward, London, UK), appropriate decimal dilutions were pour-plated on the following media: Plate Count Agar (PCA), (Merk, Germany) for total viable count (30 °C for 3-5 days). Counts were expressed as logarithms of colony forming units per gram (log CFC/g).

Protein solubility

Protein solubility of samples was determined in triplicate, essentially according to the Ironside and Love (1958) procedure, by analysing the amount of soluble protein in a chilled aqueous solution of 5% NaCl. The protein was analysed in a LECO FP analyzer, and the results were expressed as percentage of soluble protein over total protein.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

All samples were examined by SEM after 24 h setting at chilled temperature. Samples were fixed with a mixture (1:1 v/v) of formaldehyde (4%) and glutaraldehyde (0.2%) in 0.1M phosphate buffer (pH 7.2), post-fixed with OsO₄ and ashes, dried in increasing concentrations of acetone and critical-point dried as described by Sánchez-Alonso et al. (2007a). Samples were then sputter-coated (Balzer, SCD004) with gold/palladium and

examined in a Jeol Scanning Microscope (Jeol, JSC 6400, Akishima, Tokyo, Japan) at 20 kV.

Purge Loss

To determine purge loss, samples were kept chilled (5°C) throughout storage (21 days). The differences in sample weight between different days of measurement 1-3, 3-7, 7-14, 14-21 were taken to be the drip during storage.

Cooking yield

Cooking yield was determined as reported by Sánchez-Alonso et al. (2007a) with some modifications. Samples were cooked in plastic bags at 90°C during 10 min in an oven (Rational Combi-Master CM6). After the heat treatment, samples were left at room temperature for 1 hour and the drip was collected and measured. Cooking yield was expressed as percent of sample weight after cooking. Cooking yields were determined in triplicate.

Mechanical properties

Analyses of strength and stress and to breaking point were performed. Puncture Tests (Kim et al., 2004) were carried out on samples MA and MM and Binding Tests were carried out on samples PA and PM. Both analyses were performed on room-tempered samples on days 1, 3, 7, 14 and 21.

For Puncture Tests, sample probes of 16 mm depth and 96 mm diameter were penetrated up to breaking point six times at separate points. Tests were performed using a 5 mm diameter cylindrical stainless steel plunger attached to a 50 N cell connected to the crosshead of a texture analyzer. Breaking Strength (BS) in N and Breaking

Deformation (BD) in mm were determined on the force-deformation curves. Force-deformation curves were obtained at 0.2 mm/s crosshead speed.

For the Binding Test, three round tempered samples (depth 16 mm; diam 96 mm) were measured at a time to assess the ability of the muscle pieces to adhere to one another (strength), in a procedure similar to the one described by Field et al. (1984). The strength (S) was measured as the peak force (N) required for a 1.9 cm ball, at a cross head speed of 100 mm/min (in a 50 N load cell), to break through a fish slice mounted on a ring of 3.2 cm inner diameter. Elongation (E) was estimated as the distance (mm) travelled by the ball after contact with the sample surface before the ball bursts through (peak force).

All mechanical properties were analysed using a TA-XT plus Texture Analyzer (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY, USA) at room temperature (20-22°C).

Colour Measurement

Gel colour was determined on a HunterLab Mini Scan MS/S-4000S (Hunter Associated Laboratory Inc., Reston, VA) using the CIE Lab scale (D65/10°), where L* and b* were the parameters measured on the restructured products (diameter 35.0mm; height 35.0mm) as described by Park (1995).

Statistical Analysis

One way ANOVA was conducted using Statgraphics 2.1 (STSC Inc., Rockville, MD). The difference among means was analysed using a Tukey HSD test ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Proximate analysis and apparent viscosity in raw material

The main constituents of the raw sample were moisture $80.92\pm 0.99\%$, total protein $16.59\pm 0.8\%$, fat $1.01\pm 0.17\%$ and ashes $1.45\pm 0.03\%$. Viscosity was $6388\pm 337\text{cP}$. Protein aggregation correlated well with the apparent viscosity of samples (Jiménez-Colmenero et al., 1983; Borderías et al., 1985). From these viscosity data, following the work reported by Barroso et al. (1998), the quality of this frozen fish muscle, used as raw material can be considered good.

Microbial Counts

Microbial load started to increase exponentially from day 7 of chilled storage (Table 3), mainly in lot PA followed by PM, although at day 14 of storage both samples PA and PM were still within the Microbiological Standard limits for fish products (10^6ufc/g)(BOE, 1991).

Homogenized samples prepared with a cutter (MA and MM) showed lower microbial counts than the ones made from pieces (PA and PM), irrespective of ingredient content (sodium alginate or MTGase). The reason for this was probably that the sodium chloride was spread through the dough better by the “cutter” process than in samples PA and PM, where the size of the pieces forming the restructured models made it much more difficult to penetrate. Differences in the proportions of salt in lots MM (4%) and MA (1,5%) did not produce any very evident differences in microbial load, although sodium chloride has long been used as a preservative in meats because it inhibits microbial growth by restricting the available water. In this connection, Sallam and Samejima (2004) reported that addition of NaCl alone (3%) did not have a significant effect on aerobic microorganisms, although during a period of storage at 2°C some

reduction was observed with respect to control samples without NaCl. Also, Sallam and Samejima (2004) and O'connor et al. (1993) asserted that NaCl should be added (at these concentrations) in combination with lactates in order to successfully preserve refrigerated and frozen products.

Ultrastructure

Pictures were taken from restructured models made with sodium alginate and MTGase after 1 day of setting at 5°C to examine the different net structures of restructurates made with different binders, and also to determine particle size. After setting at 5°C, examination of pictures of samples made using different processes revealed a more homogeneous matrix in samples made by homogenization using a cutter (MM and MA) than in samples made by kneading small pieces (PM and PA). Moreover, sample MM presented a more reticulated matrix than sample MA (Figures 1A and 1B). Figure 1C shows the alginate forming its own net next to the muscular area but does not show the protein net, which was much more evident when MTGase was added (Figure 1D). Montero et al., (2000) and Pérez-Mateos et al. (2002) reported that the alginate was located in small elongations partially connected with protein net. Because of the greater degree of protein-protein interaction thanks to the ability of MTGase to form (γ -glutamyl)lysine between proteins, the matrix was more homogeneous and compact (Gómez-Guillén et al., 2005).

Protein solubility

The relationship between soluble and insoluble protein, in 5% NaCl solution, of restructured product samples is shown in Table 4. As the table shows, protein solubility decreased with respect to the initial value in the fish when samples were made with

alginate and MTGase. This decrease of solubility was greater in sample MM than in MA, indicating that MTGase links more protein than alginate does. It is consistent with the structure shown in Figures 1A and 1B, where the protein net is much more evident in samples made with MTGase than in samples made with alginate. There was less aggregation in samples PA and PM than in samples MA and MM, made with a cutter, because neither MTGase nor alginate can reach all the muscle protein so effectively. This means that only proteins on the surface of muscle pieces are available to be linked, thus making for greater protein solubility.

Purge Loss

Purge loss signals the presence of drip on samples during chilled storage as a consequence of hydrolysis of myofibrillar proteins. This parameter is important because the exudates produce an off-putting aspect for the consumer (Fagan et al., 2003) and in addition textural problems.

Differences in weight between the samples on consecutive days of determination indicated no drip on the samples, which was confirmed visually. This suggests that the combination of sodium alginate and MTGase with corn starch (0.8%) was enough to bind the water throughout chilled storage. The role of alginate in binding water has been investigated by various authors (Montero et al., 2000; Rosell et al., 2001; Kumar et al., 2007). The role of MTGase in the water retention is more controversial, and different authors have reported different results (Fisher, 1999; Kuraishi et al., 2001; Cofrades et al., 2006; Moreno et al., 2008). Also, the addition of starch considerably enhanced water binding, eliminating drip from samples (Bushuk, 1998).

Cooking Yield

Cooking yield was affected by the type of formulation (Figure 5). Restructured products made with MTGase (PM and MM) presented lower cooking yield than the samples with added alginates (PA and MA). This suggests that alginate binds water better than MTGase at cooking temperatures. In fact several authors have reported that addition of MTGase did not influence water binding ability (Kerry et al., 1999; O’Kennedy, 2000; Cofrades et al., 2006). Although samples with MTGase form a better protein net as noted earlier, they undergo syneresis during storage, and water is released. Starch therefore plays an important role in samples with MTGase.

Water retention after cooking was higher in samples MA and MM, made using a cutter, than in samples PA and PM made by kneading, possibly because of greater interaction among proteins-water-ingredients. In addition, in proteins of cold water species like hake, pre-gelification occurs at low temperatures after salt-induced solubilization, due to the endogenous transglutaminase activity present in the muscle (Lanier et al. 2005). After this setting process the water is bound in a protein-protein net that constitutes the gel (Tornberg, 2007). When restructured products are made from muscle pieces, salt and the others ingredients do not blend so well with these pieces, and hence with the myofibrillar proteins. As a result, the net that forms is not as well consolidated as in the “cutting” process, as can be seen in the microphotographs of samples PA and PM (Figures 1C and 1D), which clearly show that the protein net is only partially formed.

Mechanical Properties

As shown in Figure 6, breaking strength (BS) increased sharply over the first 14 days of chilled storage ($p < 0.05$) both in raw and in cooked samples. Moreno et al. 2009 (in process of publication) reported that at 5°C some residual MTGase activity was

observed until 12-24 hours after its addition to the fish muscle; also, breaking strength increased because of the covalent bonds that formed between the ϵ -amino group of lysyl residues and the γ -carboxamide group of glutamyl residues of adjacent proteins. Similar effects were found by Cofrades et al. (2006) in a study of MTGase effects in restructured beef products over a period of 10 days at 3°C, and they reported that MTGase and storage period had a linear effect on hardness of the samples. Breaking strength was greater in samples made with sodium alginate than samples made with MTGase. Irrespective of the ingredients added, in this case MTGase or alginate, the breaking strength of myofibrillar protein nets increases in the course of chilled storage due to the reinforcement of hydrogen bonds during refrigeration (Kim et al., 2004).

After heat treatment of homogenate samples made by cutter adding both alginate and MTGase (MAc and MMc), BS was considerably greater than in the corresponding raw samples (MAr and MMr). In both cases, in addition to the different bonds that formed as result of sodium alginate addition (electrostatic interactions between myofibrillar proteins and alginate) or MTGase (γ -glutamyl)lysine bonds between proteins) there were disulfide bonds that formed as a consequence of heat treatment (Masaki et al., 2001; Gerrard, 2002). Although Breaking Deformation (mm) of all samples tended to be constant throughout chilled storage (Figure 7), some small changes occurred during that period. For instance, there was a considerable decrease ($p < 0.05$) in sample MMc on day 7 and in MAr on day 14.

Binding Tests were carried out on samples made with pieces, PA and PM, to determine the stress rupture strength due to a binding force. As Figure 8 shows, the Strength (N) of samples increased after heat treatment, as was expected, due to the enhancement of disulfide bonding (Masaki et al., 2001; Gerrard, 2002) induced by the heat treatment. It also shows that strength increased during chilled storage, until day 7 ($p < 0.05$) in heated

samples, and only slightly until day 3 ($p < 0.05$) in raw samples. As already noted, this rise in cooked samples, particularly in samples with added MTGase, was due to the formation of disulfide bonds as a consequence of heat treatment. Elongation (mm) values remained quite stable throughout chilled storage (Figure 9).

Colour measurement

Results of colour measurement over the storage period in both raw and cooked samples are shown in Table 5. As the Table shows, Lightness increased slightly over the chilled storage period. Moreover, samples made with pieces (PA and PM) showed lower values than samples MA and MM, irrespective of whether MTGase or sodium alginate was added. This could be due to more the type of mixing and binding than to the effects of alginate or MTGase. In the case of b^* values, the trend was fairly similar to that observed for L^* . Fagan et al. (2003) reported similar results in a study of different fish muscle species over different storage periods.

It was observed that after cooking, L^* generally increased slightly over the storage period. If we compare these values with the values of unheated samples, we find that the latter presented higher values of both L^* and b^* . The variation in b^* was greater than in the raw samples, and also there b^* increased during storage. This is normal and is mainly due to protein denaturation as a consequence of heat treatment (Tornberg, 2007).

CONCLUSIONS

The present study shows that, in the experimental conditions, samples successfully withstood 14 days in chilled stored at 5°C. When sodium alginate was added in the restructuring process, sample ultrastructure was less dense than when MTGase was

added. Samples made with sodium alginate presented better cooking yield regardless of particle size. Mechanical properties increased until days 7-14 of the chilled storage. Regardless of the heat treatment or not, in models made elaborated with “cutter”, breaking strength values rose more during storage in samples made with sodium alginate than in samples made with MTGase. The opposite was the case in samples made by kneading muscle pieces. Lightness remained about the same throughout chilled storage, but yellowness increased slightly.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) for a Predoctoral Scholarship under program I3P-2004. The authors wish to thank the technicians at Instituto del Frío for an excellent pilot plant and laboratory assistance.

REFERENCES

AFNOR. 1999. Norm AF V 08-051. Collection of Microbiological Standards for foods and assimilated articles and other health-related physicochemical parameters.

ANTONNACOPOULOS, N. and VYNKE, W. 1989. Determination of volatile bases in fish : a third collaborative study by th West European Fish Technologist Association (WEFTA). Zeitschriif Lebensmittel-Untersunchung Forschung A 189, 309-316.

AOAC. Official methods of analysis (17th ed.). 2000. Association of Official Analytical Chemistry, Maryland, USA.

BARROSO, M., CARECHE, M. and BORDERÍAS, A.J. 1998. Quality control of frozen fish using rheological techniques. *Trends Food Sci. Technol.* 9(6), 223-229.

B.O.E . 1991. Official State Bulletin 195, 15/08/91. By approving the microbiological standards, limits on heavy metals content and analytical methods for determination of heavy metals for fishery products and aquaculture.

BORDERÍAS, A.J., JIMÉNEZ-COLMENERO, F. and Tejada, M. 1985. Parameters affecting viscosity as a quality-control for frozen fish. *Mar. Fish. Rev.* 47(4), 43-45.

BUSHUK, W. 1998. Interactions in wheat doughs. In: *Interactions: The key to cereal quality*. American Assoc. Cereal Chemist, Inc. St. Paul MN, USA, pp. 1-16.

COFRADES, S., AYO, J., SERRANO, A., CARBALLO, J. and JIMÉNEZ-COLMENERO, F. 2006. Walnut, microbial transglutaminase and chilling storage time effects on salt-free beef batter characteristics. *Eur. Food Res. Int.* 222(3-4), 458-466.

CSIC, 2007. Inventores: Borderías, A.J., Carballo, J. and Moreno, H.M. Conformación de miotomos y mioseptos en productos pesqueros reestructurados. ES 2 281 282 A1 (16/09/2008). W0 2007/090916 A1 (16/08/2007).

FAGAN, J.D., GORMLEY, T.R. and MHUIRCHEARTAIGH, M.U. 2003. Effect of freeze-chilling, in comparison with fresh, chilling and freezing, on some quality parameters of raw whiting, mackerel and salmon portions. *Lebensm-wiss. u. Technol.* 23, 647-655

FIELD, R.A. and WILLIAMS, J.C. 1984. Prasad VS, Cross HR, Secrist JL, Brewer MS, An objective measurement for evaluation of bind in restructured lamb roasts. *J. Texture Stud.* 15(2), 173-178.

FISHER, R.A. 1999. Seafood restructuring using cold-set binding technology. VSGPCP-G-99-002:16.

GERRARD, J.A., FAYLE, S.E., BROWN, P.A., SURRON, K.H., SIMMONS, L. and RASIAH, I. 2002. Effects of microbial transglutaminase on the wheat proteins of bread and croissant bough. *J. Food Sci.* 66(6), 782-786.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., MONTERO, P., SOLAS, M.T., and PÉREZ-MATEOS, M. 2005. Effect of chitosan and microbial transglutaminase on gel forming ability of horse mackerel *Trachurus* spp. muscle under high pressure. *Food Res. Int.* 38(1), 103-110.

IRONSIDE, J.I.M. and LOVE, R.M. 1985. Studies on protein denaturation in frozen fish i. Biological factors influencing the amounts of soluble and insoluble proteins present in the muscle of the North Sea Cod. *J. Sci. Food Agric.* 9, 597-617.

JIMÉNEZ-COLMENERO, F. and BORDERÍAS, J.A. 1983. A study of the effect of frozen storage on certain functional properties of meat and fish protein. *J. Food Technol.* 18, 731-737.

KERRY, J.K., O'DONNELL, A., BROWN, H., KERRY, J.P. and BUCKLEY, D.J. 1999. In: Proceedings 45th international Congress of Meat Science and Technology, 1-6 August, Yokohama, Japan, pp. 140-141.

KIM, B.Y., PARK, J. and YOON, W. 2004. Rheology and texture properties of surimi gels. In *surimi and surimi seafood*. Ed. By J. Park, CRC Press, Boca Raton, FL

KUMAR, M., SHARMA, B.D. and KUMAR, R.R. 2007. Evaluation of sodium alginate as a fat replacer on processing and shelf-life of low-fat ground pork patties. *Asian-Australasian J. Animal Sci.* 20(4), 588-597.

KURAIISHI, C., SAKAMOTO, J., YAMANAZAKI, K., SUSAKI, Y., KUHARA, C. and SOEDA, C. 1997. Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *J. Food Sci.* 62(3), 488-490+515.

KURAISHI, C., YAMAZAKI, K. and SUSA, Y. 2001. Transglutaminase: Its utilization in the food industry. *Food Rev.* 17(2), 221-246.

LANIER, T.C., CARVAJAL, P. and YONGSAWATDIGUL, J. 2005. Surimi gelation Chemistry. In *Surimi and Surimi Seafood*. Ed. Jae W. Park. Taylor & Francis group. Second edition, pp. 435-477.

LEE, H.G., LANIER, T.C., HAMANN D.D. and KNOPP, J.A. 1997. Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein sols. *J. Food Sci.* 62(1), 20-24.

MASAKI, L. 2001. Thermal stability and enzymatic activity of a smaller lysozyme from silk moth (*Bombyx mori*). *J. Protein Chem.* 20, 107-117.

AJINOMOTO MANUAL, Activa® WM. 2009. Ajinomoto Co's Transglutaminase Activa Modification of Physical properties of Protein. <http://meat-n-more.info/test/englisch/activa/back/back01.htm>

MEANS, W.J. and SCHMIDT, G.R. 1986. Algin Calcium Gel as a Raw and Cooked Binder in Structured Beef Steaks. *J. Food Sci.* 51 (1), 60-65.

MONTERO, P., HURTADO, J.L. and PÉREZ-MATEOS, M. 2000. Microstructural behaviour and gelling characteristics of myosystem protein gels interacting with hydrocolloids. *Food Hydrocoll.* 14 (5), 455-461.

MORENO, H.M., CARBALLO, J. and BORDERÍAS, A.J. 2008. Influence of Alginate and Microbial Transglutaminase as binding ingredients on restructured fish muscle processed at low temperature. *J. Sci. Food. Agric.* 88, 1529-1536.

MORENO, H.M., CARBALLO, J. and BORDERÍAS, A.J. 2009. Gelation of fish muscle using microbial transglutaminase and the effect of sodium chloride and pH levels. *J. Muscle Food* . Accepted, 2008. In press.

MOTOKI, M. and SEGURO, K. 1998. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends Food Sci. Tech.* 9(5), 204-210.

O'CONNOR, P.L., BREWER, M.S., MCKEITH, F.K., NOVAKOFSKI, J.E. and CARR, T.R. 1993. Sodium lactate/sodium chloride effects on sensory characteristics and shelf-life of fresh ground pork. *J. Food Sci.* 58, 978-980 +986.

O'KENNEDY, B. T. and KELLY, P. M. 2000. Evaluation of milk protein interactions during acid gelation using a simulated yoghurt model. *Milchwissenschaft.* 55, 187-190.

PARK, J.W. 1995, "Surimi Gel Colors as Affected by Moisture-Content and Physical Conditions", *Journal of Food Science*, vol. 60, no. 1, pp. 15-18.

PARK J.W. 2005. Ingredient technology for surimi and surimi seafood. In: Park JW, editor. Second edition ed. FL. USA.: CRC Press. Boca Raton.; pp. 649-707.

PÉREZ-MATEOS, M., SOLAS, T. and MONTERO, P. 2002. Carrageenans and alginate effect on properties of combines pressure and temperature in fish mince gels. *Food Hydrocoll.* 16, 225-233.

RAHARJO, S., DEXTER, D.R., WORFEL, R.C., SOFOS, J.N., SOLOMON, M.B., SHULTS, G.W. and SCHMIDT, G.R. 1994. Restructuring Veal Steaks with Salt. *J. Food Sci.* 59(3), 471-473.

RAHARJO, S., DEXTER, D.R., WORFEL, R.C., SOFOS, J.N., SOLOMON, M.B., SHULTS, G.W. and SCHMIDT, G.R. 1995. Quality Characteristics of Restructured Beef Steaks Manufactured by various Techniques. *J. Food Sci.* 60(1), 68-71.

RAMÍREZ, J.A., SANTOS, I.A., MORALES, O.G., MORRISEY, M.T. and VÁZQUEZ, M. 2006. Application of Microbial Transglutaminase to improve mechanical properties of surimi from silver carp. *Sci. Tech. Aliment.* 3(1), 21-28.

ROSELL, C.M., ROJAS, J.A. and DE BARBER, C.B. 2001. Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food Hydrocoll.* 15(1), 75-81.

SALLAM, KH.I. and SAMEJIMA, K. 2004. Microbial and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. *Lebensm-wiss. u. Technol.* 37, 865-871.

SÁNCHEZ-ALONSO, I., HAJÍ-MALEKI, R. and BORDERÍAS, A.J. 2007a. Wheat fiber as a functional ingredient in restructured fish product. *Food Chem.* 100, 1037-1043.

SHAND, P.J., SOFOS, J.N. and SCHMIDT, G.R. 1993. Properties of Algin Calcium and Salt Phosphate Structured Beef Rolls with Added Gums. *J. Food Sci.* 58(6), 1224-1230.

SUKLIM, K., FLICK, G.J., L MARCY, J.E., EIGEL, W.N., HAUGH, C.G. and GRANATA, L.A. 2004. Effect of cold-set binders: Alginates and microbial transglutaminase on the physical properties of restructured scallops. *J. Text. Stu.* 35 (6), 634-642.

TOLSTOGUZOV, V.B. 1986, "Functional properties of protein-polysaccharide mixture." in *Functional properties of food macromolecules.*, eds. J.R. Michell & D.A. Ledward, Elsevier Applied Science Publishers Ltd., pp. 385-415.

TORNBERG, E. 2007. Effects of heat on meat proteins-Implications on structure and quality of meat products. *Review. Meat Sci.* 70, 493-508.

URDANGARIN, M., SHIGERU, K., RYO, S. and HIROKI, S. 2004. Improved solubility and stability of carp myosin by conjugation with alginate oligosaccharide. *Fish. Sci.* 70, 896-902 .

URESTI, R. M., TÉLLEZ-LUIS, S. J., RAMÍREZ, J. A., and VÁZQUEZ, M. 2004. Use of dairy proteins and microbial transglutaminase to obtain low-salt fish

products from filleting waste from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Food Chem. 86(2), 257-262.

VÁCHA, F., NOVIK, I., ŠPÍČKA, J. and PODOLA, M. 2006. Determination of the effect of microbial transglutaminase on technological properties of common carp (*Cyprinus carpio L.*) meat. Czech. J. Anim. Sci. 51(12), 535-542.

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

TABLE 1.
RESTRUCTURED ELABORATED WITH SODIUM ALGINATE

Samples*	% NaCl	% Sodium alginate	% CaCl ₂	% Starch
MA	1.5	0.5	0.1	0.8
PA	1.5	0.2	0.1	0.8

*MA: cutting processing and alginate added; PA: kneading small pieces and alginate added

TABLE 2.
RESTRUCTURED ELABORATED WITH MICROBIAL TRANSGLUTAMINASE

Sample	% NaCl	% MTGase	% Sodium caseinate	% Starch	% H ₂ O
MM	4.0	1.0	0.8	0.8	5.0
PM	1.5	0.5	0.8	0.8	5.0

*MM: cutting processing and MTGase added; PM: kneading small pieces and MTGase added

TABLE 3.
MICROBIAL COUNTS OF RESTRUCTURED DURING CHILLED STORAGE (log UFC/g)

Samples**	1	3	7	14	21
MA	2.389	2.000	2.151	2.000	3.579*
PA	2.658	2.989	3.301	5.091*	5.778*
MM	2.151	2.151	2.000	2.000	3.962*
PM	2.989	2.812	2.998	3.239	6.66*

*p<0.05 throughout storage period. ** See Tables 1 and 2 for samples code

TABLE 4.
CHANGES IN SALT-SOLUBLE PROTEINS
DURING CHILLED STORAGE (%soluble
protein/total protein)

Samples**	Storage period (days)	
	0	1*
fish muscle	60.33±0.59	-
MA	-	34.41±0.71
PA	-	45.25±0.61
MM	-	24.05±0.67
PM	-	41.41±1.04

*5°C/24 hour of setting.**See Tables 1 and 2 for samples code

TABLE 5
 COLOR MEASUREMENT EVOLUTION DURING CHILLING STORAGE OF
 RESTRUCTURED SAMPLES

Samples**	Day	raw		cooked	
		L*	b	L*	b
MA*	1	70.62± 1.15a	8.48 ±0.16a	74.35± 2.19a	11.08± 0.81a
	3	70.81± 0.88a	9.02 ±0.51a	75.95± 3.53a	11.44± 0.44a
	7	71.24 ±1.84a	9.77 ±0.31a	77.98 ±1.81b	14.51± 0.49b
	14	72.12± 1.22b	10.72± 0.14b	77.36± 1.16b	14.39 ±0.88b
	21	71.49± 1.101a	11.26± 0.45b	76.31± 0.65a	15.04± 0.21b
PA*	1	57.11 ±1.13a	4.69± 0.21a	68.14± 5.68a	7.79 ±1.61a
	3	57.32± 2.91a	4.69 ±1.64a	65.59± 1.04b	9.55± 0.72a
	7	59.17± 0.85b	5.64± 0.32b	70.39± 1.36a	11.98± 1.31b
	14	61.29± 3.62c	6.22±1.35b	69.59± 1.28a	11.91 ±1.84b
	21	62.02± 2.89c	6.95 ±0.66b	70.72± 0.39a	12.47 ±0.58b
MM*	1	69.91± 1.55a	7.41± 0.14a	74.75± 2.44a	10.15± 0.68a
	3	70.27± 0.51a	7.96± 0.21a	77.63± 0.82b	11.71± 0.39a
	7	72.63± 0.74b	9.32± 0.33b	77.89± 0.56b	14.56± 1.08b
	14	72.11± 1.15b	9.25± 0.52b	74.801±1.73b	13.47± 3.56b
	21	71.71± 1.29b	9.99 ±0.35b	77.45± 0.94b	18.31± 0.91c
PM*	1	59.95± 0.72a	4.47± 0.44a	63.92 ±3.53a	7.11 ±1.04a
	3	63.08± 3.27b	6.52 ±2.21b	71.59 ±0.85b	9.55± 0.72b
	7	62.27 ±1.24b	5.93 ±1.31b	71.59± 1.24b	11.98 ±0.78c
	14	62.11± 0.86b	6.91± 1.17b	69.58± 1.29b	12.13± 1.12c
	21	64.59± 0.55b	7.33± 1.12b	69.34± 0.97b	15.46± 197d

*Different letters in each parameter during chilled storage mean statistical differences (p<0.05)

**See Tables 1 and 2 for samples code

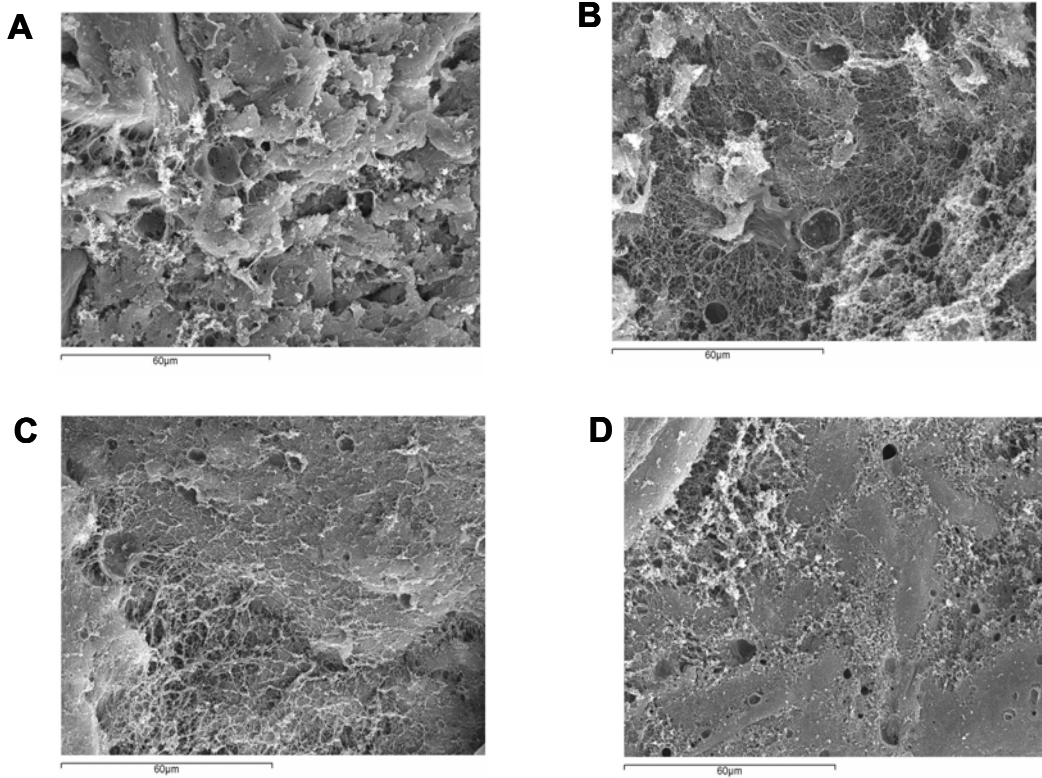


FIG. 1. SCANNING ELECTRON MICROSCOPY MICROGRAPHS (x1000 magnification) OF RESTRUCTURED AFTER 1 DAY OF SETTING AT 5°C. A: MA; B: MM; C: PA; D: PM. See Tables 1 and 2 for samples code.

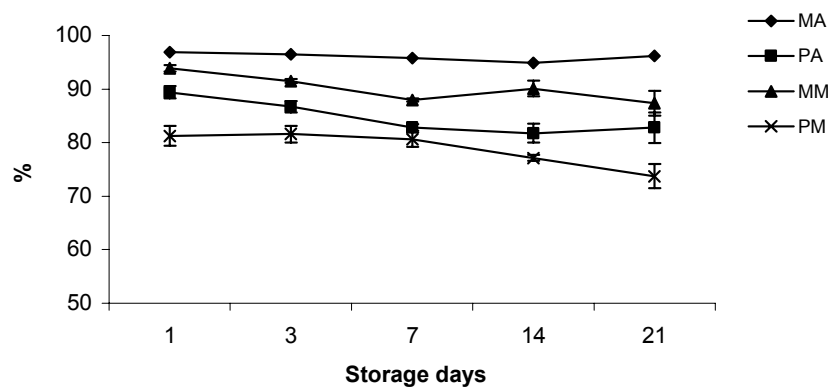


FIG. 2. COOKING YIEL (90°/10 min) THROUGHOUT CHILLED STORAGE. See Tables 1 and 2 for samples code.

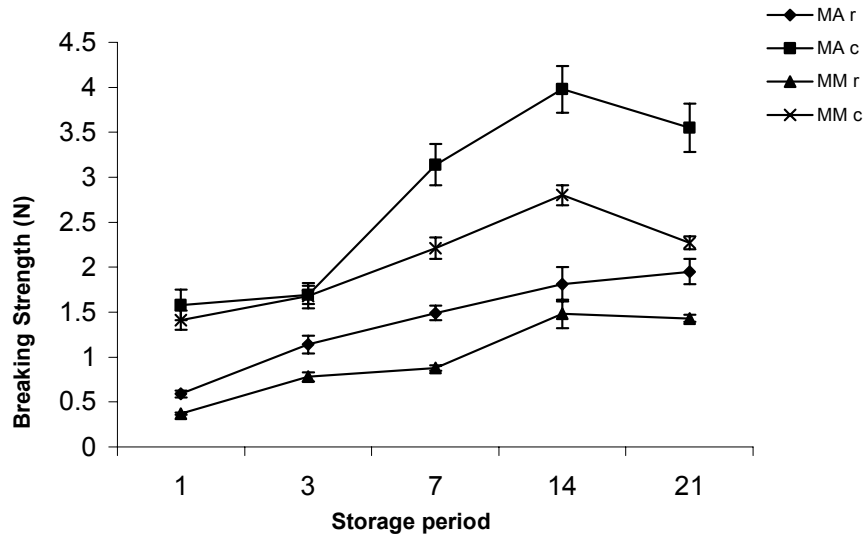


FIG. 3. BREAKING STRENGTH (N) EVOLUTION THROUGHOUT CHILLED STORAGE. See Tables 1 and 2 for samples code. r: raw; c: cooked.

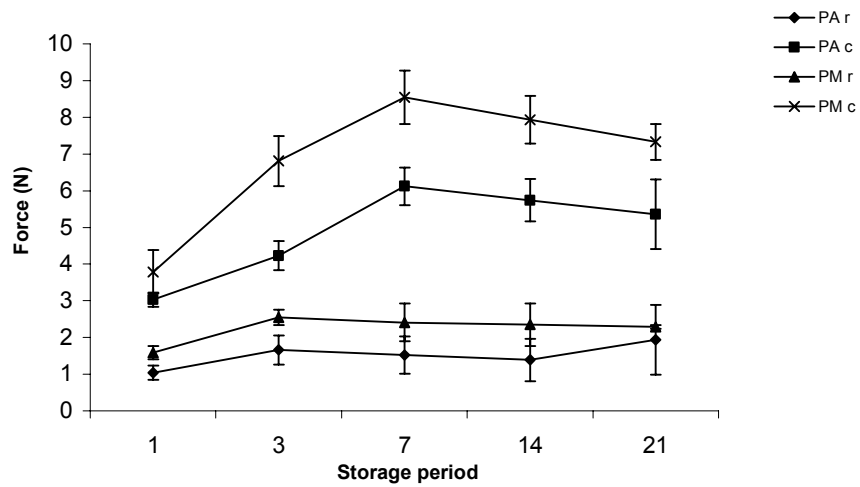


FIG. 4. FORCE (N) EVOLUTION THROUGHOUT CHILLED STORAGE. See Tables 1 and 2 for samples code. r: raw; c: cooked.

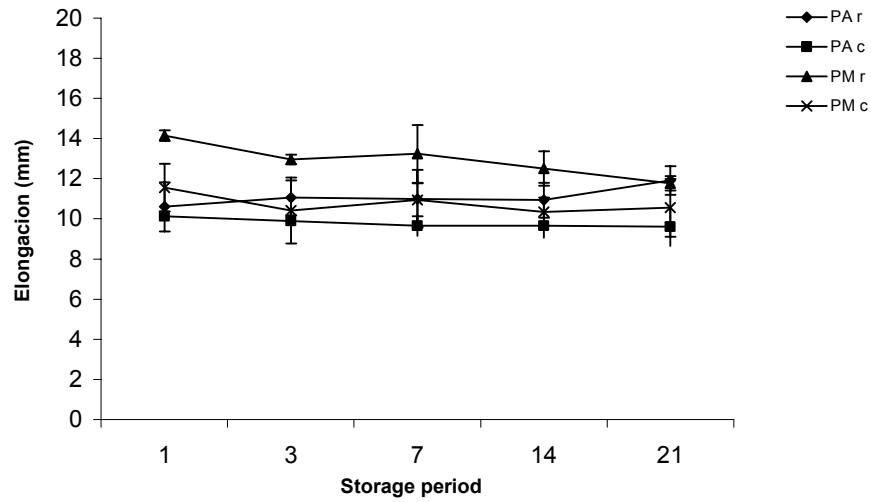


FIG. 5. ELONGACION (mm) EVOLUTION THROUGHOUT CHILLED STORAGE. See Table 1 and 2 for sample code. r:raw; c:cooked.

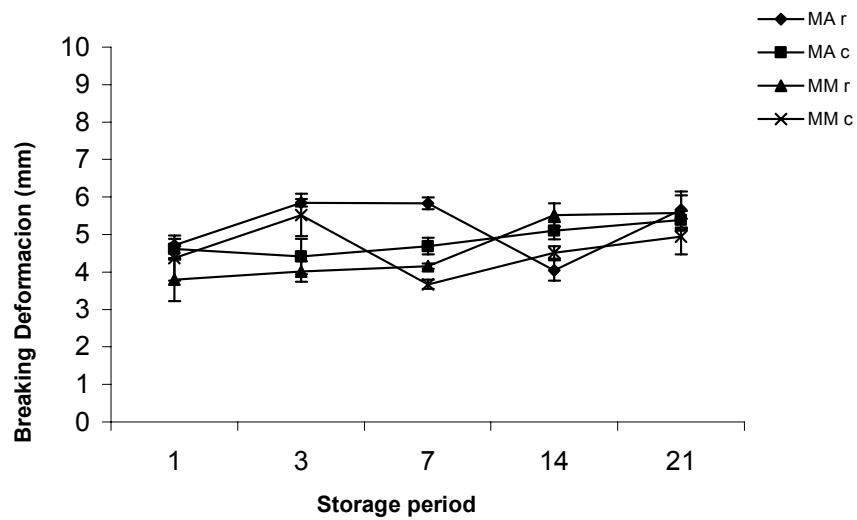


FIG. 6. BREAKING DEFORMATION (mm) EVOLUTION THROUGHOUT CHILLED STORAGE. See Table 1 and 2 for sample code. r:raw; c:cooked.

V.3.2.- ESTUDIO DE LOS CAMBIOS EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEBIDOS A LA OXIDACIÓN DE LOS LÍPIDOS Y/O PROTEINAS DURANTE LA CONSERVACIÓN EN REFRIGERACIÓN DE REESTRUCTURADOS DE MÚSCULO DE MERLUZA Y TRUCHA ELABORADOS CON ALGINATO SÓDICO Y TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA.

“Oxidation of Restructured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Restructured Hake (*Merluccius merluccius*) Enriched with Fish Oil during Chilled Storage”.

Helena M Moreno; A. Javier Borderías; Caroline P. Baron.

Journal of Agricultural and Food Chemistry (Enviado, Marzo 2009)

Oxidation of Restructured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Restructured Hake (*Merluccius merluccius*) Enriched with Fish Oil during Chilled Storage.

Helena M. Moreno¹, Javier A. Borderias¹, Caroline P. Baron^{2*}

¹ Departamento de Ciencia y Tecnología de la Carne y Productos Cárnicos y del Pescado y Productos de la pesca, Instituto del Frío (CSIC), C/José Antonio Nováis 10, E-28040 Madrid, Spain.

² The Technical University of Denmark, National Institute of Aquatic Resources (DTU AQUA), Department of seafood Research, building 221, Søtofts Plads, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark.

*Corresponding author. Tel +45 45254919; Fax: +45 45884774.

E-mail address: cba@aqua.dtu.dk

ABSTRACT

Cold gelation trials were carried on trout mince (*Oncorhynchus mykiss*) using 1.5% sodium chloride, 1.5% sodium caseinate and 1% microbial transglutaminase (MTGase). In addition, similar trials were performed with hake mince (*Merluccius merluccius*) with or without the addition of 5% cod liver oil. Obtained restructured products were stored at 4 °C for 6 days and sampled every day for investigation of their physicochemical properties and their oxidative status. Hardness, cohesiveness, and gumminess were analysed using a texture profile analyser and water holding capacity was analysed by centrifugation. Lipid oxidation was followed by measuring primary lipid and secondary oxidation (peroxides and thiobarbituric reactive substances, respectively). Protein oxidation was investigated by measuring protein carbonyls and immuno-blotting against carbonyls groups. In addition gel electrophoresis and myosin immuno-blotting were performed respectively to investigate myosin cross-linking. Results indicated that MTGase was able to generate gels with good properties for both trout and hake restructured products. However, in the presence of oil the activity of MTGase seemed impaired as it took longer for the gels to reach maximum hardness. In addition, all samples containing MTGase also had more protein carbonyls groups. Gels prepared with trout were oxidised whilst gels prepared with hake were very stable toward oxidation even in the presence of 5% cod liver oil. It is concluded that addition of fish oil to lean fish such as hake might be a good alternative for generating new type of omega-3 enriched raw fish restructured products, which are quite stable during chilled storage. However, the impact of the matrix properties and composition on MTGase activity such as for example oil content, oil type, proteolysis might deserve more attention.

KEYWORDS: Restructured raw product, microbial transglutaminase, cold gelation, protein oxidation, lipid oxidation, fish.

INTRODUCTION

Cold-gelation technology is being implemented by fish industries with the clear objective of commercializing of new type of restructured fish products in their raw state. These cold-restructured products proposed chilled are prepared from mince of fish muscle, and can present properties similar to cuts from intact muscle (1, 2). Cold gelation is a complex process that starts with conditioning of the muscle proteins, which introduce some conformational changes in the protein structure allowing gelation. The properties of the gels obtained are affected not only by the quality of fish protein used but also by the types of ingredients used to induce gelation (3). Although there are several additives with the ability to bind muscle particles, the use of enzymes to modify protein structure is an important way of improving their functional properties (4). One of the most distributed enzymes employed to improve the mechanical and functional properties of food is microbial transglutaminase (MTGase). MTGase catalyzes the intra- and intermolecular transverse crosslinking of proteins by an acyl transfer reaction between γ -carboxamide groups of glutamine residues of proteins and primary amines, such as lysine, making it possible to create large polymeric protein structures. The structure of the protein is stabilized by strong covalent cross-links between the peptides chains (5, 6). MTGase has been extensively studied and is widely accepted in the food industry as a processing aid or as a binding ingredient. It is one of the most common binding ingredients used for binding fish muscle and it can easily be used for processing fish muscle in its raw state. Recent investigations showed that MTGase can induce gelation under chilling conditions and that used in combination with salt and sodium caseinate MGTase can generate gels with good physico-chemical properties (1, 7, 8). Caseinate is an excellent substrate for microbial MTGase working at cold temperatures making easy protein polymerization during the enzymatic reaction with fish muscle proteins, binding fish pieces together (8, 9). It has been reported that different fish species had different susceptibility to transglutaminase due

difference in the conformation of their actomyosin complex (10). Fatty fish such as rainbow trout have a high content of polyunsaturated fatty acid, i.e. omega-3, eicosapentanoic acid (EPA) and docosahexanoic acid (DHA), which has health promoting and beneficial cardiovascular effects and could be a good raw material for preparing restructured fish products. Indeed, with its high content in omega-3 fatty acids rainbow trout restructured products could contribute to delivering to the consumer a new type of product with the potential to increase their intake of omega-3. However, it has been reported that fatty fish do not respond to MTGase as well as lean fish because fat has an adverse effect on the binding properties of the fish pieces together (11). Furthermore, long chain fatty acids are fairly susceptible to oxidation which can lead to significant deterioration in sensory quality, a loss of functionality and in general modifications of the physical properties of fish muscle during storage (12, 13). In addition it has also been reported that oxidised protein do not set as well as non oxidised protein in the presence of MTGase (14). Interaction between lipid oxidation and protein oxidation could also affect the physico- chemical properties of the gels formed. Therefore the aim of this study was to investigate if MTGase was able to generate gels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mince. In addition, the ability of MTGase to induce gel in the presence of oil was further evaluated by adding fish oil to hake (*Merluccius merluccius*) mince. Oxidative stability of the different restructured products obtained was evaluated during chilling storage by measuring lipid and protein oxidation in both trout and hake. Relationship between changes in physico-chemical properties of the restructures products and lipids and protein oxidation in trout and hake restructured products is further discussed.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Fresh trout (*Oncorhynchus mykiss*) and hake (*Merluccius merluccius*) were purchased from local shops, filleted and skinned. The fish were used immediately for the

experiment and were not stored frozen. Microbial transglutaminase (MGTase) (ACTICA®WM 1% in maltodextrine/lactose) was from Ajimoto Co. (Tokyo, Japan), sodium caseinate was from Arla (Arla A/S, Braband, Denmark). Cod liver oil was from Maritex (Sortland, Norway).

Sample preparation. The trout and hake fillets were trimmed for dark muscle and fat and minced in a robocoupe R4 (Robotcoupe A/S, France) for 2 x 30 sec. A sample of the mince (25g) was taken out; vacuum packed and immediately frozen at -80°C for further characterisation of the raw material. Subsequently, the mince was used to prepare restructured trout and hake products. The composition of the samples is presented in **Table 1**.

The ingredients were added one by one and in the following order: sodium chloride, sodium caseinate, and MTGase dissolved in water (which represents 5% from the total composition), in a Kenwood Auto Pro 800W blender and mixed for 2x30 sec. For hake samples prepared with cod liver oil (5%), the oil was added first. Control samples were prepared without any ingredients, but only adding 5% of water. The obtain dough was blended for an additional 1 min at the end of the addition of the different ingredients to ensure a homogeneity. The dough was divided in samples of approx. 100g, placed in Petri dishes (diameter 96 mm, height 16 mm), vacuum packed and placed at 4°C overnight (18h) in order to allow the gel to set. The next day samples were taken out of the dishes and wrapped in plastic foil (no vacuum) and placed in the fridge for up to 6 days. Samples were analysed regularly during the entire storage period for colour, texture and water binding, although most of the results are presented for day 1 and 6. Samples for protein and lipid analysis were vacuum-packed and placed at -80 °C until further analysis.

Water Content. The water content of the raw sample was determined according to the AOAC (15). Samples were measured by triplicate.

Oil Content. Samples of 10g in duplicate were used for determination of the oil content using chloroform and methanol (1/2; v/v) according to the protocol of Bligh & Dyer (16)

Fatty acid composition. Fatty acids profiles of the initial minces were performed using the lipid extract. Cod liver oil fatty acid profile was also determined. Fatty acids were transesterified to methyl ester using a base catalyzed transesterification followed by a boron-trifluoride catalyzed esterification according to the AOCS (17). The methyl esters were dissolved in n-heptane to a concentration of about 20 mg/ml. A HP 5890 gas chromatograph (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) equipped with a flame ionization detector was used for separation of the fatty acid methyl esters. The column was an Omegawax 320 fused silica capillary (0.32 mm x 30 m x 0.25 μm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The injection volume was 0,2 μl injected in the split mode with a split ratio of 1:50. The injection and detection temperature program were 250 $^{\circ}\text{C}$ and 240 $^{\circ}\text{C}$ respectively. The initial oven temperature was 160 $^{\circ}\text{C}$, immediately raised by 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 200 $^{\circ}\text{C}$, held for 1 min, further raised by 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 220 $^{\circ}\text{C}$ and held for 12 min. The helium carrier gas flow was 21 cm s^{-1} .

Fatty acid composition of the trout, hake and oil used in the experiment are presented in **Table 2**.

Antioxidants. Tocopherol and astaxanthin content was determined in trout, while only tocopherol was determined in hake and oil samples. Antioxidants content for the fish was determined on the lipid extract which was evaporated under nitrogen and redissolved in 2 ml n-heptane before injection. For the oil, a sample was directly diluted in 2 ml n-heptane.

Tocopherols: For tocopherols determination an aliquot of the n-heptane fraction (40 µl) was injected onto an HPLC (Agilent 1100 series Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipped with a fluorescence detector. An aliquot was applied onto a Spherisorbs 5w column (250 mm X 4.6 mm) (phase separation Ltd, Deeside, UK) and eluted with an isocratic mixture of n-heptane/2-propanol (100:0.4; V/V) at a flow of 1 ml/min. Detection was performed using the fluorescence detector with excitation at 290 and emission at 330 nm and according to the AOCS (17).

Astaxanthin: Astaxanthin content was determined after injection of an aliquot (50 µl) of the n-heptane fraction onto an HPLC (Agilent 1100 series Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with a UV diode Array detector. The aliquot was applied to a LiChrosorb S160 column (100 mm x 3 mm, 5µM) equipped with a Crompsep silica (S2) guard column (Chrompack, Middleburg, The Netherlands) and eluted with a flow of 1.2 ml/min using n-heptane /acetone (86:14, v/v) and detection at 470 nm.

Lipid Oxidation.

Peroxide Values: Peroxides values were measured on the lipid extract by colorimetric determination using the ferric thiocyanate assay as described by Shantha and Decker (18). Results were expressed in milliequivalents of peroxide per kilogram of oil.

TBARS determination: Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were determined using a modified method described by Vyncke (19). Fifteen grams of samples were mixed with 30 ml of trichloroacetic acid (TCA 75%). Samples were homogenized for 15 sec at 20000 rpm with an Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, IKA-Werk, Stauffeb, Germany) and then filtered on Munktell filter paper (H, Stora, Gycksbo, Sweeden). Five ml of filtrate were added to 5 ml thiobarbituric acid solution (20 mM). The samples were heated at 90°C for 40 min and

rapidly cooler down in ice. Absorbance was read at 530 nm. The results were expressed as mg of malonaldehyde equivalents per kg of sample (MDA eq/kg).

Protein Carbonyls. Protein carbonyls were measured as described by Levine et al. (20). A sample (0.5g) was homogenized in 10 ml Tris buffer (pH: 7.4, 50 mM, 1mM EDTA) containing 0.01% BHT. The homogenate (100 μ l) was precipitated with TCA. After centrifugation (13500 g, 3 min) the pellet was incubated with DNPH in 2 M HCl, in the dark for 1h. For each sample a blank incubated in 2M HCl and without DNPH was run in parallel. The samples were precipitated with TCA and the pellets were washed three times with 1 ml ethanol/ethyl acetate 1:1 (v/v). The pellet was redissolved in 6 M guanidine chloride in 20 mM KH_2PO_4 . The carbonyl content was calculated from absorbance measurements at 370 nm and at 280 nm.

SDS-PAGE and Immuno-blotting: Homogenate from hake and trout samples stored for 1 and 6 days were prepared by homogenizing 0.5 g of sample in 10 ml of Tris HCl (pH 7.4; 50 mM). The protein concentration of the homogenates was adjusted to 1 mg/ml using the BCA kit (Pierce, Rockford, IL, USA), before dilution 1:1 with laemmli sample buffer. The samples were boiled 3 min, centrifuged and loaded on the gel (10% Bis-tris, Invitrogen, Invitrogen A/S, Taastrup, Denmark). After the run one gel was stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 and the other one was used for immuno-blotting. The proteins were transferred to nitrocellulose membrane (0.45 μ M Millipore, Billerica, MA, USA) using a Mini Cell SureLock, equipped with a XCell II blot module (Invitrogen A/S, Taastrup, Denmark) for approximately 60 to 70 min. After transfer the membranes were blocked in 5% skim milk in Tris-buffered saline (TBS) buffer (0.137 M NaCl and Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM), and incubated with a 1:5000 dilution of a mouse anti-myosin heavy chain (Upstates, Lake Placid,

NY, USA) in 1% skim milk, in TBS for 1 hour. The membranes were washed in TBS 3x10 min and incubated in a 1:10000 dilution of the secondary antibody peroxidase-conjugated swine anti-mouse antibody (DAKO, Glostrup, Denmark) in TBS. After washing 3x10 min in TBS the blot was incubated for 1 min in 2.7 mM H₂O₂, 0.07 mM p-coumaric acid, and 1.25 mM luminol (3-aminophthalhydrazide) in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.6. Chemiluminescence was detected on hyper-film ECL (GE, Health Sciences, Brøndby, Denmark).

Protein carbonyls immunoblot: Protein carbonyls groups were derivatized using DNPH and was performed directly on the fish homogenates prepared from sample after 5 days of storage, which concentration was adjusted to 5 mg/ml using the BCA kit (Pierce, Rockford, IL, USA). The samples (30 µl) were mixed 1:1 with 12% SDS and further diluted with 60 µl DNPH in 10 % TFA and incubated for 1 h in the dark at room temperature. The reaction was stopped by adding 60 µl neutralizing solution (1.85 M Trizma-bas, 28% glycerol and 0.1 M DTT). The samples were centrifuged for 3 min at 12000 rpm and loaded on the gel (10% Bis-tris gels, Invitrogen, Invitrogen A/S, Taastrup, Denmark). After the run the proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane 0.2 µM (Millipore, Billerica, MA, USA) using a Mini Cell SureLock, equipped with a XCell II blot module (Invitrogen A/S, Taastrup, Denmark) for 1 hour. After transfer the membranes, they were blocked in 5% skim milk in Tris-buffered saline (TBS) buffer (0.137 M NaCl and 20 mM Tris-HCl, pH 8.0), and incubated with a 1:15000 dilution of rabbit anti-DNP (DAKO Denmark AS, Glostrup, Denmark) in 1% skim milk, in TBS for 1 hour. The membranes were washed in TBS and incubated in a 1:7500 dilution of the secondary antibody, peroxidase-conjugated swine anti-rabbit (DAKO). After washing in TBS the blot was developed using chemilumiscence as described above.

Texture Measurements. Texture profile analysis (TPA) was performed using cores of 16 mm diameter and approximately 16 mm height. For each samples 4 cores were removed and compressed by 40% of their original height using a plunger with a diameter of 5 mm approx applied at a speed of 1 mm/s. Attributes such as hardness, cohesiveness and gumminess were calculated according to Bourne (21).

Water Binding Capacity. Water binding capacity was measured according to Eide et al. (22). Samples were cut into as small as possible pieces and then were placed in centrifuge tubes and centrifuged 1500 g at 10°C for 5 min in a Sigma 4K10 bench top centrifuge (SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Germany). Water binding capacity is expressed as % of water retained relative to the amount of water present in the sample prior to centrifuge.

Color Measurement. Lightness (L^*), redness (a^*) and yellowness (b^*) were measured on the surface of the different products at 6 different spots, immediately after their preparation and subsequently during storage using a colorimeter (Minolta Chroma Meter Cr-200, Japan) with the CIE Lab color scale.

Statistical Analysis. One-way analysis of variance were carried out with the SPSS[®] computer programme (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), and differences between pairs of mean at different days of storage were evaluated by the Bonferroni Test using a 95% confidence interval. One way ANOVA was conducted in the rest of data analysis using Statgraphics 2.1 (STSC Inc., Rockville, MD). The difference among means was analysed using a Tukey HSD test ($p < 0.05$).

RESULTS

Restructured Trout: The mince from trout used in the experiment, had a moisture content of 75.8%, and an oil content of 3.4%. The peroxide value was 1.18 meq peroxides/kg oil and the antioxidants astaxanthin and α -tocopherol were 2.86 mg/kg and 4.91 mg/kg wet weight, respectively. The fatty acid composition of the mince is presented in **Table 2**.

The development of primary lipid oxidation products was followed during storage and peroxide values are presented in **Figure 1A**. There was a significant increase in peroxides for TB and TN with values of 5.9 meq/kg and 13.0 meq/kg, respectively, after the 6 days of chilled storage. In contrast to TN and TB, TC, had a very low peroxide level at day 1 (1.1 meq/kg) and did not show any significant increase in the level of lipids peroxides throughout the entire storage period, indicating no lipid oxidation. The TBARS profile for all trout samples (TC, TN and TB) is presented in **Figure 1B**. As observed for the peroxides values the TBARS indicated no oxidation in the control sample (TC). TB and TN showed a marked increase in TBARS for the first 3 days and reached values of 30.27 to 35.11 μ gMDA/kg respectively, after 6 days without any significant difference between TB and TN (**Figure 1A**).

The colour was measured at the surface of the samples at the start and at the end of the storage period (**Table 3A**). The a^* value which represents redness was around 8 for all samples at the start of the storage period, no decrease was observed for TC samples whilst for both TB and TN samples a significant and similar decrease was observed in a^* value which reached a value of approximately 5 at the end of the storage period. In addition, a significant increase in lightness (L^* value) was also observed in these samples. These changes in redness and in lightness in TB and TN samples correlated with the increase in TBARS and PV observed for these samples. However, no change in the astaxanthin content was measured in any of the

samples (**Table 4A**) but a significant decrease in α -tocopherol was observed over time for TB samples ($p < 0.05$).

In the present work, mechanical properties of samples were determined by using Texture Profile Analysis (TPA). Hardness of the trout samples are presented in **Figure 2**. Samples prepared without MTGase (TC and TN) stayed soft during the entire storage period. However, TN hardness seemed to increase slightly during storage probably due to endogenous TGase. In contrast and as expected samples with MTGase (TB) were harder with a maximum force of 2 N at day 1 but reached their maxima of 6 N after 3 days of storage. The gumminess of the TB sample was also significantly higher than the other samples at day 1 and increase during storage (**Table 5A**) although cohesiveness seemed to be rather similar for all samples and constant during the entire storage period.

The water binding capacity presented in **Table 5A** was the highest for TC and TB samples and reached a value of approximately 95%. In contrast, TN had a significantly reduced WBC compared to TC and TB. During storage WHC of all samples increased slightly, however the ranking stayed the same with $TB \approx TC > TN$.

SDS-PAGE of the samples at day 1 and day 6 is presented in **Figure 4A**. A decrease in the myosin band was observed for TB compared to TC and TN already at day 1. Formation of higher molecular weight aggregate was also observed above the 220 kDa (corresponding to myosin heavy chain) for TB. However, after 6 days of storage, the myosin band almost completely disappeared. The immuno-blot against myosin (**Figure 5A**) did confirm the formation of cross-linked myosin at day 1 for TB but these aggregated were not as intense at day 6. As expected, myosin blot for TN and TC samples did not reveal the formation of a significant amount of large aggregates.

Protein carbonyls groups are presented in **Table 6A** and no significant differences were observed between samples at day 1. However, TB samples had a significantly higher value

than TC and TN at day 6. The immuno-blot for protein carbonyls groups presented in **Figure 6A** indicated that high molecular weight proteins were oxidized for all samples at day 5 and little differences were observed between samples.

Restructured hake: The mince from hake used in the experiment had a moisture content of 79.5%, and an oil content of 1.7%. The peroxide value was zero and the level of antioxidants α -tocopherol was 1.89 mg/kg wet weight. The cod liver oil used in the experiment had a α -tocopherol content of 200 mg/kg oil and its peroxide value was 0.27 meq/kg oil. The fatty acid composition of the hake and of the oil are presented in **Table 2**.

In samples elaborated with hake, peroxides values ranged from zero to 0.27 meq/kg oil (**Figure 3B**). This was much lower than in the trout and indicated no significant oxidation in hake. However, HC did not show any development of peroxides, whilst for HB peroxides were increasing steadily during chilled storage. The most oxidized sample was HB+oil which developed at higher PV (0.25 meq/kg oil) at day 2 but stayed constant throughout the rest of the storage period. TBARS results (**Figure 3B**) are in agreement with the PV data and indicated slightly more oxidation in HB+oil compared with HB and no oxidation in HC. However the values obtained for TBARS were relatively high and seemed to indicate a high level of oxidation in both samples prepared with MTGase.

The color was measured on all samples during the storage period on days 1 and 6 (**Table 3B**) and the lightness and yellowness (b^*) were significantly higher in the HB+oil compared to HB and HC. No significant changes were observed in the lightness with any of the samples after 6 days of storage. The b^* value increased during storage for all samples, HB and HC reached the same b^* values whilst HB+oil was significantly higher.

Alpha-tocopherol content was around 1.5 mg/kg for HC and HB at day 1, but was significantly higher (4.49 mg/kg) in HB+oil due to the contribution of the oil (**Table 4B**).

However, α -tocopherol level in HB seemed to decrease after 6 days storage. A similar consumption of α -tocopherol was also observed in both HB+oil and TB samples which contained MGTase (**Table 4A**).

The mechanical properties of the hake are given in **Figure 2 and Table 5B**. Hardness of the HB sample at day 1 was significantly higher than HB+oil, with values of 4N and 2N respectively. HB reached their maxima at day 2, however HB+oil reached the same value at day 3. Samples HB+oil followed the same pattern for the development of hardness as did the trout samples TB. HB was gummier than the HC samples and adding oil to HB resulted in a decrease in the gumminess (**Table 5B**). During storage the gumminess of the samples with MTGase increased, and HB and HB+oil reached the same values. In general sample prepared with hake were much gummier than trout samples.

The WBC of HC and HB was identical at day 1 and increased to the same extend during storage (**Table 5B**). In contrast the WBC of HB+oil was higher than HC and HB already at day 1 and was not affected during storage. SDS-PAGE of the samples at day 1 and day 6 is presented in **Figure 4B**. As observed for the trout, a decrease in the myosin band was observed for HB and HB+oil already at day 1 with, which was even more pronounced at day 6, with almost complete disappearance of the myosin band. The immuno-blot against myosin did confirm the disappearance of myosin heavy chain and the formation of cross-link at day 1. However, the blot did not reveal a significant amount of cross-linked myosin at day 6 for HB samples. In contrast, for HC samples the blot revealed some cross-link at day 1 and day 6. Protein carbonyls groups are presented in **Table 6B** and significant differences were observed between samples at day 1, HB had a significant higher carbonyl levels compared to the other two samples (HB+oil and HC). An increase in carbonyls groups was observed after 6 days of storage for HB whilst no changes in protein carbonyls were observed for HC and HB+oil. The immuno-blot for protein carbonyls groups presented in **Figure 6B** indicated that high

molecular weight proteins were oxidized for all samples at day 5 but no clear differences were observed between samples.

DISCUSSION

Oxidation of restructured fish during chilled storage: Fatty fish such as trout are a good source of long chain omega-3 fatty acids, however omega-3 are very susceptible to oxidation and this can result in the development of rancidity and off flavors (23). MTGase is a common binding agent in the food industries but is only sparsely used in fatty fish mince in their raw state. Addition of MTGase to trout mince indicated that MTGase may trigger oxidative reaction during chilled storage. However, similar experiments with other batches of trout showed sometimes differences in the development of peroxides and other times not differences between TN and TB samples (not shown) therefore these results have to be taken carefully and might be a function of the raw material properties. In addition, the development and the level of TBARS for TN sample which contained only the ingredients i.e. salt and sodium caseinate was similar to samples containing both the ingredients and MTGase (TB) and as a matter of fact, it is possible that the ingredients used to condition the fish muscle could be promoting oxidative damage over lipids. Indeed, salt at concentration between 0.5 to 2.5% has been reported to be prooxidant in muscle foods (24, 25). Interestingly, hake sample containing MTGase (HB) had much lower peroxides values compared to trout (TB) but this cannot be explained by their difference in fat content because the addition of 5% cod liver oil (triglycerides) to hake (HB+oil) did result in higher PV compared with HB and HC, but this value was still very low compared to trout. All trout and hake samples containing MTGase had a high and similar TBARS indicating some oxidation in the presence of MTGase and ingredients. Indeed, TBARS values for samples containing MTGase were higher than control samples (TC and HC). The high TBARS was observed in hake samples containing MTGase

and can be ascribed to interferences from the formaldehyde from the hake interfering with the TBARS assay as suggested by Careche & Tejada (26). Kellerby et al. (27) also observed a significant increase in oxidation (peroxides and TBARS) in emulsions containing MTGase and argued that cross-linking of the protein at the interface induced changes in the protein structure that altered the iron binding site on the protein, bringing iron and peroxides closer and triggering oxidation. However, during the reaction of protein with MTGase ammonia is also released and can induce changes in the local pH. In addition, ammonia is known to be cytotoxic, enhancing lipid oxidation and free radical generation and inhibiting antioxidative enzymes (28). It can be postulated that depending on the antioxidative status of the fish used in the experiment MTGase may under certain conditions trigger oxidation. Result obtained for protein oxidation also revealed that sample containing MTGase (both trout and hake) had a significantly higher level of protein carbonyls groups already at day 1 (**Table 6**) compared with samples prepared without MTGase. Similarly Steffensen et al. (29) reported an increase in methionine carbonyls groups after treatment of BSA with MTGase. Unfortunately, protein carbonyl blots were not able to reveal much more information about the extent of protein oxidation in the different samples after 5 days of storage. As observed in other studies high molecular weight proteins were oxidized in all samples and indicated that some large proteins were more susceptible to oxidation than smaller ones but quantification was not possible (13, 30). These results may be explained by cross-linking which induced conformational changes in the protein and resulted in exposure of amino acid susceptible to oxidation, however, this may also be due to destabilization of the protein due to the salt with result in amino acid exposure to the environment and subsequent oxidation. Addition of oil to hake result in an increase in lipid oxidation in the presence of MTGase but a decrease in protein carbonyls groups. Studies have showed that addition of triglycerides (TG) to washed fish mince did not affect the level of lipid oxidation (31). In our study addition of oil (TG) did result in a higher

level of peroxides compared to sample without added oil, however, lipid oxidation was considered to be very low in the hake samples in general. The fat content of trout used in our experiment was approximately 3.5% and rose to around 6% for hake+ oil sample, but still hake was very stable to oxidative damage and that could be due to the different composition of the lipid fraction and susceptibility to be oxidized in samples made with hake or trout (32). In addition, other factors such as the level of pro and antioxidant present in the fish muscle tissues have been showed to be crucial in the development of oxidation in fish products (30). It has previously been reported that hake was very stable toward oxidative damage (33). Addition of oil also resulted in a decrease in protein carbonyls group and this seemed to indicate a protection of the protein oxidation by the oil. This might be due to the high content of α -tocopherol in the obtained restructured products containing oil. However, astaxanthin presented *in situ* in trout did not seem to be able to prevent oxidation in the restructured product and no significant change in antioxidant content was observed over time. Moreover, astaxanthin is believed to protect against the very early stages of lipids oxidation, while α -tocopherol is more important as an antioxidant at more advanced stages of lipids oxidation (34). Investigation of α -tocopherol and astaxanthin antioxidative activity toward protein in emulsions revealed that they were no able to protect protein from oxidation in model emulsions (35). The abilities of tocopherol and astaxanthin to prevent oxidative damage in restructured fish need to be investigated in more details. However, interaction between the protein and the lipid fraction in the oil enriched restructured product (HB+oil) seemed favorable for α -tocopherol to exhibit its antioxidative activity. Therefore, the macro and micro-structure as well as the location of the antioxidant and prooxidant in the different food fraction deserve more attention. Hake samples containing oil also had a much higher L* values compared to sample without oil. This was described by other by the formation of an emulsion with light scattering effect of the oil droplets resulting in an increase in lightness

(L*) (36). Hence, interaction between the TG and the protein might also result in some protection of the protein if TG are able to enter in the hydrophobic cavity of proteins. Such interaction and emulsification may induce interaction between protein and lipid and hydrophobic binding of fatty acids to proteins. Others have also reported that fatty acids and TG can enter hydrophobic cavities in protein (37). More studies on the interaction between protein and lipid antioxidant and prooxidant at the molecular level in fish muscle during oxidative damage might help at designing new antioxidants to protect fatty fish products from oxidative damage during chilled storage. The impact of oil content on MTGase activity is not very well documented but it is showed here that the presence of oils over MTGase can affect the oxidative stability of the products during chilled storage. Nevertheless, white fish such as hake present good potential for generating new type of restructured products enriched with fish oil, in order to obtain restructured products rather stable with respect to oxidation of both theirs protein and the lipid fraction. However, more research is necessary to further confirm if MTGase can, either directly, or more likely, indirectly and under certain conditions induce oxidative damage to lipids and proteins in restructured foods.

Physico-chemical properties: As it has been stated before, the impact of oil on MTGase activity is not documented but it has been reported that MTGase activity was impaired by oil and that its activity was not so effective to link proteins in the presence of more that 5-6% of fat in fish muscle (11). Both TB and HB+oil gels were softer than HB at day 1 but reached the same value at day 6 indicating that MTGase was slower at inducing cross-linking in the presence of oil. However, MTGase was showed in our study to be able to induce cross linking in fatty fish containing 3% oil and in hake enriched with 5% oil. The gels formed were soft after 1 days of storage in both TB and HB+oil, until the maximum was reached after 3 days for hake and 6 days for trout. After 6 days, all samples containing MTGase reached the same

hardness irrespectively of their initial hardness at day 1 and of their oil content. A slight increase in hardness was observed for TN samples containing only the ingredients (salt and caseinate) and this might be due to the activity or endogenous TGase. Gumminess of samples containing MTGase was significantly higher than for the other samples after chilled storage (Table 6). It was also observed that changes in gumminess correlated with hardness, meaning that MTGase induced cross-link which affected both gumminess and hardness at the same time. This has been previously reported by others for white fish (*I*) and this trend is also confirmed for fatty fish species. Delay in cross-linking in the presence of fat might be due to the fact that lysine, which is hydrophobic is buried in the hydrophobic core of protein and is associated the lipid fraction and is therefore less accessible to MTGase. In addition interaction between protein hydrophobic core and added cod liver oil (triglycerides -TG-) might also have impaired the activity of MTGase. This decrease in MGTase activity might be due to concealing by the oil of the amino acids Lys and Arg, which are necessary for the acyl transfer reaction and the crosslinking. Additionally, oxidative modification of proteins either by interaction with lipid or protein oxidation products or directly by free radical attack might result in loss in the enzyme activity. Therefore, MTGase in the presence of oil might also as a consequence of oxidation, losses some of its activity which resulted in a delayed in protein cross-linking. The cohesiveness was decreasing with storage for trout but was stable over time for all hake samples, irrespectively of the treatment. Addition of the ingredients, salt and sodium caseinate, to the trout sample (TN) resulted in a decrease in cohesiveness and of water holding capacity, both of which were improved after addition of MTGase. Addition MTGase induce some increase in WHC of the samples as also has been reported (*I*, 38). The water lost due to addition of the salt was regained after addition of the MTGase. Storage of the sample for 6 days increase the water holding capacity and this might be explained by the increase in cross-linking what could induce the entrap of water molecules in protein-net and as

consequence improving WHC. Indeed, Han et al. (38) have recently reported that gel formed with MTGase had lower water mobility and higher water holding capacity and also a more porous microstructure. At the same time it is possible that WHC is improved due to the activity of proteolytic enzymes during storage, which might be inducing proteolysis increasing the myofilaments spacing (39). In addition, cross-linking of myosin by MTGase has been recently reported to take place in the rod domain (40). It is possible that proteolysis to some extent exposes the myosin rod domain by inducing depolymerisation of the protein and favors the interaction between myosin rods, which in turn induces further cross-linking and results in an increase in WHC. Interestingly, WHC was higher in hake sample containing oil and this might be due to emulsification and further change in the structure of the matrix, which could result in an increase in water holding. Muscle water is divided in different pools and some of the water is trapped and compartmentalized in cellular structures (41) and changes in structural organization of the cell such as emulsification might affect water distribution and subsequently holding capacity.

Proteins from samples containing MTGase i.e. TB and HB were also more oxidized based on the protein carbonyl group content and this might also affect gel strength and water holding capacity. Previous investigations have shown an increase in gel strength of protein from surimi which proteins were subject to oxidation (42). On the other hand, protein oxidation has been reported to affect negatively water holding capacity and protein functionality (43) and to reduce the gelling properties in the presence of MTGase (14). It is therefore possible that under some conditions protein oxidation is favorable to gelation and under other conditions unfavorable to gelation. Protein oxidation was reported to lead either to protein cleavage or protein breakdown and how this can affect MTGase activity is unknown (44). In the present study protein oxidation resulted in high molecular weight aggregates and this might affect the texture and the water holding capacity of the resulting gels. In fish cross-linking of myosin

induced by protein oxidation has been reported to affect texture (45). Blot of myosin also revealed a different pattern in cross-linking for the different fish myosin. Indeed, hake myosin was able to generate significant cross-link even without the presence of MTGase at day 1 as seen as high molecular weight on the myosin blot, whilst trout myosin did not seem to be so labile. Differences in actomyosin complexes from different fish species and their susceptibility to MTGase have been suggested to be related to difference conformation in their structure (10, 46). Difference between trout and hake myosin is illustrated by the immuno-blots, which revealed more myosin bands for the hake than for the trout sample at day 1. Myosin from these two fish species might have very different myosin isoforms, and this might be determinant factors in their gel forming ability and their protein functionality. However, the presence of low molecular weight myosin fragments revealed by immunostaining for the hake samples, compared to the trout, seemed to indicate that some proteolysis might be necessary for generating gels with good properties in hake. However, adverse effect of proteases on gel strength has been reported previously after heat treatment and activation of proteolytic enzyme leading to the formation of weak gels or “modori” (47). However, it can be speculated that trout myosin, order to have gel to the same extent as in hake, some but limited proteolysis of myosin might be necessary to expose the myosin rod. This fact might expose more Lys and Arg residues to the environment and generate after 6 days storage gels with good hardness and water holding capacity. The interaction between protein oxidation, proteolysis, and MTGase activity might be important parameters to consider for obtaining cold set gels with different fish matrices with good physico chemical properties and eating quality.

CONCLUSIONS:

Restructured products with good physicochemical properties can be prepared with fatty fish such as trout using cold gelation and MTGase. However, storage of these products might under some conditions i.e. ingredients used and/or oxidative status of the fish, result in oxidation of lipids and in hence the development of off-flavors. In addition, research has showed that addition of up to 5% cod liver oil to hake in the presence of MTGase also generated gels with good physicochemical properties and with good oxidative stability. These results suggested that might be a good alternative for generating new type of omega-3 enriched fish restructured raw products, which are quite stable during chilled storage. However, the impact of the matrix properties on MTGase activity such as for example oil content, oil type, extent of proteolysis, of protein oxidation as well as protein composition should be further investigated in order to control cross-linking and fully explore new possibilities in developing restructured products with new properties and raw aspect.

ACKNOWLEDGEMENTS

Inge Holmberg is thanked for excellent laboratory assistance. This research was supported by the Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (CSIC) for the Predoctoral Scholarship under program I3P-2004.

REFERENCES

- 1) Moreno, H. M.; Carballo, J.; Borderías, J. Influence of Alginate and microbial transglutaminase as binding ingredients on restructured fish muscle processed at low temperature. *J. Sci. Food Agric.* **2008**, *88*, 1529-1536.
- 2) Borderías-Juarez, A. J.; Carballo-Santaolalla, J.; Moreno-Conde, H. M.; Shaping of myotomes and myosepta in restructured fish products. *Spanish Patent Application*, **2007**, ES 2 281 282 A1.
- 3) Gómez-Guillén, M.; Montero, P.; Solas, M.T.; Pérez-Mateos, M. Effect of chitosan and microbial transglutaminase on the gel forming ability of horse mackerel (*Trachurus spp.*) muscle under high pressure *Food Res. International.* **2005**, *38*, 103-110.
- 4) Sakamoto, H.; Kumazawa, Y.; Motoki, M. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. *J. Food Sci.* **1994**, *59*, 866-871.
- 5) Lee, H.G.; Lanier, T.C.; Hammann, D.D.; Knopp, J. A. Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein sols. *J. Food Sci.* **1997**, *62*, 20-24.
- 6) Ramírez, J.A.; Del Angel, A.; Velázquez, G.; Vázquez, M. Low-salt restructured products from striped mullet (*Mugil cephalus*) using microbial transglutaminase or whey protein concentrate as additives. *Food Chem.* **2007**, *102*, 243-249.

- 7) Uresti, R.M.; Téllez-Louis, S.J.; Ramírez J.A.; Vásques, M. Use of dairy proteins and microbial transglutaminase to obtain low-salt fish products from filleting waste from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chem.* **2004**, *86*, 257-263.
- 8) Kuraishi, C.; Sakamoto, J.; Yamanazaki, K.; Susa, Y.; Kuhara, C.; Soeda, C. Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *J. Food Sci.* **1997**, *62(3)*, 488-490+515.
- 9) O'Kennedy, B. T.; Kelly, P. M. Evaluation of milk protein interactions during acid gelation using a simulated yoghurt model. *Milchwissenschaft.* **2000**, *55*, 187-190.
- 10) Hideyo, A.; Nobuo, S. Comparison of reactivity of transglutaminase to various fish actomyosins. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **1993**, *9*, 711-716.
- 11) Borderias, A. J. Personal communication, **2009**.
- 12) Aubourg S.P., Piñeiro, C., Gallardo, J.M.; Barros-Velázquez, J. Biochemical changes and quality loss during chilled storage of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Food Chem.* **2005**, *90*, 445-452.
- 13) Baron, C.P.; Kjærsgård, I.V.H.; Jessen F.; Jacobsen, C. Protein and lipid oxidation during frozen storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8118-8125.

- 14) Visessanguan, W.; Benjakul, S.; Tanaka, M. Effect of microbial transglutaminase on rheological properties of oxidised and non-oxidised natural actomyosin from 2 species of bigeye snapper. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83*, 105-112.
- 15) AOAC. Official methods of analysis. 17th Edition. Association of Official Analytical Chemistry, Maryland, **2000**.
- 16) Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911-917.
- 17) Official methods and recommended practices of the AOCS. 5th Edition. Champaign IL: AOCS, **1998**.
- 18) Shantha, N.C.; Decker, E.A. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1994**, *77*, 421-424.
- 19) Vyncke, W. Evaluation of the direct thiobarbituric acid extraction methods for determining oxidative rancidity in mackerel (*Scomber scombrus* L). *Fette, Seifen, Anstrichmittel.* **1975**, *77*, 239-240.
- 20) Levine, R. L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.G.; Ahn, B.W.; Shaltiel, S.; Stadtman, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 464-478.

- 21) Bourne, M. C. *Food Texture and Viscosity. Concept and Measurement*. Second Edition. . Academic Press: London. **2002**, pp. 423
- 22) Eide, O.; Børresen, T .; Strøm, T. Minced fish production from capelin (*Mallotus villous*). A method for gutting, skinning and removal of fat from small fatty species. *J.Food Sci.* **1982**, *47*, 347-349.
- 23) Frankel, E. N. *Lipid oxidation*. Bridgewater, England: P.J. Barnes and Associates. **2005**.
- 24) Rhee, K.S. Storage stability of meat products as affected by organic and inorganic additives and functional ingredients. In Y.L. Xiong, C.T. Ho & F. Shahidi (Eds) *Quality attributes of muscle food*. **1999**. pp 95-113. New York: Plenum Publishing.
- 25) Sallam, K.I., Samejima, K. Microbial and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. *Lebensm-wiss. u. Technol.* **200.**, *37*, 865-871.
- 26) Careche, M.; Tejada, M. Interference by formaldehyde in the 2-thiobarbituric acid test for rancidity. *J. Sci. Food Agric.* **1988**, *43*, 49-57.
- 27) Kellerby, S. S.; Gu, Y. S.; McClements, D. J.; Decker, E.A. Lipid oxidation in a menhaden oil-in-water emulsion stabilized by sodium caseinate cross-linked with transglutaminase. *J Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 10222-10227.

- 28) Kosenko, E.; Kaminsky, Y.; Kaminsky, A.; Valencia, M.; Lee, L.; Hermenegildo, C.; Felipo, V. Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. *Free Radic Res* **1997**, *27*, 637-644.
- 29) Steffensen, C. L.; Andersen, M. L.; Degn, P. E.; Nielsen, J. H. Cross-linking proteins by laccase-catalyzed oxidation: importance relative to other modifications. *J Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 12002-12006.
- 30) Eymard, S.; Baron, C. P.; Jacobsen, C. Oxidation of lipid and protein in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) mince and washed minces during processing and storage. *Food Chem.* **2008**, *114*, 57-65.
- 31) Undeland, I.; Hultin H.O.; Richards M. P. Added Triacylglycerols do not hasten hemoglobin-mediated lipid oxidation in washed mince cod muscle. *J Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6847-6853.
- 32) Aubourg, S.P.; Medina, I.; Gallardo, J.M. Quality assessment of blue whiting (*Micromesistius poutassous*) during chilled storage by monitoring lipid damages. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3662-3666.
- 33) Aubourg, S.P.; Rey-Mansilla, M.; Sotelo, C. G. Differential lipid damage in various muscle zones of frozen hake (*Merluccius merluccius*). *Z. Lebensm Unters Forsch A.* **1999**, *208*, 189-193.

- 34) Jensen, C.; Birk, E.; Jokumsen, A.; Skibsted, Leif H.; Bertelsen, G. Effect of dietary levels of fat, α -tocopherol and astaxanthin on colour and lipid oxidation during storage of frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and during chill storage of smoked trout. *Z. Lebensm Unters Forsch A*. **1998**, *207*, 189-196.
- 35) Baron, C.P.; Berner, L.; Skibsted, L.; Refsgaard H.H.F. Evaluation of activity of selected antioxidants on proteins in solution and in emulsions. *Free Radic. Res*. **2005**, *39*, 777-785.
- 36) Lee, C.M.; Wu, C-C; Okada, M. Ingredient and formulation technology for surimi-based products. pp 273-302. *In Surimi Technology*. Eds: Lanier T.C & Lee C.M. Dekker: New York. **1992**.
- 37) Smith, L.; Fantozzi, P.; Creveling, R.K. Study of triglyceride-protein interaction using a microemulsion-filtration method. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1983**, *60*, 960-967.
- 38) Han, M.; Zang, Y.; Fei, Y.; Xu, X.; Zhou, G. Effect of microbial transglutaminase on NMR relaxometry and microstructure of pork myofibrillar protein gel. *European Food Res. Technol.* **2009**, *228*, 665-670.
- 39) Huff-Lonergan, E.; Lonergan, S. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, **2005**, *71*, 194-204.
- 40) Hemung, B-O.; Li-Chan, E. C. Y.; Yongsawatdigul, J. Identification of glutaminy sites on β -lactoglobulin for threadfin bream liver and microbial transglutaminase activity by MALDI-TOF mass spectrometry. *Food Chem.* **2009**, *115*, 149-154.

- 41) Bertram, H. C.; Purslow, P. P.; Andersen, H. J. Relationship between meat structure, water mobility, and distribution: a low-field nuclear magnetic resonance study. *J Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 824-829.
- 42) Srinivasan, S.; Hultin, H. O. Chemical, physical, and functional properties of cod proteins modified by a nonenzymic free-radical-generating system. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 310-320.
- 43) Bertram, H. C.; Kristensen, M.; Ostdal, H.; Baron, C. P.; Young, J. F.; Andersen, H. Does oxidation affect the water functionality of myofibrillar proteins? *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 2342-2348.
- 44) Ooizumi, T.; Xiong, Y.L. Biochemical susceptibility of myosin in chicken myofibrils subjected to hydroxyl radical oxidizing systems. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4303-4307.
- 45) Christensen, L., Andersen, E.; Christensen, M.; Andersen, M.L.; Baron, C. Texture changes and myosin oxidation during ripening of salted herring. *Proceeding ICoMST*, **2008**.
- 46) Hemung, B-O.; Li-Chan, E. C. Y.; Yongsawatdigul, J. Reactivity of fish and microbial transglutaminases on glutaminy sites of peptides derived from threadfin bream myosin *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7510-7516.
- 47) Niwa, E. Chemistry of surimi gelation. pp 389-427 *In* Surimi Technology. Eds: Lanier T.C & Lee C.M. Dekker: New York. **1992**.

FIGURES CAPTIONS

Figure 1: **A)** Development of peroxides (PV) and **B)** development of TBA during storage at 4°C of restructured trout samples for 6 days. With (- - -□- - -) for TN; (—■—) for TB and (—◆—) for TC, (for sample code, see **Table 1**).

Figure 2: Development of hardness in trout and hake restructure samples during storage at 4°C for 6 days. With for trout (- - -□- - -) for TN; (—■—) for TB; (—◆—) for TC; and for hake HB; (—●—); for HB+oil (—○—) and HC (—▲—) (for sample code, see **Table 1**).

Figure 3: **A)** Development of peroxides (PV) and **B)** development of TBA during storage at 4°C of restructured hake samples for 6 days. With hake, HB; (—●—); for HB+oil (—○—) and HC (—▲—) (for sample code, see **Table 1**).

Figure 4: SDS-PAGE of **A)** restructured trout and **B)** restructured hake samples after 1 and 6 days of storage at 4°C, (for sample code, see **Table 1**).

Figure 5: Immuno-blot against myosin in **A)** restructured trout and **B)** restructured hake samples after 1 and 6 days of storage at 4°C, (for sample code, see **Table 1**).

Figure 6: Immuno-blot against protein carbonyl groups in **A)** restructured trout and **B)** restructured hake samples after 5 days of storage at 4°C, (for sample code, see **Table 1**).

Table 1: Composition of the different restructured samples giving the added ingredients in % and the different samples codes. With A) for sample prepared with trout and B) samples prepared with hake.

Samples	NaCl (%)	Sodium caseinate (%)	MTGase (%)	H₂O (%)	Cod liver oil (%)
A) Trout					
TC	0	0	0	5	0
TN	1.5	1,5	0	5	0
TB	1.5	1,5	1	5	0
B) Hake					
HC	0	0	0	5	0
HB	1.5	1.5	1	5	0
HB+oil	1.5	1.5	1	5	5

Table 2. Fatty acids composition of the trout, hake and cod liver oil used in the experiment given in % of total fatty acids.

Fatty Acids	Trout	Hake	Cod Liver Oil
14:00	3.27±0.22	1.72±0.04	3.2±0.01
16:00	14.05±0.23	11.58±0.11	9.37±0.01
18:00	2.69±0.03	2.08±0.02	2.04±0.00
Σ Saturated	20.01	15.38	14.84
16:1(n-7)	4.87±0.05	3.44±0.02	6.06±0.01
18:1(n-7)	3.40±0.05	2.57±0.01	21.03±0.00
18:1(n-9)	16.12±0.10	11.34±0.01	4.14±0.02
20:1(n-9)	3.06±0.03	8.52±0.03	9.91±0.05
22:1(n-11)	2.39±0.03	11.17±0.06	6.61±0.02
Σ MUFA	29.84	37.04	47.77
18:2(n-6)	4.55±0.04	1.15±0.02	3.85±0.03
18:3(n-3)	1.28±0.01	0.69±0.00	0
18:4(n-3)	1.13±0.01	0.93±0.00	2.13±0.00
20:4(n-6)	0.84±0.06	0.85±0.01	0.68±0.00
20:5(n-3)	9.67±0.08	5.30±0.06	7.01±0.00
21:5(n-3)	0.48±0.00	0.14±0.00	0.32±0.00
22:5(n-3)	3.07±0.06	1.26±0.00	0.96±0.01
22:6(n-3)	18.64±0.38	25.09±0.31	10.65±0.02
Σ PUFA	39.66	35.41	25.61
Others	10.49	12.17	11.79

Table 3. Color values (a*, b* L) for the samples during storage. With A) for samples prepared with trout and B) samples prepared with hake. For samples codes TC, TN, TB HB, HC and HB+ oil see Table 1.

Samples*	Day	L	a*	b*
A) TROUT				
TC	1	58.36±0.89a ₁	8.02±0.15a ₁	15.68±0.74a ₁
TN		59.36±1.46ab ₁	8.81±0.24b ₁	16.07±0.51a ₁
TB		60.35±0.94b ₁	8.01±0.14a ₁	15.74±0.64a ₁
TC	6	58.50±0.33a ₁	9.85±0.23a ₂	16.35±0.36a ₂
TN		63.34±0.59b ₂	5.06±0.17b ₂	14.89±0.53a ₂
TB		63.39±0.83b ₂	5.20±0.42b ₂	14.59±0.27b ₂
B) HAKE				
HC	1	68.12±0.65a ₁	-0.05±0.11a ₁	2.99±0.23a ₁
HB		69.01±1.19a ₁	-0.46±0.46a ₁	2.42±0.09a ₁
HB+oil		76.81±0.07b ₁	0.06±0.06a ₁	5.06±0.12ab ₁
HC	6	67.45±0.45a ₁	-0.21±0.12a ₂	4.05±0.35a ₂
HB		69.26±1.06b ₁	-2.38±0.07b ₂	4.08±0.31a ₂
HB+oil		79.59±0.29c ₂	-1.86±0.03b ₂	8.29±0.09a ₂

* See Table 1; Different letters indicate significant differences between samples for a given day (p<0.05), and different numbers within a column indicate significant differences between days (p<0.05).

Table 4. α -tocopherol and astaxanthin content in the different samples during storage given in mg/kg wet weight. With A) for samples prepared with trout and B) samples prepared with hake. For samples codes TC, TN, TB HB, HC and HB+ oil see Table 1.

Samples*	Day	α -tocopherol (mg/kg)	Astaxanthin (mg/kg)
A) TROUT			
TC	1	4.98±1.06a ₁	2.53±0.19a ₁
TN		4.69±0.34a ₁	2.67±0.03a ₁
TB		4.34±0.07a ₁	2.49±0.10a ₁
TC	6	5.21±2.06a ₁	3.13±0.12a ₂
TN		4.31±0.14a ₁	2.43±0.01b ₁
TB		4.03±0.09a ₁	2.41±0.08b ₁
B) HAKE			
HC	1	1.35±0.71a ₁	-
HB		1.50±0.22a ₁	-
HB+oil		4.49±0.42b ₁	-
HC	6	1.94±0.28a ₁	-
HB		0.59±0.16b ₂	-
HB+oil		3.97±0.15c ₂	-

* See Table 1; Different letters indicate significant differences between samples for a given day ($p < 0.05$), and different numbers within a column indicate significant differences between days ($p < 0.05$).

Table 5. Changes in cohesiveness, gumminess and water binding capacity (WBC) of the different samples during storage. With A) for samples prepared with trout and B) samples prepared with hake. For samples codes TC, TN, TB HB, HC and HB+ oil see Table 1.

Samples*	Day	Cohesiveness	Gumminess (N)	WBC (%)
A) TROUT				
TC	1	0.54±0.03a ₁	0.23±0.01a ₁	95.67±0.06a ₁
TN		0.37±0.03b ₁	0.21±0.02a ₁	84.01±2.27b ₁
TB		0.46±0.03ac ₁	0.82±0.05b ₁	94.88±1.65a ₁
TC	6	0.31±0.02a ₂	0.16±0.02a ₂	96.56±0.11a ₁
TN		0.25±0.01b ₂	0.25±0.01a ₁	87.91±1.58b ₂
TB		0.34±0.02ac ₂	1.12±0.13b ₂	98.68±0.27a ₂
B) HAKE				
HC	1	0.48±0.02a ₁	0.47±0.03a ₁	87.89±1.30a ₁
HB		0.59±0.02b ₁	2.11±0.21b ₁	88.95±0.17a ₁
HB+oil		0.55±0.05b ₁	1.28±0.32c ₁	96.46±0.18b ₁
HC	6	0.48±0.03a ₁	0.47±0.09a ₁	95.46±0.32a ₂
HB		0.61±0.01b ₁	3.17±0.28b ₂	94.31±0.21a ₂
HB+oil		0.59±0.01b ₁	3.31±0.22b ₂	96.99±0.43b ₁

* See Table 1; Different letters indicate significant differences between samples for each day (p<0.05), and different numbers within a column indicate significant differences between days (p<0.05).

Table 6. Protein carbonyls group content in the different samples during storage expressed in nmol carbonyls/mg protein. With A) for samples prepared with trout and B) samples prepared with hake. For samples codes TC, TN, TB HB, HC and HB+ oil see Table 1.

Samples*	Day	Carbonyl (nmol/mg)
A) TROUT		
TC	1	1.74±0.60a ₁
TN		1.47±1.14b ₁
TB		1.93±1.04c ₁
TC	6	1.63±0.20a ₁
TN		1.82±0.11a ₂
TB		2.59±0.47b ₂
B) HAKE		
HC	1	1.45±0.21a ₁
HB		2.28±0.35b ₁
HB+oil		1.62±0.50a ₁
HC	6	1.01±0.31a ₁
HB		3.15±0.22b ₂
HB+oil		1.53±0.29a ₁

* See Table 1; Different letters indicate significant differences between samples for a given day ($p < 0.05$), and different numbers within a column indicate significant differences between days ($p < 0.05$).

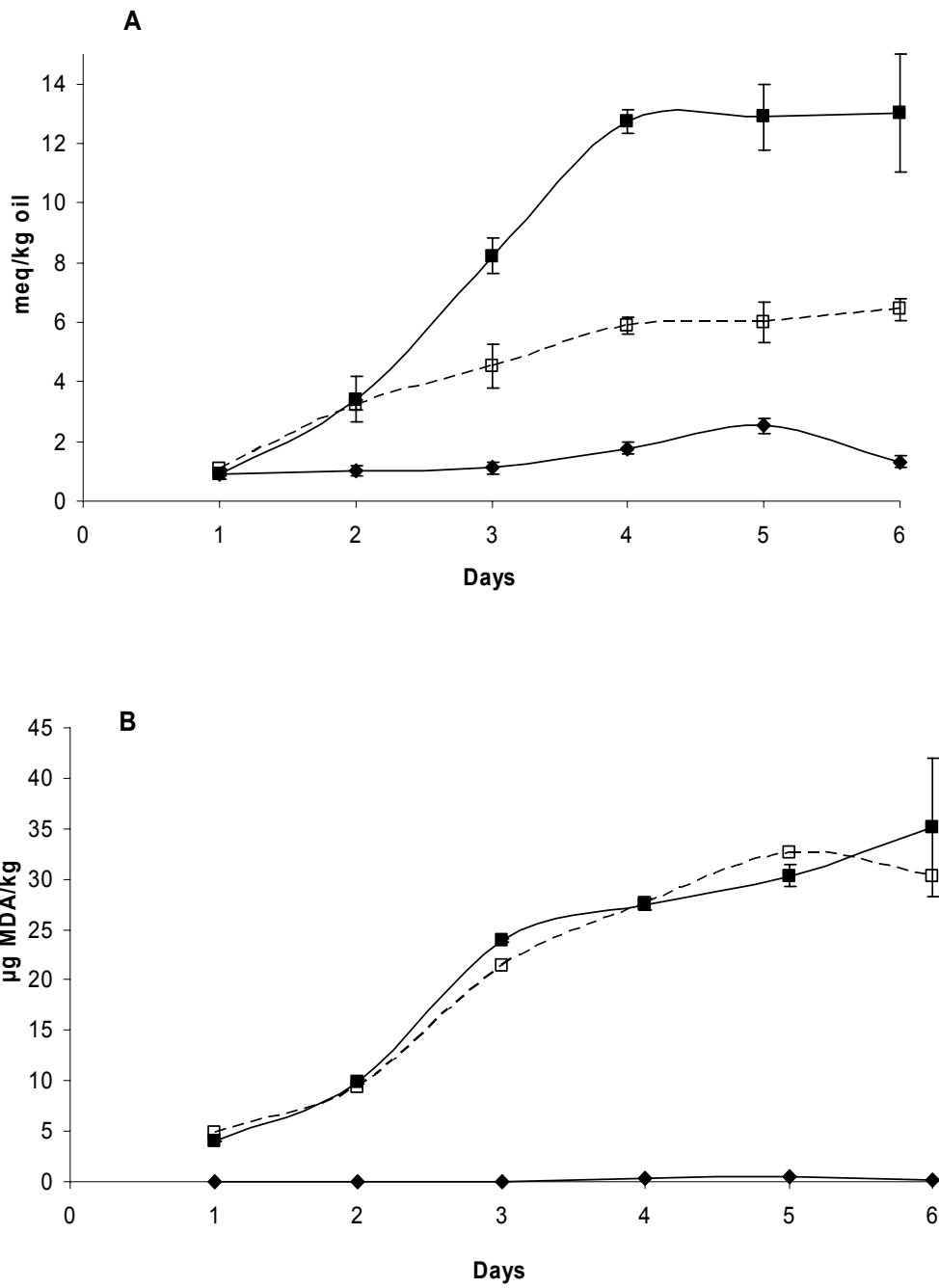


Figure 1

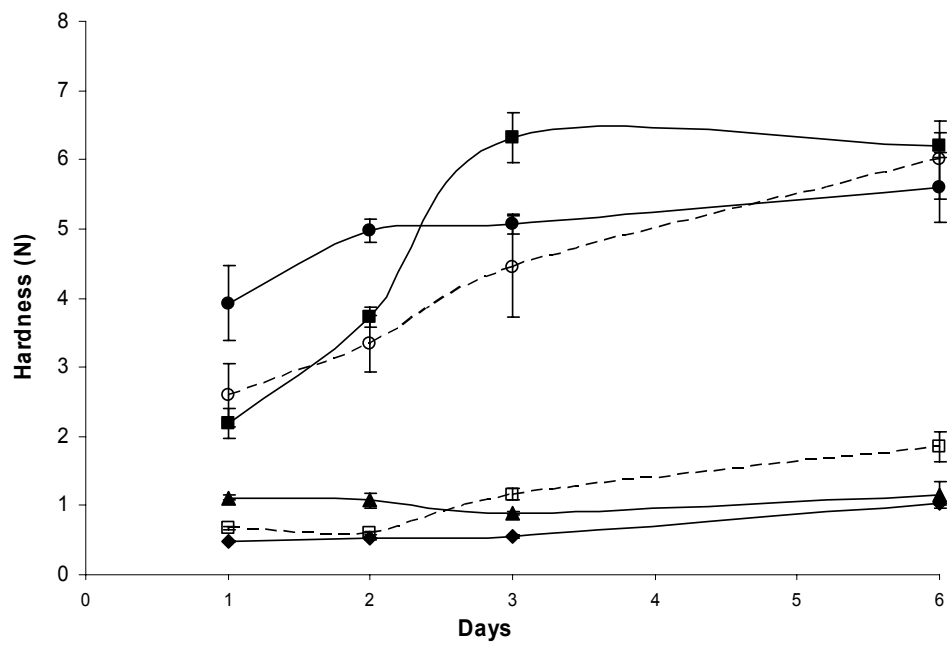


Figure 2

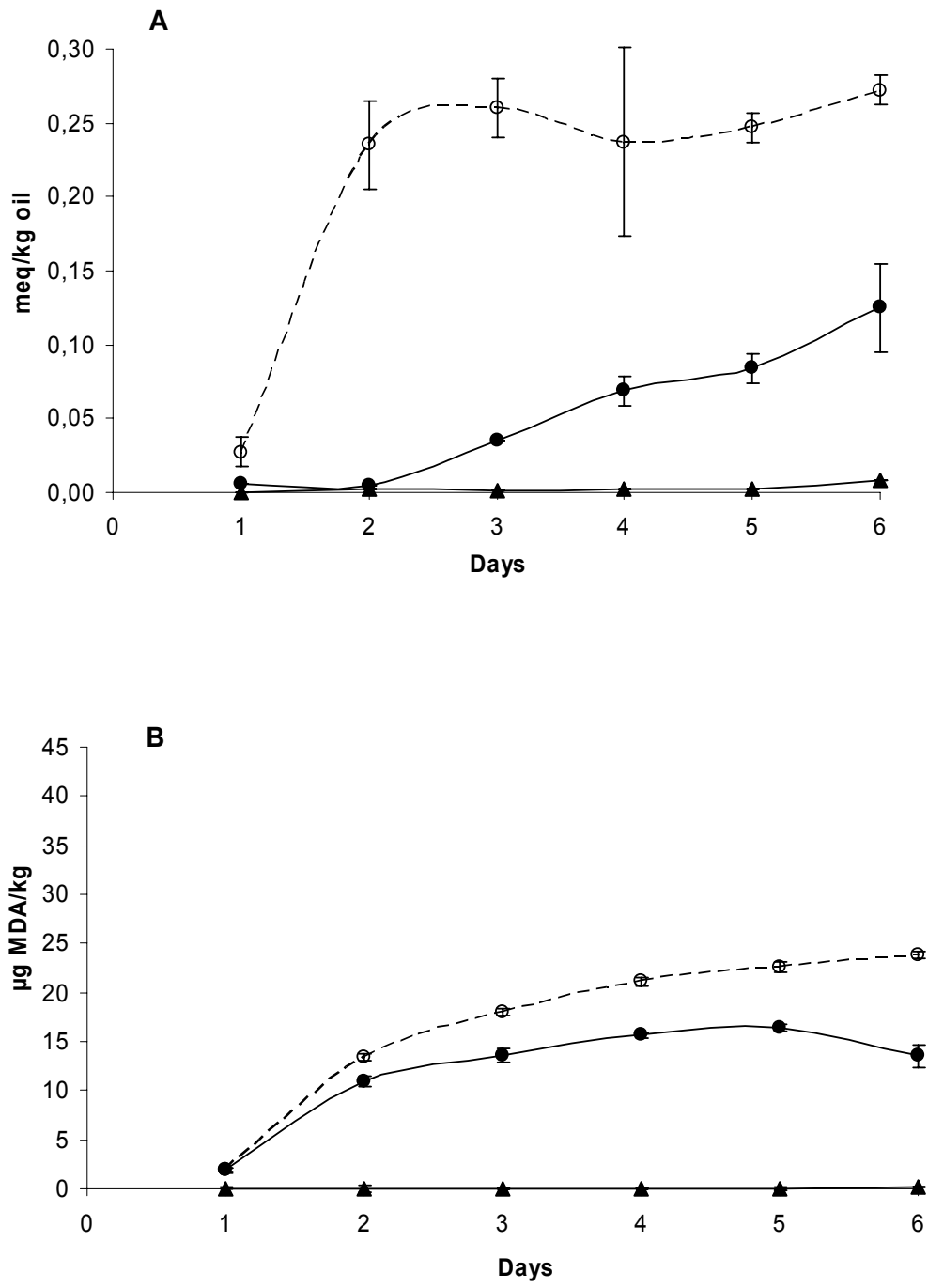


Figure 3

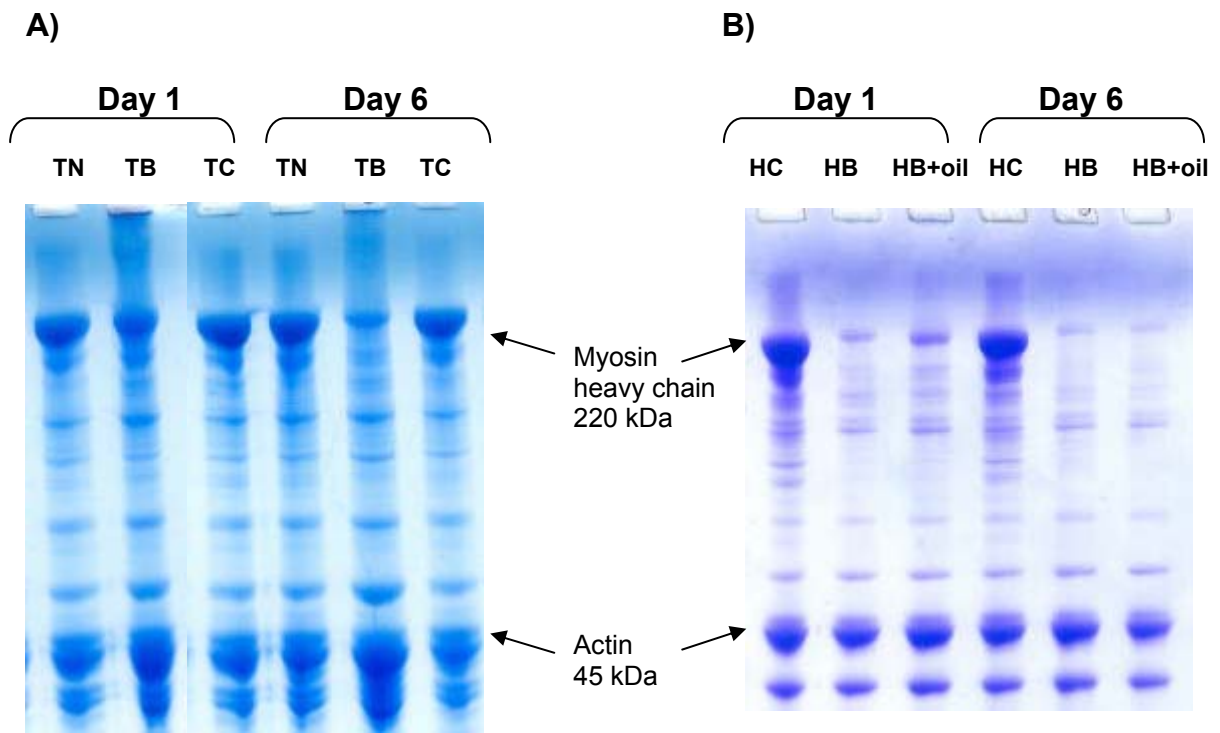


Figure 4

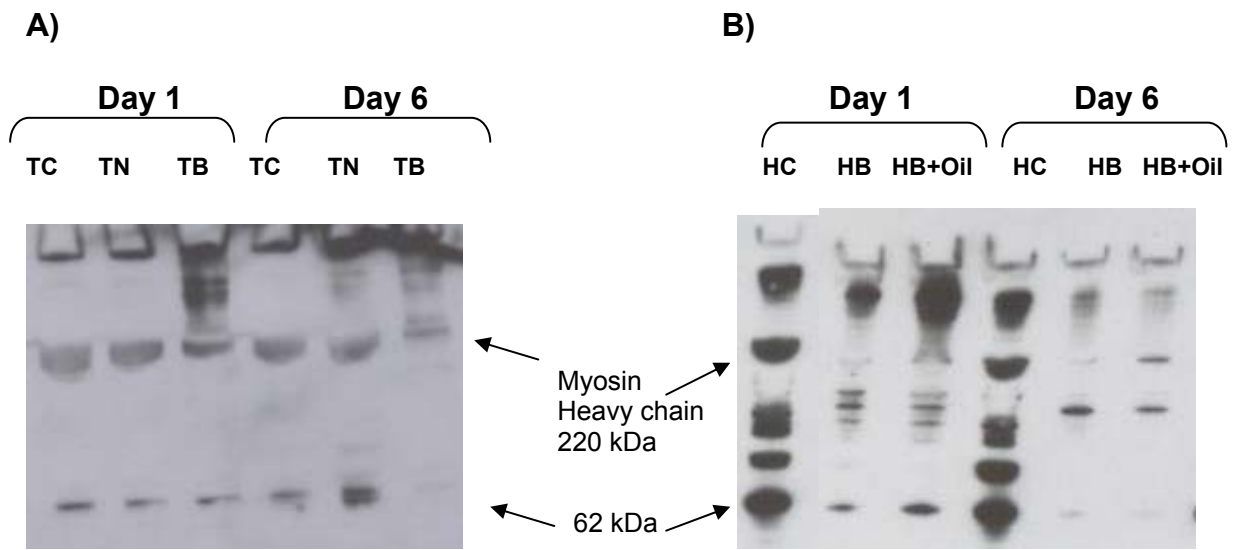


Figure 5

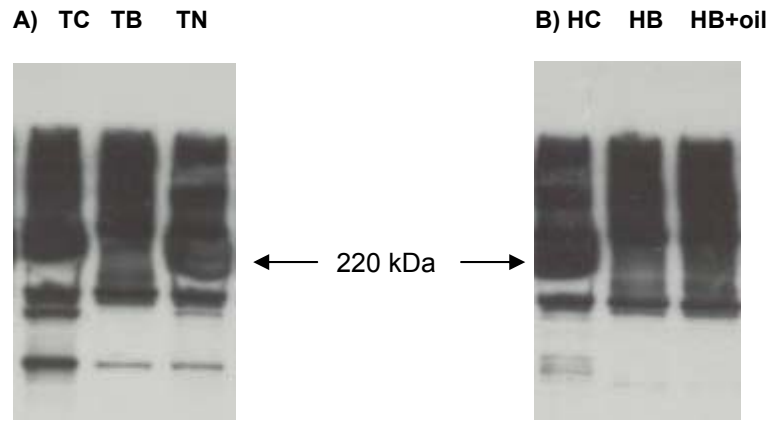


Figure 6

V.3.3.- ESTUDIO DE LOS CAMBIOS EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DURANTE LA CONSERVACIÓN EN CONGELACIÓN DE REESTRUCTURADOS DE MÚSCULO DE MERLUZA ELABORADOS CON ALGINATO SÓDICO Y TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA.

“Physicochemical changes during frozen storage of restructured fish models made with sodium alginate and microbial transglutaminase.”

Helena M Moreno; José Carballo and A. Javier Borderías.

Pendiente enviar a Journal of the Science of Food and Agriculture.

**PHYSICOCHEMICAL CHANGES DURING FROZEN STORAGE OF
RESTRUCTURED FISH MODELS MADE WITH SODIUM ALGINATE OR
MICROBIAL TRANSGLUTAMINASE.**

Helena M Moreno; José Carballo and A Javier Borderías*

**Departamento de Ciencia y Tecnología de la Carne y Productos Cárnicos y del
Pescado y Productos de la Pesca, Instituto del Frío (CSIC), C/ José Antonio
Nováis, 10, 28040 Madrid, Spain.**

***Corresponding author. Tel.: +3491 5492300; Fax; +3491 5493627. E-mail
address: jborderias@if.csic.es (J. Borderías)**

Abstract

BACKGROUND: Raw-appearing restructured models made from hake (*Merluccius capensis*) muscle using cold gelation technology and addition of sodium alginate and microbial transglutaminase (MTGase) can be also frozen stored. This paper examines the influence of freezing and frozen storage on physicochemical properties of models processed either by “cutter” processing or by kneading small pieces.

RESULTS: MTGase produced more protein aggregation and a better organized protein net in models processed with a “cutter”. Sodium alginate models induced slower protein aggregation than MTGase and were therefore more unstable from a structural point of view and there was more change in their strength in the course of frozen storage. Water binding capacity was higher in restructured models processed by a “cutter” than in models made by kneading small muscle pieces; this is because the protein net was better

organized, as the ultrastructure analysis showed. Better water retention was presented by adding sodium alginate. Lipid oxidation was not high in any of the models studied.

CONCLUSIONS: The model made with MTGase was more compact and more stable than the one made by adding sodium alginate. Loss of WBC in the course of frozen storage was mainly a consequence of the high rate of formation of large ice crystals in all models. From oxidation point of view, models are quite stable.

Key words: Sodium alginate, microbial transglutaminase, prototypes of restructured fish products, frozen storage.

INTRODUCTION

Value added fish products can be made using muscle restructuring technology with undervalued fish species or with minced muscle from filleting subproducts of valuable species, controlling shape, colour, texture, fat, moisture content and other properties.¹⁻³

The increasing demand for “fresh products” in recent years has prompted attempts to study restructured products based on chopped or minced raw fish muscle which present an appearance and eating-characteristics similar to cuts from intact muscle rather than presenting a cooked appearance like most products of this kind available in the market.

Such cold-set products may be processed in many different ways, for instance as marinated products, “sushi”, carpaccio, or as a ready-to-cook fish fillet analogue.⁴

Two ingredients, alginate and MTGase, could be used to gelate proteins at temperatures low enough not to cause changes in the raw appearance or the flavour of the product.

Each of these binding agents interacts with proteins in a different way⁴⁻⁹, and the

interaction may also differ depending on the kind of ingredients and the type of fish muscle involved in the process.¹⁰

It is reasonable to suppose that if these ingredients could enhance protein bonding, this would produce changes in the substrate that could alter the pattern of muscle spoilage during frozen storage. There is lot of information available about changes in proteins and sensory characteristics during frozen storage of fish muscle¹¹⁻¹⁹, but there have been no studies of changes in muscle structures as a consequence of sodium alginate or MTGase addition. Such changes could alter the behaviour of muscle functional properties as reflected in mechanical properties and in water binding ability, and they could also influence lipid oxidation patterns.

The aim of this work was to study the effects of frozen storage on restructured models made with hake muscle and different concentrations of added sodium alginate or MTGase. Restructured products were made either with a cutter or by kneading small pieces with different ingredients.

MATERIALS & METHODS

Raw materials and ingredients of samples

Frozen stored (-20°C) hake fillets (*Merluccius capensis*) were used to make the two kind of models. The first (M) was made after reducing the muscle pieces into very small particles (<1.0mm) using a cutting process. The second (P) was made with pieces of the same muscle of around 20 mm. Restructured products were made with either sodium alginate or MTGase as binders, and the comminution process was also different in either case.

In the case of restructuring by using sodium alginate (Lots MA and PA), the ingredients added were: sodium alginate (Degussa Texturant Systems España, S.A.; Barcelona, Spain), calcium chloride (Panreac Quimica, S.A.; Barcelona, Spain), sodium chloride (Panreac Quimica, S.A.; Barcelona, Spain), and corn starch (Clearam CH-20, DADELLOS, S.L., Valencia, Spain). In the case of restructured using MTGase (Lots MM and PM), the ingredients added were: sodium caseinate (Julio Criado Gómez, S.A. Madrid, Spain), microbial transglutaminase (MTGase) solved in water (Activa W -99% maltodextrine and 1% MTGase- Ajinomoto Co.; Tokyo, Japan). The proportions of ingredients and composition of samples are shown in Tables 1 and 2. Different formulates were chosen for preparing models of different prototypes of several types of products. For instance lot MM could serve to elaborate smoked or marinate products with a salt content of 4% due to its expected higher mechanical properties. While lots MA, PA and PM could serve as models of fillets analogs.

Sample preparation

To elaborate lots MA and MM the muscle pieces were finely homogenized with the ingredients in a refrigerated vacuum cutter (Stephan UM5, Stephan u. Söhne GmbH & Co., Hameln, Germany). The order of addition and time of homogenization timer for samples prepared with sodium alginate was as follow: NaCl plus 1min of homogenization, CaCl₂ plus 1min of homogenization, sodium alginate and again 1min of homogenization and finally 1 min more with the corn starch. The final batter was again homogenized during one min more (see Table 1 for composition). In the case of samples elaborated by adding MTGase, the ingredients were incorporated as follows: NaCl plus 1min of homogenization, sodium caseinate plus 1min of homogenization, MTGase solved in water (5% of the total sample) and again 1 min of homogenization

and finally 1 min more with the corn starch. The final dough was homogenized during one min more (see Table 2 for composition).

To prepare lots PA and PM, the muscle pieces were ground in a meat mincer (FTS 11 Model, Van Dall SRL, Milan) through a plate with holes of 20.0 mm diameter, then mixed with the others components in a kneading machine (Hobart N-504, Hobart Corporation, USA). In this way the muscle fibres are not disintegrated as in the previous cases, and the final texture of the restructured is more natural, retained the fibrousnesses. The order of ingredients addition is the same as it has been described above and composition of the samples is also in Table 1 and Table 2.

Round plastic plates (depth 16 mm; Ø 96 mm) were filled with the resulting batters and then placed in chilled storage (5°C) overnight. Next day samples were placed in blust afreezer (AGA Frigoscandia, Laboratory Freezer) at -20 °C and frozen. Samples were packed in plastic bags and stored at -15°C during 5 months. The analyses were carried out days 1, 30, 60, 90, 120 and 150 of the frozen storage.

Proximate Analysis

Moisture, fat and ash contents of the fish muscle were determinated²⁰ in quadruplicated. Crude protein content was measured in quadruplicate by a LECO FP-2000 Nitrogen Determinator (Leco Corporation, St Joseph, MI, USA).

Viscosity measurement

The apparent viscosity were carried out according to Borderías et al.²¹ in order to determine the functional quality of the muscle. Thawed samples were homogenized with 5% NaCl (1:4), pH=7 (phosphate buffer). The homogenate was filtered through gauze and centrifuged for 10 min at 345 x g to remove air bubbles. Measurements were

made with a RV4 spindle, using a Brookfield model DV-III Rheometer (Stoughton, MA) and rheocalc V 1.2 software. Measurements were carried out in triplicate and results were expressed in centipoises (cP).

Protein solubility

Protein solubility of samples was determined in triplicate, essentially according to the Ironside and Love²² procedure, by analyzing the amount of soluble protein in a chilled aqueous solution of 5% NaCl. The protein was analyzed in a LECO FP analyzer, and the results were expressed as the percentage of soluble protein over total protein. Samples were analyzed days 1 (no frozen sample) 60 and 150 of frozen storage.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

SEM was carried out over all samples after 24 h of setting at chilled temperature and after 150 days of frozen storage. Samples were fixed with a mixture (1:1 v/v) of formaldehyde (4%) and glutaraldehyde (0.2%) in 0.1M phosphate buffer (pH 7.2) and post-fixed with OsO₄, ashes and dried in increasing concentrations of acetone and critical-point dried as describe Sánchez-Alonso et al.²³ Samples were then sputter-coated (Balzer, SCD004) with gold/palladium and examined in a Jeol Scanning Microscope (Jeol, JSC 6400, Akishima, Tokyo, Japan) at 20 kV.

Mechanical properties

In view of the different physical properties of the samples elaborated with different particle sizes. Puncture Tests²⁴ were carried out on samples MA and PM and Binding Test were carried out on samples PA and PM. Both analyses were carried out in samples after being thaw and room-tempered days 1, 30, 60, 90,120, 150.

For Puncture Tests, sample probes of 16 mm depth and 96 mm diameter were penetrated up to breaking point six times at separate points. Tests were performed using a 5 mm diameter cylindrical stainless steel plunger attached to a 50 N cell connected to the crosshead of a texture analyzer. Breaking Strength (BS) in N and Breaking Deformation (BD) in mm were determined on the force-deformation curves. Force-deformation curves were obtained at 0.2 mm/s crosshead speed.

For the Binding Test, three round tempered samples (depth 16 mm; diam 96 mm) were measured at a time to assess the ability of the muscle pieces to adhere to one another (strength), in a procedure similar to the one described by Field et al.²⁵ The strength (S) was measured as the peak force (N) required for a 1.9 cm ball, at a cross head speed of 100 mm/min (in a 50 N load cell), to break through a fish slice mounted on a ring of 3.2 cm inner diameter. Elongation (E) was estimated as the distance (mm) travelled by the ball after contact with the sample surface before the ball bursts through (peak force).

All mechanical properties were analysed using a TA-XT plus Texture Analyzer (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY, USA) at room temperature (20-22°C).

Water Binding Capacity

A frozen sample (2 g) was cut into small pieces and placed in a centrifuge tube (diameter 10 mm) with enough pipette filter (Gilson, Inc. Middenton, WI 53562 USA) as absorber. The muscle was thawed in a tube and then centrifuged in a Jouan MR1812 centrifuge (Saint Nazaire, France) for 10 min at 3000 x g at room temperature following the procedure describe by Moreno et al.⁴ days 1, 30, 60, 90,120, 150. Water Binding capacity (WBC) was expressed as per cent water retained per 100g water present in the muscle prior to centrifuging. Measurements were carried out in triplicate.

Thiobarbituric acid index (TBA-i)

The thiobarbituric acid index (TBA-i) was determined according to Vyncke²⁶ on a 5% trichloroacetic acid extract of the restructured fish muscle. Results were expressed as mg of malondialdehyde per kilogram of sample. It was carried out days 1, 30, 60, 90, 120, 150 of frozen storage.

Statistical Analysis

One way ANOVA was conducted using Statgraphics 2.1 (STSC Inc., Rockville, MD). The difference among means was analysed using a Tukey HSD test ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Proximate Analysis

The main constituents of the raw sample were moisture $80.9 \pm 0.99\%$, protein $16.6 \pm 0.8\%$, fat $1.0 \pm 0.17\%$ and ash $1.4 \pm 0.03\%$. Viscosity was 6388 ± 337 cP. The degree of protein aggregation correlated well with the apparent viscosity of samples.^{21,27} Following the example of Barroso et al.²⁸, these viscosity data indicate that the quality of this frozen fish muscle was good.

Protein solubility

As Table 3 shows, the ratio of soluble protein, in 5% NaCl/total protein, was lower in sample MM because MTGase aggregated most of the protein. The level of soluble protein in sample MM changed little in the course of frozen storage, probably because most of the possible protein bonding had taken place in the previous stages and there are not more proteins available to be linked. Sample MA was not initially as

aggregated as MM, but aggregation increased over frozen storage. There are two possible reasons why protein aggregation during frozen storage was higher: the residual ability of alginates to form a gel in the presence of CaCl_2 , even in a frozen stage or protein aggregation caused by frozen storage and ice crystal formation: These factors would clearly affect the net structure and also induce changes in myofibrillar fibre morphology, affecting the mechanical properties and hence the texture.^{13,14-19} In models made with muscle pieces (Lots PA and PM), there was less aggregation than in samples made with a cutter, because neither MTGase nor alginate effectively penetrated the muscle proteins, and only proteins on the surface of muscle pieces were available for bonding. In these samples there was no change in aggregation during frozen storage ($p>0.05$).

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Pictures were taken of restructured models made with sodium alginate and with MTGase, after 1 day of setting at 5°C (non-frozen samples, Fig. 1) and after 150 days of frozen storage (Figs. 2A-2B and 3A-3B). When pictures of samples made by the two different processes were compared after setting at 5°C , it was observed that the matrix in the samples made with a cutter (MM and MA) was more homogeneous and compact. Moreover, sample MM presented a more reticulated matrix than sample MA (Fig. 1A vs. 1B), which is consistent with the higher protein aggregation observed in sample made with MTGase. Figure 1C (PA) shows partial net formation by the alginate, but the net was less evident and compact than when MTGase was added (Fig. 1D). In fact in the sample with alginate a whiter net (probably of alginate-calcium) was discernible alongside the muscle net. This suggests a parallel net formed by alginate and calcium alongside the muscle net. The two nets were presumably linked since, as it has been said

before, there was considerable myofibrillar protein aggregation when alginate was used. According to these results, Montero et al.⁸ and Pérez-Mateos et al.²⁹, reported that the alginate was located in small elongations partially connected with protein net. On the other hand Gómez-Guillén et al.³⁰ reported the formation of a compact protein matrix in a fish substrate with added MTGase, although in that case these authors applied high pressure, which could affect the net structure.

After frozen period of 150 days, samples showed numerous holes reflecting the formation of ice crystals during freezing and frozen storage (Fig. 2A and 2B). The water constituting the crystals obviously came from the muscle, thus altering the physicochemical system and hence also texture and mechanical properties. There was slightly less alteration in samples made with a “cutter” machine (MA and MM) than in samples made by kneading (PA and PM). This is probably because a better protein net is formed in the cutting process, as confirmed by Figures 3A and 3B and the aggregation data (Table 3), which is able to retain the water, thus preventing it from migrating to form ice crystals.

Mechanicals properties

Breaking strength clearly tended to increase in both samples MM and MA during frozen storage. This was probably due to the residual ability of alginates to gelate in the presence of CaCl₂ in frozen storage and to residual MTGase activity during storage and also at the time of thawing. The increase from day 60 of storage was greater in samples made with alginate than with MTGase (Fig. 4A). This was possibly because the protein net structure in sample MM was more stable and more compact, as shown in the ultrastructure photos (Fig.1A and 1B). In contrast, at the beginning of storage period, sample with alginate was not bonded so stably, allowing more bonding to take place in

the course of frozen storage due probably to supposed residual alginate gelating ability. This is also consistent with the increase in protein aggregation during frozen storage. The increase in strength during frozen storage conflicts with Benjakul et al.³¹ but it has to be considered, the different kind of protein, hake and surimi. These authors reported a continuous decrease of breaking force in surimi gels during storage for up to 6 months at -18°C, mainly due to muscle protein denaturation as indicated by a continuous decrease in Ca²⁺-ATPase activity. In the hake fish muscle protein the increase Breaking deformation did not show any clear trend over the frozen storage period (Fig. 5).

Binding properties measured as strength (N) in samples made by kneading small pieces (Lots PA and PM), showed a clear tendency to increase up to 120 days irrespective of whether sodium alginate or MTGase was added (Fig. 6). This was possibly caused by residual alginate and MTGase activity and by storage-induced protein aggregation, which would enhance the mechanical properties of the samples^{13,31} as reported above. Restructured products made with MTGase presented a greater increase in strength than products made with sodium alginate. This can be explained by the greater bonding activity of MTGase resulting in a more compact structure³⁰, although samples PA and PM exhibited slight differences in the degree of protein aggregation (Table 3). Elongation (mm) of the restructured products was also determined after frozen storage (Fig. 5B), but the values recorded in the samples (PA, PM) did not change significantly ($p>0.05$) during frozen storage.

Water Binding Capacity

Water Binding Capacity of frozen samples is affected by the growth and distribution of ice crystals during frozen storage.³²

Samples made with a cutter (MA and MM) showed higher WBC than those made by kneading pieces (Fig. 6). This could be a consequence of greater protein-ingredient-water interaction, and also of pre-gelation of protein which had been partially solubilized by the salt. There was a gradual loss of WBC over the course of frozen storage, probably due to disorganization of the protein net caused by ice crystallization, which was strongly evident as noted. Samples PA and PM, which presented a poorer protein network from the outset of storage, showed more evident disorganization and hence less WBC.

In contrast, the WBC of samples made with pieces (PA and PM) was considerably lower than that of samples made with a cutter, and moreover the decrease was much more acute. Elsewhere, Moreno et al.³³ have discussed the importance of muscle particle size for WBC. There were no significant differences between samples with alginate or MTGase made in the same way.

Thiobarbituric acid index (TBA-i)

The TBA-i value is indicative of the degree of lipid oxidation. Because of the very low fat content (1.01 %) in hake muscle, the TBA value was also very low, ranging between 0.02 $\mu\text{gMDA/kg}$ fish muscle and 0.08 $\mu\text{gMDA/kg}$ fish muscle over the 150 days of frozen storage, although there was a significant ($p < 0.05$) increase at day 30 of frozen storage (Figure 9). Such low values were probably due either to a low level of lipid oxidation or to interference from formaldehyde and other substances reacting with thiobarbituric acid; this would reduce TBA concentration, causing incomplete absorbance at 525 nm¹³. Maximum values of TBA-i were recorded in samples MM and PM, both made with MTGase, at day 150 (Fig. 7). This suggests that either MTGase has a pro-oxidant effect in the given conditions or it interferes in the determination of TBA-

i, causing over-estimation. No references have been found related to that in minced fish restructured products although the authors have some evidence in relation with it in other similar samples. Kellerby et al.³⁴ also observed a significant increase in oxidation (peroxides and TBA-i) in emulsions containing MTGase and argued that cross-linking of the protein at the interface induced changes in the protein structure that altered the iron binding site on the protein, bringing iron and peroxides closer and triggering oxidation. In general, it could be stated that there is not clear trend of the TBA values. In general, there has been no clearly observable trend in TBA values. Similar results were reported by Sánchez-Alonso et al.³⁵ for restructured hake (*Merluccius capensis*) products stored in similar conditions to ours. Note also that sample MM presented the highest values but also a higher proportion of NaCl (4.0%), which could account for the higher rancidity. The effect of NaCl on lipid oxidation has been studied in many different meat products, by various authors including Lee et al.⁷, Sakai et al.³⁶ and Sallam and Samejima³⁷.

CONCLUSION

The models made with a cutter presented increasing breaking strength and binding ability over the course of frozen storage due to the residual ability of sodium alginate to gelate, to residual MTGase activity and to protein aggregation. The model made with MTGase was more stable because it formed a more organized protein net which was more compact from the outset. Loss of WBC in the course of frozen storage was mainly a consequence of intensive formation of large ice crystals.

The models made by kneading small pieces of muscle also presented increasing strength over frozen storage, and their WBC decreased more sharply than in the other models.

There was no clearly observable tendency for lipid oxidation to increase over the frozen storage period.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) for the Predoctoral Scholarship under program I3P-2004. Instituto del Frío Technicians are thanked for excellent pilot plant and laboratory assistance.

REFERENCES

1. Raharjo S, Dexter DR, Worfel RC, Sofos JN, Solomon MB, Shults GW and Schmidt GR, Restructuring Veal Steaks with Salt. *J Food Sci* **59** (3): 471-473 (1994).
2. Raharjo S, Dexter DR, Worfel RC, Sofos JN, Solomon MB, Shults GW and Schmidt GR, Quality Characteristics of Restructured Beef Steaks Manufactured by various Techniques. *J Food Sci* **59** 60 (1): 68-71 (1995).
3. Ramírez JA, Santos IA, Morales OG, Morrisey MT and Vázquez M, Application of Microbial Transglutaminase to improve mechanical properties of surimi from silver carp. *Sci Tech Aliment* **3**(1):21-28 (2006).
4. Moreno HM, Carballo J and Borderías AJ, Influence of Alginate and Microbial Transglutaminase as binding ingredients on restructured fish muscle processed at low temperature. *J Sci Food Agric* **88**:1529-1536 (2008).

5. Shand PJ, Sofos JN and Schmidt GR, Properties of Algin Calcium and Salt Phosphate Structured Beef Rolls with Added Gums. *J Food Sci* **58**(6):1224-1230 (1993).
6. Kuraishi C, Sakamoto J, Yamanazaki K, Susa Y, Kuhara C and Soeda C, Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *J Food Sci* **62**(3):488-490+515 (1997).
7. Lee SK, Mei L and Decker EA, Influence of sodium chloride on antioxidant enzyme activity and lipid oxidation in frozen ground pork. *Meat Sci* **46**: 349-355 (1997).
8. Montero P, Hurtado JL and Pérez-Mateos M, Microstructural behaviour and gelling characteristics of myosystem protein gels interacting with hydrocolloids. *Food Hydrocoll* **14** (5):455-461 (2000).
9. Suklim K, Flick GJ, Marcy JE, Eigel WN, Haugh CG and Granata LA, Effect of cold-set binders: Alginates and microbial transglutaminase on the physical properties of restructured scallops. *J Texture Stud* **35**(6):634-642 (2004).
10. Urdangarin M, Shigeru K, Ryo S and Hiroki S, Improved solubility and stability of carp myosin by conjugation with alginate oligosaccharide. *Fish Sci* **70**:896-902 (2004).
11. Lim H and Haard NF, Protein insolubilization in frozen Greenland halibut. *J Food Biochem* **8**(3):163-187 (1984).
12. García ML, Martín-Benito J, Solas MT and Fernández B, Ultrastructure of the myofibrillar component in cod (*Gadus morhua* L.) and hake (*Merluccius merluccius* L.) stored at -20°C as a function of time. *J Agric Food Chem* **47**:3809:3815 (1999).
13. Careche M and Tejada M, Interferente by formaldehyde in the 2-thiobarbituric acid test for rancidity. *J Sci Food Agric* **43**: 49- 57 (1988).

14. Careche M, Herrero AM, Rodríguez-Casado A, Del Mazo ML and Carmona P, Structural changes of hake (*Merluccius merluccius*, L.) fillets: Effects of freezing and frozen storage. *J Agric Food Chem* **47**(3):952-959 (1999).
15. Tejada M, Aggregation of myofibrillar proteins during frozen storage of fish. Novel processes and control technologies in the food industry. Eds: Bozoglu, F.; Deak, T.; Ray, B. *Nato Science Series, Life and Behavioural sciences*, **338**: 212-226 (2001).
16. Careche M, Del Mazo ML and Fernández-Martín F, Extractability and thermal stability of hake (*Merluccius merluccius*, L.) fillets frozen stored at -10°C and -30°C. *J Sci Food Agric* **83**:1791-1799 (2002).
17. Herrero AM, Carmona P and Careche M, Raman spectroscopic study of structural changes in hake (*Merluccius merluccius* L.) muscle protein during frozen storage. *J Agric Food Chem* **52**:2147-2153 (2004).
18. Herrero AM, Carmona P, García ML, Solas MT and Careche M, Ultrastructural changes and structure and mobility of myowater in froze-stored hake (*Merluccius merluccius* L.) muscle: Relationship with functionality and texture. *J Agric Food Chem* **53**: 2558-2566 (2005).
19. Geirsdottir M, Hlynisdottir H, Thorkelsson G and Sigurgisladottir S, Solubility and viscosity of herring (*Clupea harengus*) proteins as affected by freezing and frozen storage. *J Food Sci* **72**(7): C376-C380 (2007).
20. AOAC. Official methods of analysis (17th ed.), *Association of official Analytical Chemistry*, Maryland, USA (2000).
21. Borderías AJ, Jiménez-Colmenero F and Tejada M, Parameters Affecting Viscosity as a Quality-Control for Frozen Fish. *Mar Fish Rev* **47**(4):43-45 (1985).

22. Ironside JIM and Love RM, Studies on protein denaturation in frozen fish i. Biological factors influencing the amounts of soluble and insoluble proteins present in the muscle of the North Sea Cod. *J Sci Food Agric* **9**:597-617 (1985).
23. Sánchez-Alonso I, Hají-Maleki R and Borderías AJ, Wheat fibber as a functional ingredient in restructured fish product. *Food Chem* **100**: 1037-1043 (2007).
24. Kim BY, Park J and Yoon W, Rheology and texture properties of surimi gels. In *Surimi and surimi seafood*. Ed. By J. Park, CRC Press, Boca Raton, FL. (2004)
25. Field RA, William JC, Prasad VS, Cross HR, Secrit JL and Brewer MS, An objective measurement for evaluation of bind in restructured lamb roast. *J Text Stud* **15**(2): 173-178 (1984).
26. Vyncke W, Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extract of fish as a measure of oxidative rancity. *Fette Seifen Anstrichmittel* **72**: 1084-1087 (1970).
27. Jiménez-Colmenero F and Borderías AJ, A study of the effect of frozen storage on certain functional properties of meat and fish protein. *J Food Technol* **18**:731-737 (1983).
28. Barroso M, Careche M and Borderías AJ, Quality control of frozen fish using rheological techniques. *Trends Food Sci Technol* **9**(6):223-229 (1998).
29. Pérez-Mateos M, Solas T and Montero P, Carrageenans and alginate effect on properties of combines pressure and temperature in fish mince gels. *Food Hydrocolloids* **16**: 225-233 (2002).
30. Gómez-Guillén MC, Montero P, Solas MT, and Pérez-Mateos M, Effect of chitosan and microbial transglutaminase on gel forming ability of horse mackerel *Trachurus* spp. muscle under high pressure. *Food Res Int* **38**(1): 103-110 (2005).

31. Benjakul S, Visessanguan W, Thonghaekw C and Tanaka M, Effect of frozen storage on chemical and gel-forming properties of fish commonly used for surimi production in Thailand. *Food Hydrocolloids* **19**:197-207 (2005).
32. Bevilacqua A, Zaritzky NE and Cavelo A, Histological measurements of ice in frozen beef. *J Food Technol* **14**:237-251 (1979).
33. Moreno HM, Carballo J and Borderías AJ, Study of two different cold restructuring processes using two different qualities of hake (*Merluccius capensis*) muscle, with addition of Microbial Transglutaminase. *J Sci Food Agric*. Accepted (2009).
34. Kellerby, S. S.; Gu, Y. S.; McClements, D. J.; Decker, E.A. Lipid oxidation in a menhaden oil-in-water emulsion stabilized by sodium caseinate cross-linked with transglutaminase. *J Agric. Food Chem* **54**:10222-10227 (2006).
35. Sánchez-Alonso I, Hají-Maleki R and Borderías AJ, Effect of wheat fibre in frozen stored fish muscular gels. *Eur Food Res Techn* **22**(4):571-576 (2006).
36. Sakai T, Munashinghem DMS, Kashimura M, Sugamoto K and Kawahara S, Effect of NaCl on lipids peroxidation-derived aldehyde, 4-hydroxy-2-nonenal formation in minced pork and beef. *Meat Sci* **66**(4):789-792 (2004).
37. Sallam, K.I., Samejima, K. Microbial and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. *Lebensm-wiss. u. Technol* **37**: 865-871(2004).

Table 1: Restructured made by adding Sodium alginate

Sample*	% NaCl	% Sodium alginate	% CaCl ₂	% Starch
MA	1.5	0.5	0.1	0.8
PA	1.5	0.2	0.1	0.8

MA: cutting process and alginate added; PA: kneading small pieces and alginate added

Table 2: Restructured made by adding MTGase

Sample*	% NaCl	% MTGase	% Sodium caseinate	% Starch	% H ₂ O
MM	4.0	1.0	0.8	0.8	5.0
PM	1.5	0.5	0.8	0.8	5.0

MM: cutting process and MTGase added; PM: kneading small pieces and MTGase added

Table 3: Changes in salt-soluble proteins in samples during frozen storage (%soluble protein/total protein)

Samples**	Storage period (days)		
	1*	60	150
MA	34.41±0.71a	30.59±2.81a	23.33±0.91b
PA	45.25±0.61a	44.65±1.39a	43.11±0.97a
MM	24.05±0.67a	23.01±1.47a	22.67±1.33a
PM	41.41±1.04a	42.43±0.95a	40.20±1.75a

* 5°C/24h of setting.**See Tables 1 and 2 for samples code

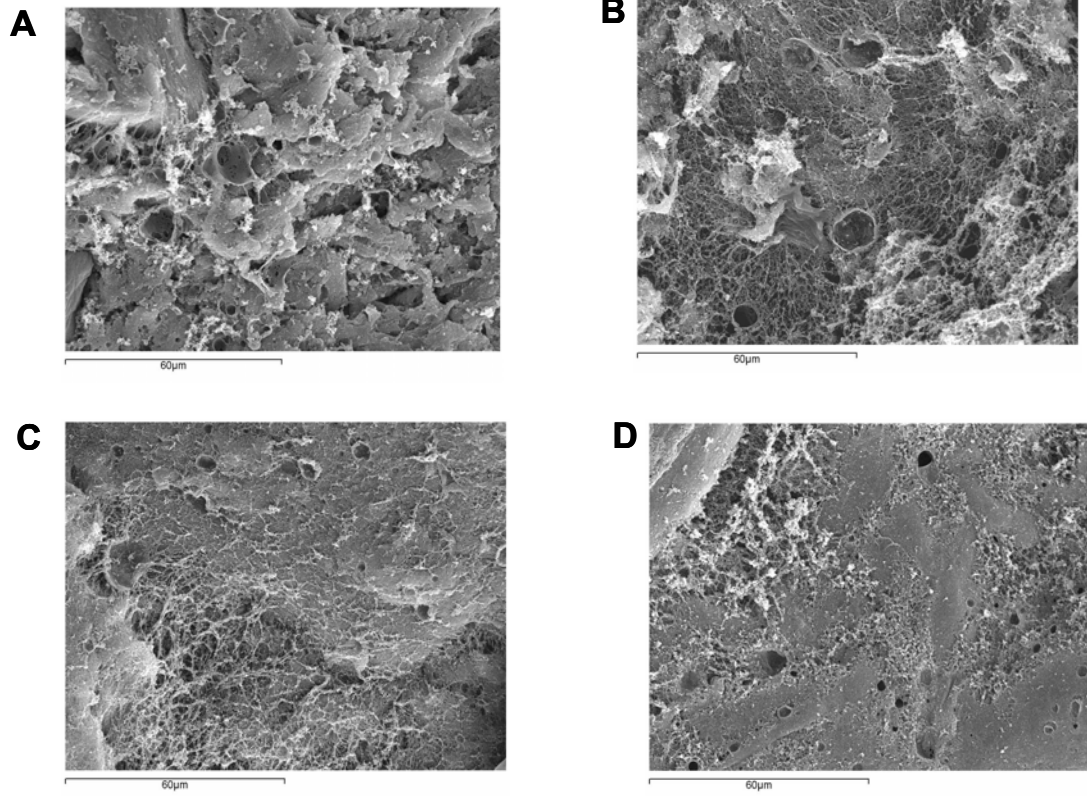


Figure 1: Scanning electron microscopy micrographs (x1000 magnification) of restructured after 1 day of setting at 5°C. A: MA; B: MM; C: PA; D: PM. See Tables 1 and 2 for samples code.

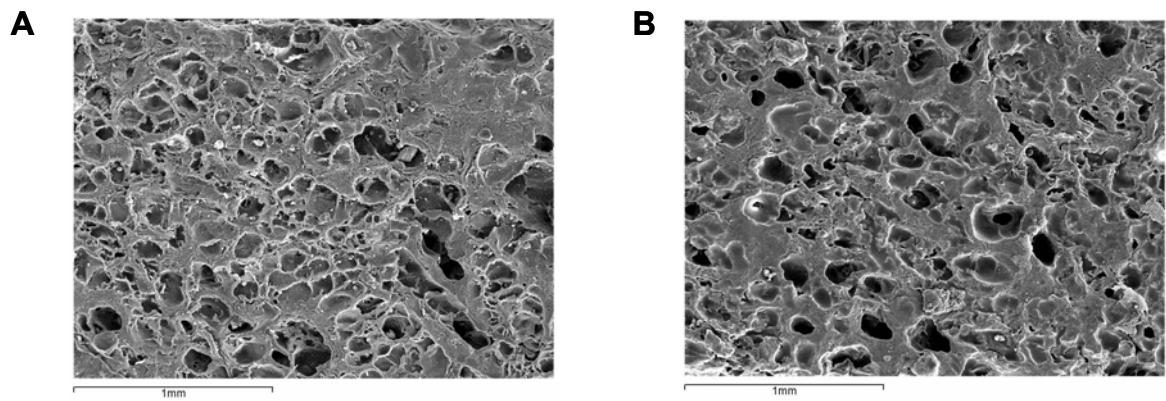


Figure 2: Scanning electron microscopy micrographs of restructured after 150 days frozen storage. A: MM (x50 magnification); B: MA (x50 magnification). See Tables 1 and 2 for samples code.

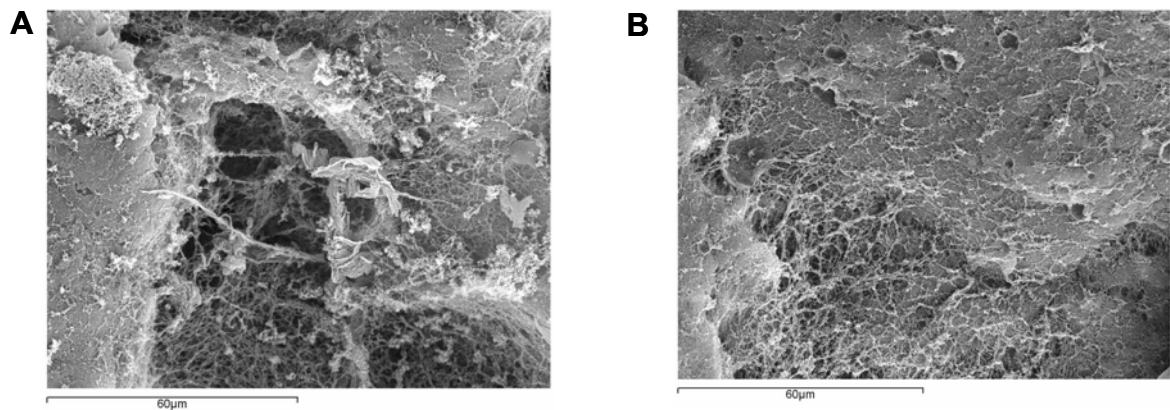


Figure 3: Scanning electron microscopy micrographs of restructured after 150 days frozen storage . A: MA (x1000 magnification); B: PA (x1000 magnification). See Tables 1 and 2 for samples code.

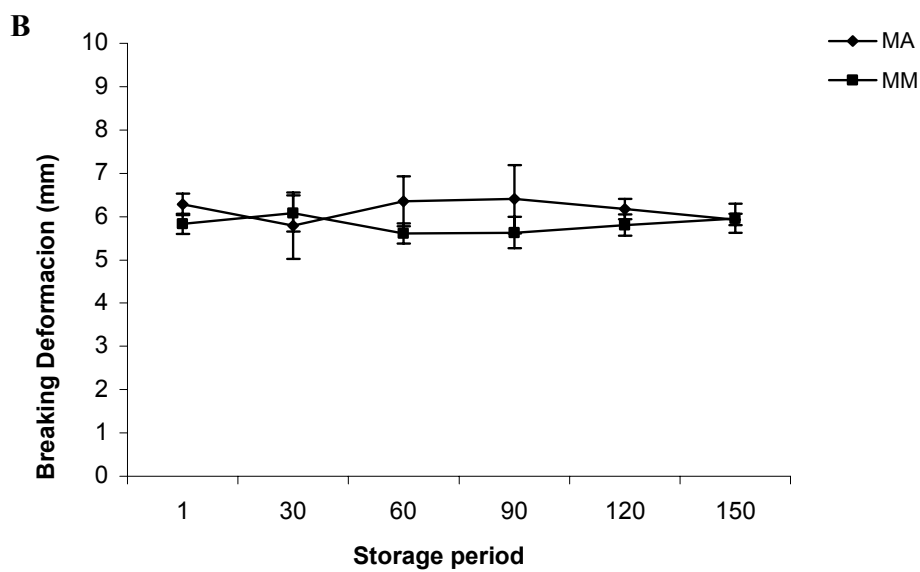
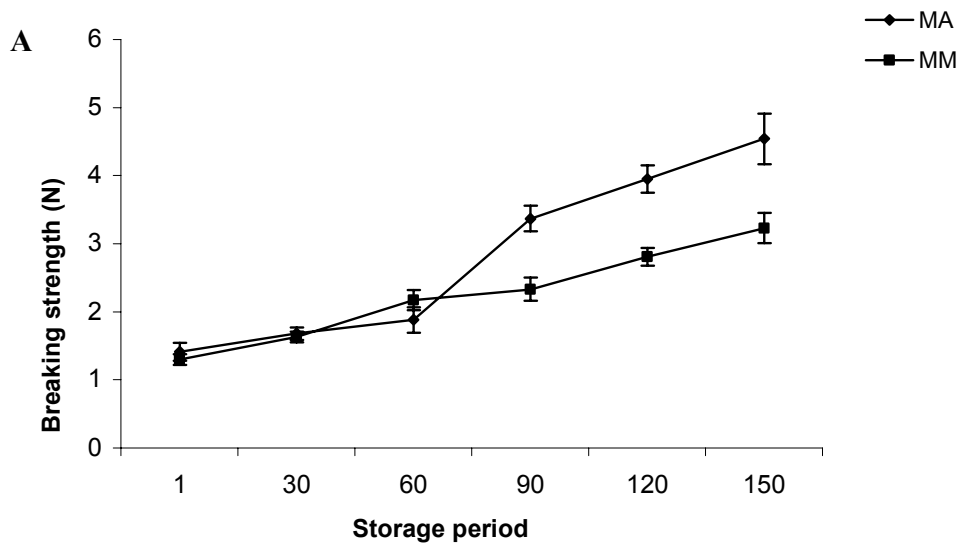


Figure 4: Breaking strength (N) and Breaking Deformation (mm) evolution throughout frozen storage period of samples MM and MA. See Tables 1 and 2 for samples code.

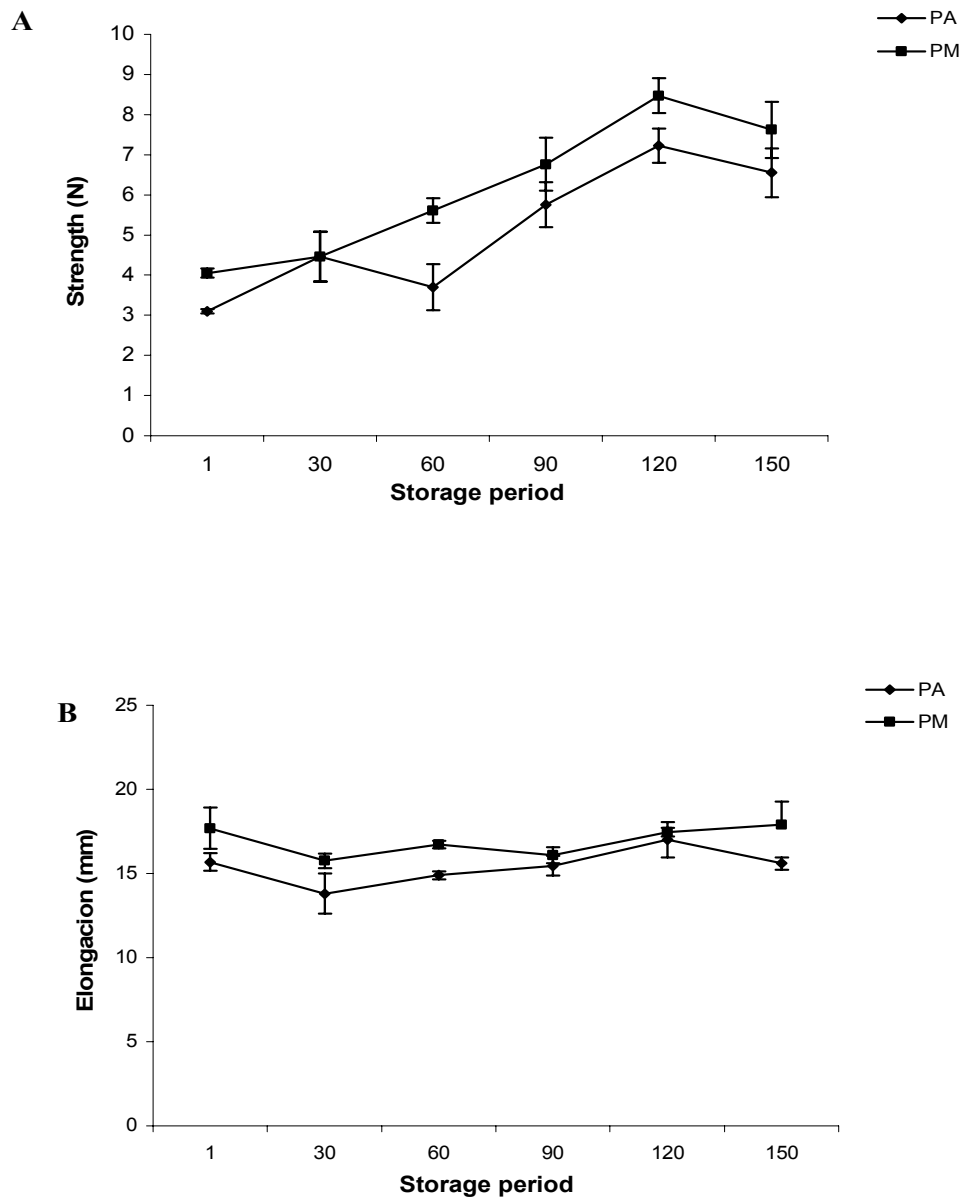


Figure 5: Strength (N) and Elongacion (mm) evolution throughout frozen storage period of simples PM and PA. See Tables 1 and 2 for samples code.

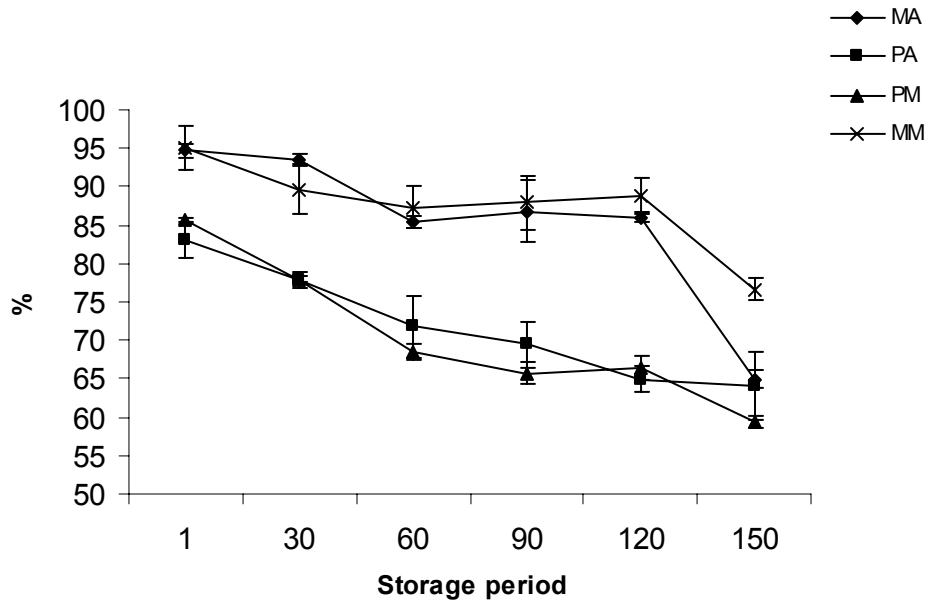


Figure 6: WBC evolution throughout frozen storage period of all samples. See Tables 1 and 2 for samples code.

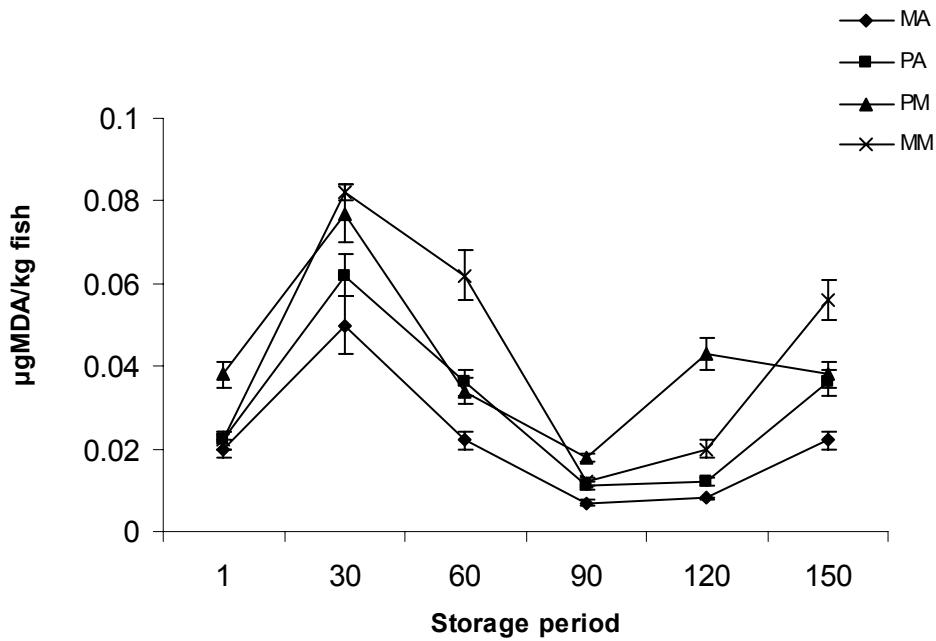


Figure 7: TBARS evolution throughout frozen storage period of all samples. See Tables 1 and 2 for samples code.

BLOQUE IV: APLICACIONES

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
16 de Agosto de 2007 (16.08.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2007/090916 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A23L 1/325 (2006.01) A23P 1/08 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2007/000064

(22) Fecha de presentación internacional:
8 de Febrero de 2007 (08.02.2007)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200600298 9 de Febrero de 2006 (09.02.2006) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **BORDERÍAS JUÁREZ, Javier** [ES/ES]; Instituto del Frío,

José Antonio Novais, 10, E-28040 Madrid (ES). **CARBALLO SANTAOLALLA, José** [ES/ES]; Instituto del Frío, José Antonio Novais, 10, E-28040 Madrid (ES). **MORENO CONDE, Helena María** [ES/ES]; Instituto del Frío, José Antonio Novais, 10, E-28040 Madrid (ES).

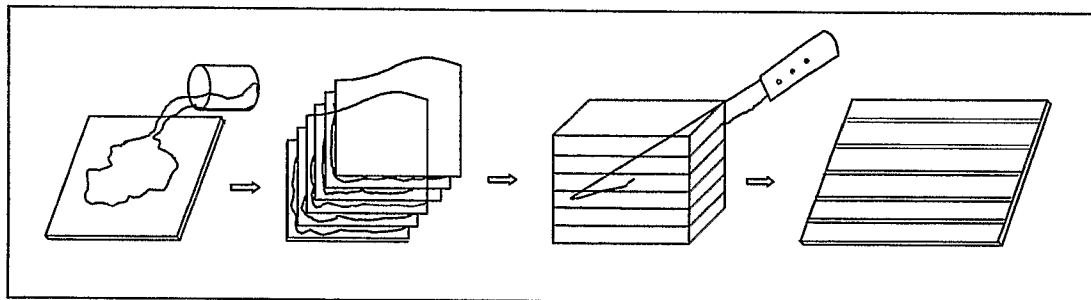
(74) Mandatario: **UNGRIA LÓPEZ, Javier**; Avda. Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD FOR FORMING MYOTOMES OR MYOSEPTA IN RESTRUCTURED FISH PRODUCTS

(54) Título: CONFORMACIÓN DE MIOTOMOS O MIOSEPTOS EN PRODUCTOS PESQUEROS RESTRUCTURADOS



(57) Abstract: The invention relates to a method for forming myotomes or myosepta in restructured fish products. The method, which is used to imitate fish myosepta or myotomes in restructured fish products, consists in joining sheets based on surimi or minced fish (or a mixture thereof) using an adhesive mixture, said sheets having a thickness of between 2 and 10 mm. The adhesive mixture comprises an aqueous dispersion or a powder mixture containing a binder or an adhesive which uses covalent bonds, such as transglutaminase, in order to join a thermoreversible binder such as gelatin and a white colour enhancer such as calcium carbonate or titanium dioxide. The sheets formed separate gently when the product obtained is heated or cooked, such as to produce the image of the fillet or piece of fish to be imitated. The product thus obtained can be subjected to standard preservation techniques, such as freezing, refrigeration, smoking, pasteurisation, etc.

(57) Resumen: Conformación de miotomos o mioseptos de productos pesqueros reestructurados. El procedimiento para imitar los mioseptos o miotomos del pescado en productos pesqueros reestructurados consiste en unir láminas a base de pescado picado o surimi (o mezcla de ambos) de unos 2 a 10 mm de espesor mediante una mezcla encolante. Esta mezcla encolante es una dispersión acuosa o una mezcla en polvo que contiene un ligante o adhesivo que une mediante enlaces covalente, como es la transglutaminasa, un ligante termorreversible como la gelatina y un potenciador visual de color blanco como el carbonato calcico o el dióxido de titanio. Las láminas formadas se desunen de forma ligera al calentar o cocinar el producto obtenido, dando la imagen del filete o trozo de pescado a imitar. El producto obtenido se puede someter a métodos de conservación convencionales como congelación, refrigeración, ahumado, pasteurización, etc.

WO 2007/090916 A1



(84) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones*

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional*



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 281 282**

② Número de solicitud: 200600298

⑤ Int. Cl.:

A23L 1/325 (2006.01)

A23P 1/08 (2006.01)



⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **09.02.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.2007**

Fecha de la concesión: **09.08.2008**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.08.2008**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.08.2008

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Borderías Juárez, A. Javier;
Carballo Santaolalla, José y
Moreno Conde, Helena María**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Conformación de miotomos o mioseptos en productos pesqueros reestructurados.**

㉑ Resumen:

Conformación de miotomos o mioseptos en productos pesqueros reestructurados.

Producto elaborado a partir de músculo picado, surimi o mezcla de ambos cuyo proceso de reestructurado y conformación permite que después del cocinado se distingan los mioseptos y miotomos propios del pescado cocinado. La ausencia de estas lascas en el pescado reestructurado, le confiere inferior categoría, con lo que este procedimiento mejora sus características comerciales. La elaboración comporta la utilización conjunta de tres tipos de sustancias: un ligante termoestable, como la transglutaminasa, un ligante termo reversible, como la gelatina y un potenciador visual que le confiera el color blanco. Según la fórmula utilizada para unir las diversas láminas de reestructurado, estas se desunirán de ligeramente tras calentar o en el cocinado, dando la imagen particular del filete o trozo de pescado a imitar. El producto así elaborado, podrá someterse a métodos de conservación convencionales como congelación, refrigeración, ahumado, pasteurizado, esterilizado, etc.

ES 2 281 282 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

VI. DISCUSIÓN INTEGRADORA

En la presente discusión integradora se estudiará por separado el empleo de alginato sódico y de MTGasa en la reestructuración en frío de músculo de merluza (*Merluccius capensis*), así como el efecto de la incorporación de MTGasa en la elaboración de geles de *surimi* de calamar gigante (*Dosidicuss gigas*).

Por otra parte, se abordará el estudio de la conservación de modelos de reestructurados elaborados empleando alginato sódico y MTGasa con base en músculo de merluza de la especie *Merluccius capensis* y *Merluccius merluccius*) y trucha (*Oncorhynchus mykiss*).

Se pretende que el estudio de estos modelos de reestructurados sirva para la posterior elaboración de productos pesqueros con aspecto de crudo.

Como ya ha sido comentado en la introducción de la presente Memoria, el mecanismo de acción de uno y otro ingrediente es completamente diferente, pero con la incorporación independiente de ambos se ha visto que es posible obtener reestructurados con diferente tamaño de partícula empleando la metodología de reestructuración en frío descrita en el apartado de Materiales y Métodos. En la bibliografía se recogen diversas formas de incorporación de alginato sódico con diferentes fuentes de iones calcio (Earle, 1968; Rocker y col, 1983; Moreno y col., 1994; Montero y Pérez-Mateos, 2002; Vignisson, 2004), como de MTGasa junto con caseinato sódico (Kuraishi y col., 1997; Ramírez y col., 2000; Killic, 2003; Uresti y col., 2004; Cofrades y col., 2006) necesarios para llevar a cabo los procedimientos de gelificación en frío mencionados.

VI.1. EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE ALGINATO SÓDICO

Cuando se desea reestructurar músculo mediante el concurso de alginato es necesaria la introducción de alginato sódico e iones calcio para que se forme la red alginato-calcio que se caracteriza por tener propiedades termoestables. Para decidir la forma mas adecuada de incorporación de las posibles fuentes de calcio al sistema músculo-alginato, se llevaron a cabo una serie de pruebas preliminares basadas en diversos estudios (Ahmed y col., 1938; Rocker y col, 1983; Montero y col., 1994, Montero y Pérez-Mateos, 2002; Cathell y Schauer, 2007) y que quedan recogidas en el apartado V.1.1 del epígrafe de Trabajo Experimental de la presente Memoria. Los

resultados de dichas experiencias indicaron que las sales cálcicas más adecuadas para formar un sistema de alginato-calcio-pescado picado con propiedades físico-químicas adecuadas eran, lactato, caseinato y cloruro cálcicos. Por otra parte, su incorporación más idónea tanto por facilidad tecnológica, como por las propiedades que conferían a los reestructurados, resultó ser la incorporación en forma de polvo directamente al músculo picado.

Vistos los resultados anteriores, el paso siguiente se basó en determinar, de las tres fuentes de calcio seleccionadas anteriormente, cuál de ellas y en qué concentración debía añadirse junto con el alginato sódico de tal forma que confiriesen a los modelos de reestructurados gelificados a baja temperatura, unas propiedades físico-químicas adecuadas. Estas propiedades deben permitir que dichos reestructurados modelo pudieran ser empleados como base para la elaboración de productos análogos con aspecto de crudo. De este estudio sobre la incorporación de las diferentes fuentes de iones calcio (Cloruro cálcico, Lactato cálcico y Caseinato cálcico), se llegó a la conclusión que la que la fuente más idónea para el tipo de producto que se pretende elaborar, resultó ser el CaCl_2 (Apartado V.1.2). Por ello, en todos los estudios posteriores se continuó incorporando este donante de iones calcio para gelificar junto con alginato sódico.

Para realizar el estudio sobre las propiedades mecánicas de los reestructurados modelo en función de las diferentes variables elegidas (alginato sódico, cloruro sódico y las tres fuentes de calcio seleccionadas en los ensayos preliminares) se empleó la “Metodología de Superficie de Respuesta” (RSM). Se observó que la cohesividad (Apartado V.1.2, Tabla 3) de los reestructurados elaborados con merluza (*Merluccius capensis*) decrecía al aumentar la cantidad de alginato sódico incorporado. Un efecto similar fue constatado por Roopa y Bhattacharya (2008) estudiando las propiedades mecánicas de los geles de alginato. Sin embargo, la resistencia a la ruptura de dichos reestructurados está en función de la cantidad de alginato sódico que se incorpora. Cuando la concentración de alginato sódico se encontraba en un rango entre 0.05-0.14%, lo que se corresponde con bajas concentraciones del mismo dentro de los rangos estudiados, la resistencia a la ruptura disminuía. Sin embargo, al incorporarlo en concentraciones elevadas (0.5%), aumentaba dicha resistencia a la ruptura (efecto cuadrático positivo) (Apartado V.1.2, Tabla 3). Por otra parte, la incorporación del NaCl también la aumenta (efecto lineal positivo) posiblemente debido a la capacidad del NaCl

de solubilizar proteínas favoreciendo de esta manera su capacidad de gelificación (Gallart-Jornet y col., 2007).

Al centrarnos de una manera mas concreta, en los efectos que sobre los reestructurados modelo tenía la incorporación de alginato sódico junto con CaCl_2 , se observó que tanto la dureza, la cohesividad, la elasticidad, así como la adhesividad se incrementaban en comparación con aquellos reestructurados control que no contenían ni alginato sódico ni CaCl_2 , aunque las diferentes combinaciones de alginato y CaCl_2 contribuían de forma diferente a las propiedades mecánicas (Apartado V.1.3, Tabla 3). Por su parte la firmeza de dichos reestructurados disminuía al aumentar la concentración de CaCl_2 ($p < 0.05$). En este sentido Trout (1989) afirmó que la incorporación de elevadas cantidades de iones calcio dificultaba la gelificación del alginato sódico. Este hecho indica, que independientemente de la concentración de alginato empleada (0.05%-05%), la adición de una concentración baja de CaCl_2 (0.1%), da lugar a reestructurados con superiores propiedades mecánicas comparados con otros de mayor concentración. En este sentido, Clarke y col. (1988) y Devetkal y Mendiratta (2001), observaron efectos muy similares a los anteriormente descritos, sobre reestructurados y geles elaborados con músculo de cerdo y ternera empleando alginato sódico.

La capacidad de retención de agua que posee el músculo es uno de los parámetros más importantes que influye sobre las propiedades mecánicas de un reestructurado, independientemente de la tecnología empleada en su elaboración. Relacionados con esta capacidad, se pueden diferenciar tres parámetros. Por una parte, la capacidad de retener el agua al aplicar una fuerza centrífuga (CRA), por otra, la capacidad de retenerla cuando se aplica un tratamiento térmico a temperatura cercana a los 100 °C (pérdidas por cocción) y finalmente el agua que se pierde, por gravedad, como consecuencia del proceso de conservación en refrigeración o descongelación. En los reestructurados elaborados con alginato sódico y CaCl_2 , la CRA es superior cuando se incorporan bajas concentraciones de CaCl_2 (0.1%) que cuando se incorporan concentraciones superiores, independientemente de la concentración de alginato sódico añadida (0.05-0.5%). Cuando la concentración de CaCl_2 aumenta (1.0%), la CRA disminuye aunque dicho efecto puede ser paliado en cierta medida al aumentar la concentración de alginato sódico hasta el 0.5%. A este respecto, cabría indicar que la combinación de alginato y cloruro cálcico más idónea para obtener unos reestructurados modelo con superiores valores de CRA, se corresponde con bajas concentraciones de los mismos dentro de los límites estudiados (Apartado V.1.3, Tablas 1 y 3). Un efecto

similar fue encontrado en las propiedades mecánicas, dado que la incorporación de inferiores concentraciones de CaCl_2 dan lugar a propiedades mecánicas de valores más elevados aunque no en todos los parámetros las diferencias en la composición, contenido de alginato y cloruro cálcico son significativas (Apartado V.1.3 Tablas 1 y 3).

El efecto que un tratamiento térmico semejante a un posible tratamiento culinario puede tener sobre los reestructurados es también un parámetro importante a considerar. En este sentido, se observó, por medio de la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM), que en aquellos reestructurados con mayor concentración en CaCl_2 , la cantidad de exudado como consecuencia de la cocción, era superior a aquellos otros en los que el contenido era menor. Este mismo efecto se observó también cuando los reestructurados se elaboraban con caseinato cálcico como donante de iones calcio, pero además, en este caso se encontró un efecto cuadrático negativo ($p < 0.05$) del alginato sódico, lo que indica que al aumentar la concentración de alginato las pérdidas por cocción disminuían. Este efecto del alginato haría, dada su capacidad de retener agua, que dichas pérdidas por cocción puedan ser en cierta medida paliadas. Sin embargo, éste efecto no se observa cuando el alginato sódico se incorpora junto con CaCl_2 (Apartado V.1.2; Tablas 1 y 3). A este respecto, habría que indicar que la capacidad de ligar agua del alginato ha sido constatada en numerosas ocasiones, tal es el caso de Montero y col. (2000) en pescado picado, Kim y col. (2004) en geles de *surimi* y Kumar y col. (2007) en reestructurados de cerdo, aunque en ninguno de ellos su estudio se llevó a cabo comparando diferentes sales cálcicas a fin de determinar su efecto sobre la capacidad de retener agua.

Existen ciertas discrepancias sobre la interacción que puede tener lugar entre el gel de alginato sódico-fuente de calcio y las proteínas miofibrilares en un reestructurado de músculo de pescado. A este respecto Shand y col. (1993) y Montero y col. (2000) indicaron que pueden producirse interacciones de tipo electrostático entre los alginatos y las proteínas, mientras que otros autores, como Rourke y col. (1997), afirman que pueden producirse enlaces de tipo iónico entre los grupos de carga negativa de los alginatos y los grupos de carga positiva de las proteínas miofibrilares y aminoácidos. Pese a lo anteriormente expuesto, los resultados del presente trabajo (Apartado V.1.3, Figura 1) pueden inducirnos a pensar que el alginato sódico junto con CaCl_2 forma su propia red, la cual de alguna forma interacciona con la proteína miofibrilar. Esta suposición se debe al hecho de que el incremento de CaCl_2 genera un aumento en la formación de enlaces de tipo hidrofóbico y puentes de hidrógeno (Apartado V.1.3,

Tabla 3) que podría ser debido a que el propio CaCl_2 favorece ese tipo de interacción entre las proteínas (Lee y Park, 1998). En relación a estos resultados, se observó por electroforesis un mayor grado de polimerización cuando aumenta la concentración de CaCl_2 , indicando este hecho una mayor interacción entre proteínas, lo cual se corresponde con el aumento de enlaces hidrofóbicos y puentes de hidrógeno comentados con anterioridad, que a su vez se corresponde con reestructurados de superiores propiedades físico-químicas (Apartado V.1.3, Tabla 3). Por otra parte, no se observó un efecto claro sobre la formación de los enlaces como consecuencia del aumento de la concentración de alginato sódico en los reestructurados (Apartado V.1.3, Figura 1). El análisis de electroforesis indicó que el incremento en la cantidad de alginato de 0.05% a 0.5% con alta concentración de CaCl_2 (1%) da lugar a una disminución de la densidad de la banda de la cadena pesada de la miosina (Apartado V.1.3, Figura 3) indicando un mayor grado de polimerización, lo cual se corresponde a la vez con mayores propiedades mecánicas. Este hecho, puede ser debido a que, como consecuencia de la interacción de proteína-proteína o proteína-alginato-calcio, el grado de polimerización de las proteínas es mayor por lo que podría ser el responsable de la mayor firmeza. Este mayor grado de polimerización puede deberse a la acción de la transglutaminasa endógena presente en el músculo de pescado de forma natural, aunque no es posible observar un aumento de los enlaces covalentes con la metodología empleada, pero como se ha indicado con anterioridad si se ha visto un aumento en la polimerización de la miosina en el análisis de electroforesis, cuando la concentración de calcio aumenta (Lee y Park, 1998).

Las modificaciones sobre el color observadas en los reestructurados de merluza elaboradas con alginato sódico, indican una contribución diferente del alginato dependiendo de la fuente de calcio que se incorpora. Al incorporar el alginato sódico junto con caseinato cálcico, se produce un aumento ($p < 0.05$) tanto de la luminosidad (L^*) como del color amarillo de los reestructurados (b^*). Por sí mismas, las diferentes fuentes de calcio presentan una diferente contribución sobre el color de los reestructurados. De esta forma, la incorporación de cloruro cálcico, aumenta tanto la luminosidad (L^*) como la coloración amarillenta (b^*) de los reestructurados. Dicha luminosidad disminuye al incorporar caseinato cálcico, mientras el lactato cálcico no influye sobre las propiedades de color ($p > 0.05$). En este sentido, algunos autores consideran que la capacidad del alginato sódico de modificar las propiedades de color está relacionada con su habilidad de ligar metales (Cathell y Schauer, 2007), aunque en

el ámbito que nos ocupa, es mas probable que el efecto del alginato sódico sobre los parámetros de color, están mas relacionados con la fuente de calcio con la que gelifica, puesto que pueden formarse diferentes tipos de redes alginato-calcio que pueden reflejar la luz de diferente forma (Montero y col., 2000), de manera que el incremento de la luminosidad en reestructurados de pescado se correlaciona bien con la presencia de iones de calcio.

VI.2. EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA

Al igual que en el caso anterior se llevaron a cabo una serie de estudios preliminares para determinar la forma mas adecuada de incorporación de la MTGasa. Variables en este estudio fueron: la temperatura empleada en la elaboración de los reestructurados, el tamaño de partícula, el método de procesado y la calidad funcional de la proteína del músculo. Todo esto condicionarán las propiedades mecánicas y la capacidad de ligar agua de los modelos de reestructurados.

Los estudios preliminares se llevaron a cabo, bien aplicando un periodo de asentamiento de $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, o bien aplicando un periodo de asentamiento previo de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 30 min y posteriormente a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Se pretende en todo momento no superar los 30°C ya que la idea de la presente Memoria es adecuar el proceso de gelificación en frío de tal forma que sea posible obtener reestructurados modelo que puedan servir de base para la posterior elaboración productos con aspecto de crudo. En este sentido se tuvo en cuenta que la actividad de la enzima está descrita entre los 0°C - 70°C (Motoki y Seguro, 1998; Ajinomoto, 2009) por lo que ambas temperaturas de estudio se encuentran dentro de este rango de actividad. Con la aplicación de 30°C , se consigue estar más cercanos a la temperatura óptima de actuación de la enzima, que es considerada alrededor de 50°C (Mugumura y col., 1999; Ruiz-Carrascal y Regenstain, 2002; Ajinomoto, 2009), sin generar cambios significativos sobre el aspecto del músculo crudo, que se producían a temperaturas superiores. Estos estudios preliminares se llevaron a cabo considerando dos tamaños de partícula diferentes derivados de dos métodos distintos de procesado, el primero una partícula muy pequeña mediante homogeneización en máquina tipo “cutter” y el

segundo constituido por trozos pequeños de alrededor de 20.0 mm elaborado en mezcladora.

De estos estudios se concluyó que a ambas temperaturas y con un tamaño de partícula de 20.0 mm, la adición de MTGasa dentro de los límites estudiados (Apartado V.2.1, Tabla 1), incrementaba las propiedades mecánicas de los reestructurados, efecto que ha sido comprobado por numerosos autores (Seki y col., 1990; Agasami y col., 1995; Guilleland y col., 1997; Kurahisi y col., 1997; Lee y col., 1997; Kilic y col., 2003; Uresti y col., 2004; Beltrán-Lugo y col., 2005; Carballo y col., 2006; Cofrades y col., 2006; Moreno y col., 2008). Sin embargo, la capacidad de retener agua no se vio condicionada por la incorporación de MTGasa en este tipo de reestructurados (Apartado V.2.1.1, Tabla 2). A este respecto, existen discrepancias entre diferentes autores, que pueden ser debidas al diferente tipo de producto elaborado, a las diferentes condiciones de procesado empleadas, a la concentración del enzima, etc. (Kuraishi y col., 2001; Fisher, 1999; Kerry y col., 1999; Beltrán Lugo y col., (2005); Cofrades y col., 2006; Moreno y col., 2008).

Cuando se elaboraba un modelo reestructurado de tamaño de partícula fino (<1.0mm) mediante el procedimiento de homogeneización en “cutter”, se observó un mayor número de cambios significativos (color, propiedades mecánicas y propiedades ligantes de agua) que no lo fueron con un tamaño de partícula mayor (Apartado V.2.1, Tablas 2 y 4), debido muy posiblemente a la mayor interacción entre proteína-enzima como consecuencia del mayor proceso de homogenización. Por otra parte, cuando se aplica un periodo de asentamiento de 30°C durante 30 min, las propiedades físico-químicas son modificadas en mayor medida en comparación con lo que ocurre cuando la temperatura de asentamiento era de 4°C durante 24 horas, por lo que cabe la posibilidad de que exista una mayor actividad de la enzima al encontrarse ésta cercana a su temperatura óptima de actuación (Mugumura y col., 1999; Ruiz-Carrascal y Regenstein, 2002; Manual Ajinomoto, 2009). En este tipo de reestructurados se observa un débil incremento en la tendencia a tonalidades amarillentas (b^*) al aumentar la concentración de MTGasa, independientemente de la temperatura de gelificación (Apartado V.2.1, Tabla 5). Las pérdidas por cocción se vieron aumentadas al aumentar la concentración de MTGasa por lo que nuevamente volveríamos a la discrepancia entre diversos autores, ya comentada con anterioridad, sobre la mayor o menor capacidad de ligar agua del complejo enzima-músculo. Los resultados obtenidos pueden inducirnos a pensar que como consecuencia del tipo de técnica empleada en la determinación de las

pérdidas por cocción (90°C/30 min), la combinación tiempo/temperatura parece inducir un mayor efecto sobre las proteínas desnaturalizándolas, haciendo que estas liberen el agua. En las muestras tratadas térmicamente, se observó una mayor dureza y firmeza (Apartado V.2.1, Tablas 6, 7 y 8) que coinciden con los resultados encontrados por otros autores (Hemansson, 1989; Rowe, 1989; Sakamoto y col., 1994; Tornberg, 2005). De estos estudios preliminares se desprende, por una parte, que el tamaño de partícula y el tipo de proceso condiciona el efecto de la enzima sobre las propiedades mecánicas de los reestructurados y por otra, que tanto con asentamiento inicial de 30°C durante 30 min como sin él, se obtienen reestructurados con aspecto de crudo y adecuadas propiedades mecánicas. La elección de una temperatura u otra, estará más relacionada con la rapidez con la que se desee que actúe la enzima que con las propiedades físico-químicas resultantes.

A la vista de los resultados obtenidos en los estudios preliminares, a continuación se llevaron a cabo una serie de estudios a fin de conocer la contribución de diferentes parámetros en la elaboración de los modelos reestructurados.

VI.2.1. Efecto de la Concentración de MTGasa y caseinato sódico.

La elaboración de reestructurados empleando MTGasa, acompañada o no de caseinato sódico, dio como resultado la obtención de reestructurados con apropiadas propiedades mecánicas si bien es cierto que la incorporación de MTGasa (1.0%), junto con caseinato sódico (1.5%), supone un incremento significativo tanto en la dureza como en la firmeza de los reestructurados, como ya había sido descrito en otros productos con anterioridad por Kurahisi y col. (1997) y O'Kennedy y Kelly (2000). Conviene reseñar que el caseinato sódico por sí mismo es capaz de aumentar la firmeza de los reestructurados (Apartado V.1.3, Tabla 4) aunque su efecto es considerablemente inferior al que presenta la MTGasa por sí misma. A este respecto, se sabe que la incorporación de MTGasa junto con caseinato sódico favorece la formación de enlaces ϵ -(γ -glutamil)lisina entre proteínas (Kurahisi y col., 1997), efecto que además se corresponde con una ultraestructura en forma de red proteica muy compacta (Beltrán-Lugo y col., 2005). Por otra parte, este aumento de enlaces ϵ -(γ -glutamil)lisina entre proteínas como consecuencia de la incorporación de MTGasa, o de MTGasa junto con caseinato sódico, también queda recogido en la Figura 2 del Apartado V.1.3, en la que se observa en ambos casos un incremento muy significativo de la cantidad de enlaces

covalentes (Ikura y col., 1980; Motoki y Nio 1983), mientras que cuando se añade caseinato sódico, sin incorporar MTGasa, aumentan los enlaces de tipo hidrofóbico y los puentes de hidrógeno. Sin embargo, estos enlaces no son diferentes a los que se encuentran en la muestra control, que únicamente contiene NaCl. Estos resultados estarían en concordancia con lo indicado por Imm y Regestein (1997) que afirmaron que cuando se incorporan caseínas a una dispersión de proteínas miofibrilares no se produce un claro aumento de los enlaces hidrofóbicos. Por medio del análisis de electroforesis se constató que la incorporación de MTGasa supuso un descenso en la densidad de la banda de la cadena pesada de la miosina a la vez que un aumento de la banda correspondiente a los polímeros que no entran en el gel “resolving” (Lee y col., 1997).

En numerosas ocasiones a lo largo de la presente Memoria, se ha comentado la diversidad de opiniones de diferentes autores sobre la capacidad de mejorar la capacidad de retención de agua de la MTGasa. En el presente estudio se ha observado que la incorporación de MTGasa a músculo de merluza (*Merluccius capensis*) mejora por sí misma, aunque de forma leve, la CRA, mientras que al incorporarla junto con caseinato sódico, la CRA aumenta considerablemente en comparación con la muestra control que no contiene a ninguno de las dos sustancias (Apartado V.1.2, Tabla 4). Estos resultados coinciden con los expuestos por Kuraishi y col. (2001) y Fisher (1999) quienes constataron la capacidad de la MTGasa de retener agua.

VI.2. 2. Efecto de la calidad de la materia prima y tamaño de partícula.

La calidad de la materia prima empleada en la elaboración de los reestructurados de músculo de pescado es un factor de suma importancia, sobre todo para la industria pesquera, dado que podría dar salida a una gran cantidad de restos procedentes del fileteado de numerosas especies nobles con los que podría elaborarse productos de mayor valor añadido tras un adecuado proceso de transformación y siempre que las condiciones higiénicas y sanitarias de dichos restos así lo permitan (Borderías y Pérez-Mateos, 1996; Borderías y col., 2005, Moreno y col, 2009b) Por otra parte, esta forma de proceder supondría una reducción importante de desperdicios por partes de la industria transformadora que por lo general son eliminados de formas no siempre económica y con el correspondiente beneficio medioambiental (Documento Cotec, 1995).

La calidad de la materia prima es considerablemente importante ya que está directamente relacionada con la calidad de la proteína, lo que puede condicionar las propiedades fisicoquímicas del reestructurado a elaborar. El efecto del tamaño de partícula y tipo de procesado son factores a tener en cuenta a la hora de elaborar reestructurados.

El tamaño de partícula a partir del que se elabora un reestructurado tiene gran importancia dado que va a dar lugar a una textura más o menos fibrosa o a un producto de textura fina con menos estructura. De esta forma un reestructurado elaborado mediante homogeneización en “cutter” con tamaño de partícula fino, podría servir de base para elaborar un producto de textura homogénea y consistente, mientras que si se conserva la fibra muscular más o menos intacta, la textura será más similar a la del músculo de forma natural, y por ello mas adecuada dependiendo de las características que se pretenda conferir al producto final. Indudablemente, las propiedades fisicoquímicas de ambos modelos de reestructurados serán diferentes.

Las propiedades mecánicas de los reestructurados elaborados a partir de músculo merluza (*Merluccius capensis*) indican que la calidad de la materia prima es una propiedad de suma importancia a la hora de reestructurar trozos de músculo; es decir, una calidad superior de la proteína miofibrillar, da lugar a reestructurados de superior firmeza (Apartado V.2.1.2, Tabla 1). En este sentido Katayama y col., (2006) llevaron a cabo una experiencia en salchichas elaboradas con músculo de cerdo de dos calidades diferentes y concluyeron que la materia prima inicial condicionaba la calidad del producto final. Estos resultados, hacen suponer que la MTGasa requiere de proteínas de cierta calidad funcional para poder actuar. Sin embargo, en los resultados obtenidos en este trabajo, al reestructurar mediante procesado por homogeneización en “cutter”, la calidad de dicha materia prima y por tanto de la proteína miofibrillar deja de ser tan importante (Apartado V.2.1.2, Tabla 2). Este hecho puede deberse a que como consecuencia de un intenso proceso de homogenización de las proteínas con la MTGasa la interacción proteína-proteína se ve mas facilitada en comparación con lo que ocurre con los reestructurados elaborados con trozos de músculo, donde únicamente la proteína de la superficie de dichos trozos es susceptible de interactuar con la MTGasa y formar enlaces ϵ -(γ -glutamil)lisina entre ellas. Por otra parte, el mayor grado de homogenización, da lugar a una mayor solubilización de las proteínas debida al contenido en NaCl. A este hecho habría que sumar la capacidad de la transglutaminasa endógena (TGasa) como inductora de geles “tipo suwari”, lo que contribuye a

comunicar propiedades mecánicas adecuadas en el reestructurado (Seki y col., 1990; Motoki y Seguro, 1998, Benjakul y Visessanguan, 2003). En los modelos de reestructurados de tamaño de partícula fino, la dureza y la firmeza no se vieron influidos por la calidad de la materia prima ($p > 0.05$) hasta las 48 horas de su elaboración ($p < 0.05$). Este hecho puede ser debido a la existencia de un mayor grado de agregación de las proteínas miofibrilares, las cuales van perdiendo agua y se solubilizan menos, haciendo que la firmeza del músculo se incremente (Tejada, 2001). Los resultados anteriores sugieren, que la calidad a partir del cual se elabora el reestructurado no parece ser un factor limitante en su elaboración a partir de músculo de merluza, dado que independientemente de ésta, es posible obtener reestructurados de distinto tamaño de partícula y apropiadas propiedades mecánicas empleando para ello MTGasa a concentración del 1.0%.

El análisis de electroforesis en muestras con distinta calidad de materia prima a los que se adicionaba MTGasa, revelaron que la densidad de la banda de la cadena pesada de la miosina (MHC) disminuía en un grado muy similar tanto en músculo de buena calidad como en el de baja calidad, lo que además se correspondía con un aumento en la intensidad de las bandas de elevado peso molecular (polímeros que no entran en el gel “resolving” de electroforesis) al actuar la MTGasa (Apartado V.2.1.2, Figura 2). En este sentido, en el estudio ya comentado llevado a cabo por Katayama y col. (2006) sobre músculo de cerdo de diferentes calidades, se encuentran resultados muy similares a los anteriormente expuestos, por lo que cabría pensar que el grado en que se produce la polimerización de las proteínas es independiente de la calidad de dicha proteína. Por otra parte, tanto la calidad de la proteína como el tamaño de las partículas a partir de los cuales se elaboran los reestructurados, afectan a la capacidad de retener agua (CRA). Al determinar la actividad residual de la enzima (Apartado V.2.1.2, Figura 1) y compararla con la evolución de la CRA a lo largo del tiempo (Apartado V.2.1.2, Tabla 3) se observó que existe un tendencia de la CRA a aumentar o a mantenerse constante según la enzima va actuando. Este hecho parece indicar que la formación de enlaces ϵ -(γ -glutamil)lisina debidos a la acción de la MTGasa influye aunque moderadamente sobre la CRA, tal como afirmaron Téllez-Luis y col. (2002), quienes además indicaron que el efecto de la concentración de NaCl en un reestructurado es más determinante que la cantidad de MTGasa añadida sobre la capacidad de retener agua. En este sentido, Hans y col. (2009) afirmaron que como

consecuencia de la formación de la red proteica debida a la acción de la MTGasa, las moléculas de agua pierden movilidad quedando más retenidas en la dicha red.

VI.2.3. Influencia de la variación del pH del músculo

Otro de los factores estudiados a la hora de elaborar un reestructurado fue el pH, con un doble objetivo, por una parte el de reducir el desarrollo de microorganismos aumentando los periodos de conservación en refrigeración y por otro estudiar el efecto en sistemas modelos que van a servir para hacer productos reestructurados que por su naturaleza tengan bajo pH, como es el caso de productos escabechados. Su estudio supone un reto tecnológico dado que pese a que la actividad de la MTGasa no se ve afectada entre valores de pH de 4-9 (Ajinomoto, 2009) y tampoco por la concentración de NaCl (Motoki y Seguro, 1998; Ramírez y col., 2006), la funcionalidad proteica si se va a ver modificada (Shikha y col., 2006; Mohan y col., 2007) y por ende la capacidad de gelificación de dichas proteínas.

En principio, los reestructurados elaborados a pH 6.8, que se corresponden con el pH que presentaba la materia prima antes de ser modificado éste, tuvieron una vida útil de 7 días ($>10^6$ UFC/g, BOE, 1991) en conservación en estado refrigerado a 5°C, mientras que los reestructurados elaborados reduciendo el pH hasta 6.0 (empleando para ello una solución de ácido cítrico al 60%) prolongaron su vida útil durante periodos superiores a los 14 días, en las mismas condiciones de conservación. Sin embargo, las propiedades mecánicas se vieron considerablemente afectadas por la reducción del pH de la masa a partir de la cual se elabora. En este sentido, se observó que la fuerza de ligazón fue significativamente superior en los reestructurados elaborados a pH 6.8 que en los reestructurados elaborados a pH 6.0 (Apartado, V.1.2.3, Tablas 5 y 6). Este hecho es debido a que cuando el pH se acerca al punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares (alrededor de pH 5), estas pierden su carga, por lo que se agregan y pierden capacidad de retener agua (Shikha y col. 2006, Mohan y col., 2007), lo que además se refleja en el hecho de que desde un punto de vista sensorial estos modelos resultan ser reestructurados muy exudativos y de pobre consistencia.

El efecto del pH sobre la proteína, hace que los reestructurados posean inferiores valores CRA como ya se ha comentado, pero además el aumento en la concentración de MTGasa no mejora dicha capacidad (Apartado V.2.1.3, Tabla 3) pese a que la actividad de la enzima se la supone efectiva en un amplio rango de pH (4-9) (Ajinomoto, 2009).

Dada la cercanía al punto isoeléctrico de las proteínas cuando se trabaja a pH 6, estas se encuentran mucho más agregadas y la repulsión entre sus filamentos es considerablemente baja de tal forma que la posibilidad de ligar moléculas de agua entre dichos filamentos es igualmente escasa (Offer y Knight, 1988).

VI.2. 4. Influencia de la proporción de sal en las propiedades fisicoquímicas de los reestructurados

Para estudiar la influencia del contenido en sal sobre las propiedades fisicoquímicas de los modelos de reestructurados empleando MTGasa en dos concentraciones diferentes (0.5-1.0%), se elaboraron modelos de reestructurados que contenían tres niveles de cloruro sódico (0.5%, 1.5% y 4.0%) que podrían emplearse en la elaboración de diversos tipos de productos reestructurados como pueden ser: bajos en sal, de contenido normal o de elevada concentración destinados a obtener productos salados, ahumados etc.

Enlazando con los resultados anteriores, cabe indicar que si con pH 6.0 los reestructurados poseen pobres propiedades fisico-químicas, comparados con aquellos otros elaborados a pH 6.8, el aumento de la concentración de NaCl hasta el 4.0% contrarresta en parte dicho efecto negativo consiguiéndose mejorar dichas propiedades (Apartado, V.1.2.3, Tablas 5 y 6). Sin embargo, cuando la concentración de NaCl es 0.5% o 1.5%, la fuerza de ligazón está estrechamente relacionada con el pH, y dicho contenido en NaCl no es suficiente para facilitar la gelificación de las proteínas dado que las proteínas están muy agregadas a pH 6 (Ham, 1972; Offer y Knight, 1988).

Un hecho significativo a tener en cuenta es que a pH 6.8, el incremento de la concentración de sal por encima del 1.5% hace que las propiedades mecánicas se vean comprometidas. En este sentido tanto Kurahisi y col. (1997) como Jiménez-Colmenero y col. (2005) han indicado que la concentración de sal favorece la solubilidad de las proteínas. Este hecho las hace más susceptibles para interactuar con la MTGasa y por ello formar enlaces ϵ -(γ -glutamil)lisina entre ellas. Sin embargo, cuando se incorporan concentraciones elevadas, 4% de NaCl, las propiedades mecánicas resultan ser inferiores, lo que indica que de alguna forma esta concentración de NaCl interfiere con la acción de la MTGasa o hace que las proteínas estén tan solubilizadas que a la MTGasa le resulte difícil formar dichos enlaces entre ellas. Este hecho hace pensar que el empleo de un 4% de NaCl es una concentración desfavorable a la hora de trabajar con la MTGasa, pese a que la actividad de la MTGasa es considerada como independiente

de la concentración de NaCl (Kuraishi y col., 1997; Téllez-Luis y col., 2002; Uresti y col., 2004; Ajinomoto, 2009). La mayor parte de estos autores basaron sus trabajos en la sustitución de parte de la concentración de NaCl mediante la incorporación de MTGasa con el fin de mejorar el efecto negativo de la reducción de sal sobre las propiedades físico-químicas y ninguno de estos estudios estaba enfocado a la obtención de reestructurados con porcentajes elevados de NaCl como es el caso del trabajo que nos ocupa.

Por otra parte, el aumento de la concentración de NaCl, en los reestructurados, generó un cierto aumento de la densidad de la banda de la MHC. Esto puede deberse al hecho de que el exceso de sal genera repulsión entre los miofilamentos de las proteína miofibrilares (Hamm, 1972) y por ello la miosina se encuentra más despolarizada y su agregación revista más dificultad. Posiblemente, es debido a esto que la firmeza de dichos reestructurados sea inferior a la que presentan aquellos elaborados con menor porcentaje de sal, dado que retiene más agua, generando separación entre las colas de la miosina y dificultando la polimerización de las proteínas (Offer y Knight, 1988).

Sobre estos modelos de reestructurados también se llevó a cabo un análisis sensorial (Apartado V.2.1.3, Tabla 8). Para ello, las muestras fueron cocinadas a la plancha y se constató que la diferencia en las propiedades mecánicas observadas en crudo por medio de las pruebas mecánicas no se correspondía fielmente con los resultados de textura que dieron los catadores. Por tanto parece que con el calentamiento se forman otro tipo de enlaces hidrofóbicos y/o covalentes más fuertes (probablemente disulfuro), que enmascaran las diferencias observadas en las propiedades mecánicas determinadas en crudo. Las características sensoriales, acuosidad, dureza y succulencia de las muestras estuvo muy relacionada con la concentración de NaCl, de tal forma que la mayor acuosidad (como característica negativa de soltar la fase líquida al comienzo de la masticación) se relacionó con las muestras con menor contenido en sal y al contrario ocurre con la dureza y la succulencia (como característica positiva de ligar agua hasta el momento de la deglución).

Por otra parte el efecto de las concentración de NaCl sobre la CRA hace que ésta se vea favorecida y en general el efecto es más marcado cuando la concentración de MTGasa es del 0.5% y no del 1.0% (Apartado V.2.1.3, Tabla 3). A este respecto, la capacidad del NaCl de mejorar la capacidad de retener agua, e incluso disminuir las pérdidas por cocción, han sido constatadas por diversos autores (Sofos, 1986, Moon y col., 2008; Siró y col., 2009).

VI.2. 4. Adición de la MTGasa a surimi para reforzar sus propiedades gelificantes

El empleo de MTGasa fue estudiado también en la elaboración de geles a partir de *surimi*. Su incorporación se combinó junto con la aplicación de diferentes tratamientos a fin de conseguir mejorar las propiedades fisicoquímicas de los geles obtenidos con un *surimi* de pobre calidad elaborados a partir de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Se conoce que la MTGasa actúa mejor a temperaturas cercanas a su temperatura óptima, que ronda los 50°C (Mugumura y col., 1999; Ruiz-Carrascal y Regenstain, 2002; Manual Ajinomoto, 2009), pero dado que se pretenden desarrollar modelos de reestructurados con aspecto de crudo, el primer paso fue constatar que en el *surimi* de calamar gigante no sufría cambios en su aspecto durante un periodo de asentamiento a 30°C durante 1h. Posteriormente se pensó que quizás la exposición durante 1 hora a esa temperatura ocasionaría un aumento significativo de carga microbiana, disminuyendo su periodo de conservación, lo que sería un punto crítico, sobre todo teniendo en cuenta que estos modelos servirían para el desarrollo de productos comercializados en estado refrigerado. Por esta razón se llevó a cabo un recuento de la carga microbiana en los geles de *surimi* sometidos a distintos tratamientos y se comprobó que con el periodo de asentamiento a 30 °C no se producía un aumento significativo de la misma respecto a las demás muestras (Apartado V.2.2.1, Tabla 2). Dado que se trabaja con músculo de cefalópodos, que en general poseen alta actividad proteolítica, se tuvo en cuenta que a dicha temperatura de 30°C durante 1 hora no se produce autólisis de proteínas debido a la acción de las enzimas proteolíticas, ya que por una parte a dicha temperatura su actividad es muy reducida (Konno y col., 2003; Dublán-García, 2006) y por otra a que gran parte de dichas enzimas existentes en el músculo son eliminadas durante el proceso empleado en la elaboración del *surimi* (Konno y col., 2003; Sánchez-Alonso y col., 2007b).

Por otra parte, en este estudio, se ensayó la aplicación de altas presiones a 300 MPa, dado que existen referencias (Lanier y col., 2005) que sugieren que las altas presiones pueden modificar ligeramente la estructura proteica para que de esta forma la acción de la MTGasa sea mayor. Además se constató que esta magnitud de presión no originaba cambios de color en el *surimi* con el objetivo de poder preparar modelos con aspecto de crudo.

La incorporación de MTGasa para elaborar geles de *surimi* de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) gelificados mediante asentamiento a 30°C durante 1 hora y posteriormente a 5°C durante 24 horas, no supone modificaciones de color, aunque como consecuencia del tratamiento térmico a 90°C y/o tratamiento de altas presiones se observa un ligero incremento en la luminosidad (L^*) de los geles. Este hecho, según algunos autores, es debido a que como consecuencia del aumento de temperatura se liberan pigmentos de las proteínas que podrían ser los responsables de dichos cambios en el color (Uresti y col., 2004; Benjakul y col., 2008).

Las propiedades mecánicas de los geles de *surimi* con o sin MTGasa añadida se ven determinadas por los distintos tratamientos de asentamiento empleados. A 5°C durante 24h se obtienen geles de menor firmeza comparados con los obtenidos con aquellos tratamientos que previamente habían tenido un periodo de asentamiento de 30°C durante 1 hora. Por otra parte, el empleo de tratamiento térmico (90°C durante 30min) y de altas presiones (300Mpa durante 30min a 15°C) tras el periodo de asentamiento da lugar a geles con mayor dureza y fuerza de gel (Apartado V.2.2.1, Tabla 3) que aquellos otros sin tratamiento de altas presiones. El empleo del tratamiento térmico a 90°C supone un incremento significativo en las propiedades mecánicas estudiadas en comparación con los modelos sometidos a asentamiento de 30°C y a 30°C más altas presiones. Efectos similares fueron encontrados por Cárlez y col., (1995) y Okamo y col., (1995) quienes consideran que al aplicar un tratamiento térmico a los geles de *surimi* se obtienen geles mucho más fuertes que con cualquier otro tipo de tratamiento aplicado. Este hecho puede ser atribuido a que, como consecuencia del tratamiento térmico, las proteínas se despliegan haciendo posible una mayor interacción proteína-proteína en la red proteica, lo que constituye un gel considerablemente más estable (Heremans y col., 1997). Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) muestran que los geles sometidos a tratamiento de altas presiones poseen una ultraestructura en red proteica mejor formada que los que no reciben este tratamiento (Apartado V.2.2.1 Figuras 1 vs 4; 2 vs 5 y 3 vs 6). Observando las microfotografías obtenidas por SEM, el tratamiento térmico no parece generar cambios evidentes en la ultraestructura. Con el tratamiento de altas presiones se originan geles con mayor firmeza y deformación a ruptura; además la combinación de altas presiones y de tratamiento térmico, da lugar a geles de superiores propiedades mecánicas. Este efecto de las altas presiones fue observado también por Uresti y col., (2004b) en geles elaborados con fletán del Pacífico (*Atheresthes stomias*).

Independientemente del tipo de tratamiento aplicado a los geles derivados del *surimi* de calamar gigante, la incorporación de MTGasa da lugar a un aumento de dichas propiedades mecánicas. Sin embargo no se observan diferencias significativas entre los geles elaborados con 0.5% ó 1.0%, por lo que podría indicarse, que la adición de 0.5% de MTGasa es una concentración apropiada para mejorar las propiedades mecánicas de dichos geles. Por otra parte, la influencia de las altas presiones sobre la actividad de la MTGasa en músculo ha sido estudiada por diferentes autores y entre ellos existen ciertas discrepancias al respecto. Algunos autores consideran que la MTGasa es sensible a las altas presiones, por lo que la enzima no podría estar involucrada en los procesos de gelificación posteriores a dicho tratamiento (Shoji y col., 1990). En los resultados del presente estudio, se observa un incremento ($p < 0.05$) en la dureza y en la firmeza al aumentar la concentración de la enzima y someter posteriormente la muestra al tratamiento de altas presiones. Teniendo en cuenta la falta de efecto sobre las propiedades mecánicas al aumentar la concentración de MTGasa entre 0.5-1.0%, se podría concluir que la actividad residual de dicha enzima después del periodo de asentamiento a 30°C, favorecería la agregación de las proteínas desplegadas por medio de las altas presiones (Montero y Pérez-Mateos, 1997; Pérez-Mateos y col., 1997; Lanier y col., 2005) durante el posterior asentamiento a 5°C. Esto estaría de acuerdo con lo estudiado por algunos autores (Nonaka et al., 1997; Ashie y Lanier, 1999) en relación a que a presiones entre 100 y 300MPa la MTGasa no se vería afectada y podría continuar activa durante el periodo de asentamiento posterior. La cohesividad de los geles de *surimi* no se ve afectada por los tratamientos de altas presiones, ni por el tratamiento térmico (Uresti y col., 2006), pero concentraciones superiores al 0.5%, de MTGasa la disminuye, por lo que se considera que esa cantidad no debe ser sobrepasada ya que afecta negativamente a uno de los principales parámetros de calidad del los geles de *surimi*. Así como en los reestructurados de músculo de merluza (*Merluccius capensis*), el efecto de la MTGasa sobre la capacidad de ligar agua no es muy claro. En los geles de *surimi*, se observó que la incorporación de MTGasa al 0,5% da lugar a un aumento en la CRA comparado con los geles control que no la contenían. Esta capacidad de mejorar la CRA de la MTGasa ha sido descrito por Kuraishi y col. (2001) y Fisher (1999), sin embargo, un aumento superior al 0.5% de MTGasa no produce mejoras en la CRA. En este sentido, la falta de efecto observada al aumentar la concentración de MTGasa por encima del 0.5%, sobre la CRA y parte de las propiedades mecánicas, fue también observada en reestructurados elaborados con

trozos de músculo de merluza. Sin embargo, algunos autores (Fernández-Martín y col., 1998; Uresti y col., 2004) han descrito que al aplicar tratamiento de altas presiones la CRA se incrementa y dicho efecto es más marcado cuanto mayor es la cantidad de MTGasa añadida. Pérez-Mateos y col. (1997) y Lanier y col. (2005), indicaron que como consecuencia del empleo de altas presiones se produce un despliegue de las moléculas de actomiosina, que daría lugar a un aumento de la banda de la cadena pesada de la miosina (MHC).

VI.3. EFECTO DE LA CONSERVACIÓN EN ESTADO REFRIGERADO Y CONGELADO DE LOS REESTRUCTURADOS ELABORADOS CON ALGINATO SÓDICO O TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA

En este apartado, se recogen una serie de estudios de conservación, tanto de modelos de reestructurados elaborados mediante gelificación con alginato sódico como con MTGasa. Se ha estudiado en ellos el comportamiento en estado refrigerado o congelado de dos modelos con MTGasa y dos con alginato sódico, uno de ellos con procesado por homogeneización en “cutter” y por tanto de partícula fina y otro a base de trozos de mayor tamaño procesado en mezcladora.

Por otra parte, y con el fin de estudiar la influencia sobre la oxidación proteica y lipídica y sus consecuencias sobre las propiedades físico-químicas, se han elaborado dos nuevos tipos de reestructurados con músculo de merluza (*Merluccius merluccius*) y con músculo de trucha arcoiris (*Onchorynchus mykiss*)

En este apartado, los efectos de la conservación en refrigeración y en congelación se analizarán por separado.

VI.3.1. Efecto de la conservación en estado refrigerado.

Para estudiar el efecto de la conservación en estado refrigerado se elaboraron reestructurados de diferente tamaño de partícula gelificados con el empleo de alginato sódico y MTGasa. Por otra parte, se emplearon diferentes materias primas, como músculo de merluza de la especie *Merluccius capensis* y músculo de merluza de la especie *Merluccius merluccius* y de trucha (*Onchorynchus mykiss*).

VI.3.1.1. Efecto del procedimiento de reestructuración de músculo de merluza (*Merluccius capensis*) en la conservación en estado refrigerado.

Durante el periodo de conservación en estado refrigerado se observó que la evolución de la carga microbiana se incrementa a partir de los 7 días de conservación en refrigeración (Apartado V.3.1, Tabla 3), aunque hasta los 14 días los recuentos no superan los valores que marcan las normas microbiológicas para este tipo de productos (10^6 UFC/g) (BOE, 1991). Las muestras elaboradas con un tamaño de partícula fino por homogeneización en “cutter”, independientemente de que se elaboren con MTGasa o alginato sódico, presentan recuentos inferiores a los que presentan aquellas otras elaboradas con tamaño de partícula mayor. Esto puede deberse a una mejor penetración del NaCl añadido en la elaboración del producto que puede controlar parcialmente el crecimiento microbiano como consecuencia del mayor grado de homogenización. No existen diferencias en el recuento microbiano de la muestra con 4% de sal en relación con el resto que sólo poseen 1,5%. A este respecto, O'Connor y col., (1993) y Sallam y Samejima (2004) indicaron que la incorporación de concentraciones de NaCl de hasta el 3.0%, sin combinarla con otros aditivos, no produce un efecto significativo en la reducción del crecimiento de microorganismos aerobios.

El efecto de la incorporación de MTGasa y alginato sódico sobre las propiedades físico-químicas ha sido estudiada por gran cantidad de autores (Ramírez y col., 2000; Suklim y col., 2004, Vachá y col., 2006; Vieira, 2000, Gao y col., 2001; Montero y Pérez-Mateos, 2002; etc). Por lo general todos estos autores coinciden al reseñar que con la incorporación de uno u otro ingrediente se consiguen mejorar las propiedades mecánicas de los reestructurados. Durante los primeros 14 días del periodo de conservación en estado refrigerado, tanto en las muestras elaboradas con MTGasa como con alginato sódico e independientemente del tamaño de partícula, continúan aumentando su firmeza (Apartado V.3.1, Figuras 3 y 5) esto puede deberse por una parte a la actividad residual de la MTGasa, o a la capacidad del alginato de gelificar según los iones calcio van entrelazándose entre los bloques de ácido gulurínico de las cadenas de alginato. Es significativo el hecho de que esta firmeza de los modelos elaborados con alginato mediante el procedimiento de homogeneización en “cutter” (partícula pequeña) es superior a la que presentan los elaborados con MTGasa, mientras que en los modelos elaborados con trozos grandes ocurre al contrario. El aumento de la firmeza durante el almacenamiento en estado refrigerado cuando se incorpora MTGasa, también ha sido descrito en músculo de ternera (Cofrades y col, 2006). Este aumento de

la firmeza es consecuencia por una parte, del efecto de la MTGasa y del alginato, y por otra de la capacidad de la transglutaminasa endógena de gelificar la proteína miofibrilar, parcialmente solubilizada, a temperaturas inferiores a 40°C, como consecuencia de la incorporación de sal (Benjakul y Visessanguan, 2003). Además debe tenerse en cuenta que durante el periodo de conservación en estado refrigerado se van a establecer enlaces de hidrógeno que van a ser en parte responsables de ese aumento en la firmeza del reestructurado en crudo (Kim et al., 2004).

Como consecuencia de la aplicación de un tratamiento térmico a 90°C se observa que la firmeza en todas las muestras, bien sean elaboradas incorporando alginato o bien MTGasa, e independientemente del tamaño de partícula empleado, aumenta debido principalmente al establecimiento de enlaces covalentes entre las proteínas (Sakamoto y col., 1994). El efecto del calor sobre dichas proteínas es el responsable de los cambios en textura de los productos cocinados, como consecuencia de la desnaturalización proteica, disociación de las proteínas miofibrilares, agregación proteica y la formación de enlaces de tipo hidrofóbico (Gerrard, 2002; Tornberg, 2005; Kong y col., 2008). Además de la formación de enlaces, con el calor, las proteínas se desnaturalizan y se agregan, debido a la destrucción de membranas celulares (Rowe, 1989) de tal forma que todo el sistema se desorganiza. Por otra parte cuando se calientan a 90 °C las muestras conservadas en estado refrigerado, aumenta la firmeza durante 7-14 días, según se trate de los modelos formados a base de trozos o a partir de músculo homogeneizado. Este aumento de la firmeza es también debido al establecimiento de enlaces hidrofóbicos (Tornberg, 2005) que se forman durante el calentamiento a temperaturas superiores a los 50-60°C y tienden a ordenar la red proteica.

Durante el proceso de conservación en refrigeración, no se observó presencia de exudado por parte de los reestructurados. Sin embargo, cuando se aplica el tratamiento térmico a temperaturas cercanas a los 100 °C, se producen pérdidas por cocción que tienden a ser superiores según aumenta el periodo de conservación, si bien no existen diferencias significativas a lo largo del periodo de conservación en refrigeración (Apartado, V.3.1, Figura 5). Los lotes con alginato incorporado desprenden menos exudado a la cocción que las muestras a las que se les había añadido MTGasa. En este sentido, varios autores han indicado que la incorporación de esta enzima no hace que la muestra tenga más capacidad de ligar agua (Kerry et al., 1999; O'Kennedy, 2000; Cofrades y col., 2006). Sin embargo según se observa en las microfotografías de SEM, los geles elaborados con MTGasa, poseen una red proteica más ordenada que las de

alginato a pesar de que su capacidad de ligar agua es inferior. La capacidad de retención de agua es significativamente mayor en las muestras homogeneizadas por procesado en "cutter", probablemente debido a que los ingredientes gelificantes, alginato y MTGasa, llegan a combinarse mejor con las proteínas y pueden establecer una red proteica más adecuada. Además con la homogeneización, la proteína se solubiliza más eficazmente e independientemente de los ingredientes que se incorporen, la proteína puede asentarse más fácilmente por acción de la transglutaminasa endógena

La luminosidad y la tonalidad amarilla (b^*) de los modelos de reestructurados se incrementaron ligeramente a lo largo del periodo de conservación en refrigeración pero no en todos los casos de forma significativa (Apartado V.3.1, Tabla 5). Este efecto parece ser algo más marcado en los reestructurados elaborados con tamaño de partícula grueso. Dados estos resultados, cabría suponer que ni uno ni otro ingrediente producen cambios llamativos sobre el color durante periodos de conservación en refrigeración. Efectos similares fueron encontrados por Fagan y col., (2003) en porciones de distintas especies de pescado. Al someter estos reestructurados a tratamiento térmico de 90°C durante 10 min, tanto la luminosidad como la tendencia a la tonalidades amarillas aumentan ligeramente ($P < 0.05$), lo cual es esperable dado que el aspecto que presentan dichas muestras es de cocinado.

VI.3.1.2. Efecto de la conservación en estado refrigerado sobre la oxidación de los lípidos y las proteínas de reestructurados modelo elaborados con MTGasa.

Para llevar a cabo el estudio del efecto de la conservación en refrigeración de los reestructurados elaborados empleando MTGasa a partir de trucha (*Onchorynchus mykiss*) y merluza (*Merluccius merluccius*).

El desarrollo de sustancias como consecuencia de la oxidación primaria de los lípidos indicó que las muestras que poseen MTGasa presentan superiores valores ($p < 0.05$) que aquellas otras que no la contienen y además se observa una tendencia a aumentar hasta el día 3-4 de almacenamiento en refrigeración. Sin embargo, la determinación del contenido de peróxidos indica un incremento paulatino a lo largo de dicho periodo, alcanzado valores superiores aquellas muestras que contienen MTGasa (Apartado V.3.2, Figuras 1A-B y 3A-B). La incorporación de aceite de hígado de bacalao (como forma de incorporar triglicéridos) en la elaboración de reestructurados elaborados a partir de músculo de merluza da lugar a reestructurados mas oxidados (mayor índice de peróxidos) que aquellos otros que no lo contienen. Estos valores son

siempre inferiores a los que presentan los elaborados con trucha. En este sentido, Kellerby y col., (2006) observaron que se producía un incremento en la oxidación lipídica debido a que la MTGasa, al inducir la formación de enlaces entre las proteínas, genera a su vez cambios en la estructura de las mismas y concretamente sobre los lugares de unión del hierro. Este hecho, conlleva a que el hierro libre favorezca la oxidación de los lípidos. Por todo ello, los resultados parecen indicar que la incorporación de MTGasa podría estar favoreciendo los procesos de oxidación lipídica. Pese a lo anteriormente comentado, debe tenerse también en cuenta el efecto pro-oxidante de la sal (Rhee, 1999; Sallam y Samejima, 2004). Es significativo el hecho de que los reestructurados elaborados con merluza y MTGasa presenten valores de TBA-i muy similares a aquellos otros elaborados con trucha. Esto puede deberse a la existencia de ciertas interferencias del formaldehído formado en las muestras de merluza con los reactivos empleados en la determinación del TBA-i (Careche y Tejada, 1988)

Por otra parte, la incorporación de MTGasa da lugar a un aumento en la determinación de los grupos carbonilos de las proteínas comparados con aquellos otros reestructurados elaborados sin incorporar MTGasa. Este hecho sería indicativo de la oxidación de las proteínas tal como indican Steffensen y col. (2008), pero además el cambio en la conformación de las proteínas como consecuencia de la formación de enlaces entre ellas, puede hacer que los grupos amino de las mismas estén más expuestos a la acción de la MTGasa favoreciéndose por tanto la oxidación de las proteínas.

La adición de triglicéridos a los reestructurados elaborados con merluza, como posibilidad de elaborar un reestructurado enriquecido con ácidos grasos omega-3, presentan un valor ligeramente superior del índice de peróxidos. Pero se observó una menor cantidad de grupos carbonilo de las proteínas, indicativos de la oxidación de las mismas, lo que puede ser debido a que la mayor concentración en de α -tocoferol existente en ellos pueda controlar en cierta medida los procesos de oxidación. A este respecto, existen referencias que indican que la capacidad protectora del α -tocoferol así como de la astaxantina, presente de forma natural en el músculo de trucha, es considerablemente bajo (Baron y col., 2005).

En cuanto a las propiedades mecánicas, los resultados indican que la incorporación de MTGasa a los reestructurados elaborados tanto con trucha como con merluza o merluza adicionada de triglicéridos, alcanzan al final del periodo de almacenamiento en refrigeración valores muy similares, si bien es cierto que el mayor

contenido en grasa hace que el efecto de la MTGasa sobre la dureza sea apreciado más lentamente en el tiempo (Apartado V.3.2, Figura 2).

Por otra parte, la incorporación de MTGasa parece favorecer la capacidad de retener agua, la cual además mejora a lo largo del periodo de conservación, posiblemente como consecuencia de que al aumentar los enlaces entre proteínas, el agua queda más atrapada (Han y col., 2009). Estos resultados coinciden con los encontrados en el Apartado V.2.1.2 de la presente Memoria, aunque en este caso son mucho más evidentes dado que el periodo de almacenamiento ha sido considerablemente superior y porque la calidad de la materia prima es también diferente.

En este estudio se ha visto también que la incorporación de MTGasa, da lugar a un aumento de agregados de alto peso molecular (Apartado V.3.2, Figura 4) lo cuales además afectan a las propiedades mecánicas haciendo que estas aumenten como ya ha sido comentado con anterioridad (Christensen y col., 2008). Además según el análisis de inmuno-blotting frente a miosina se observa un mayor número de bandas de miosina en las muestras elaboradas con merluza, lo que sugiere un mayor grado de proteólisis de la misma. Este efecto parece tener un efecto positivo siempre y cuando sea limitado, sobre las propiedades mecánicas de los reestructurados, ya que parece facilitar la interacción entre proteínas.

VI.3.2.3. Efecto del procedimiento de reestructuración de músculo de merluza (*Merluccius capensis*) en la conservación en estado congelado.

A lo largo de este apartado, se van a comentar los cambios sufridos en los modelos de reestructurados elaborados con MTGasa y alginato sódico con diferente tamaño de partícula durante el almacenamiento en estado congelado, al igual que se hizo en el apartado VI.3.2.1.

Durante el periodo de congelación a -15°C durante 150 días, la evolución de la solubilidad proteica en NaCl al 5 % indica que en las muestras elaboradas con MTGasa apenas se modifica debido a que la proteína se agrega muy eficazmente al incorporar la MTGasa (Apartado V.3.3, Tabla 3). En las muestras con alginato incorporado, dicha agregación no fue tan eficaz, presentando valores más altos de solubilidad y por ello es posible observar, cierta agregación a lo largo del periodo de almacenamiento en congelación. Por otra parte este comportamiento puede ser ocasionado debido a fenómenos de cristalización (Tejada, 2001; Careche y col., 2002; Fagan y col., 2003; Beymer y Klaas, 2007; Geirsdottir y col., 2007) y al efecto del formaldehído formado a

partir del oxido de trimetilamina. Estos procesos de agregación no son tan evidentes en las muestras los reestructurados elaborados con trozos de músculo, donde la interacción de las proteínas con los ingredientes es inferior.

Las muestras analizadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) muestran redes proteicas mejor formadas en las muestras, con pequeño tamaño de partícula, tratadas con MTGasa que las que se habían elaborado con alginato, (Apartado V.3.3., Figuras 1A y 1C), lo que está de acuerdo con la evolución de la agregación observada, (Apartado V.3.3., Tabla 3) . En este sentido Gómez-Guillén y col. (2005) indicaron la formación de una red muy uniforme cuando se usa MTGasa. A lo largo de la conservación en estado congelado las microfotografías muestran numerosos orificios correspondientes a la formación de cristales de hielo extracelulares, siendo mayor dicha cristalización en el caso de las muestras elaboradas con alginato (Apartado V.3.3., Figuras 2A y 2B). Este hecho podría estar relacionado con el tipo de red que forma el alginato, que ocasiona una mayor fijación de las moléculas de agua. En las muestras elaboradas con trozos, la cristalización extracelular es mucho más marcada y además, se observan áreas en las que no existe formación de red proteica debido a que la proteína no se ha solubilizado y la fibra muscular mantienen su estructura (Apartado V.3.3., Figuras 3A y 3B).

Durante el proceso de congelación, se observó que la rancidez en estas muestras determinada por medio del índice de TBA evoluciona muy lentamente a lo largo de todo el periodo. En este sentido, Sánchez-Alonso y col (2007a) encontraron resultados muy parecidos la conservar filetes de merluza. Este hecho puede deberse al bajo contenido en lípidos de la merluza, alrededor del 1%. Aún con estos bajos valores, es posible observar que las muestras que contienen MTGasa presentan máximos a los 30 días de conservación, lo que en el caso de la muestra homogeneizada podría ser debido al mayor contenido en sal (Lee et al., 1997b; Sakai et al., 2004; Sallam and Samejima, 2004), pero no en la muestra elaborada con trozos que contiene una proporción de sal de 1,5%. (Apartado V.3.3., Figura 9). Esta predisposición al enranciamiento de las muestras que contienen MTGasa no ha sido descrita en la bibliografía, aunque en otro apartado de la presente Memoria (V.3.2) se llegó a conclusiones muy similares al respecto.

Durante el periodo de conservación en estado congelado la capacidad de retención de agua de los reestructurados disminuye, independientemente del tamaño de partícula con el que estén elaborados (Apartado, V.3.3, Figura 8). Este hecho está

relacionado con la agregación proteica y la pérdida de funcionalidad de las proteínas (Tejada, 2001; Careche y col., 2002; Fagan y col., 2003; Breyer y Klaas, 2007; Geirsdottir y col., 2007), lo que se relaciona por una parte con el aumento en la fuerza de ruptura que presentan dichos reestructurados, y por otra, con el hecho de que la formación y distribución de los cristales de hielo que se forman como consecuencia del proceso de congelación, dañan la estructura muscular favoreciendo las pérdidas de agua (Bevilacqua y col., 1979) al descongelar dando lugar a estructuras mucho más compactas. Por otra parte, los resultados de CRA indican que durante periodos de conservación en congelación prolongados los modelos elaborados incorporando MTGasa mediante procesado por “cutter” presentan más capacidad de retener agua. Este hecho puede ser debido a que el grado de interacción con las proteínas como consecuencia de la acción de la MTGasa es mucho mayor, mientras que en el caso del alginato, al interaccionar éste con los iones calcio se forma una red en la que pueden quedar retenidas las moléculas de agua aunque el tamaño de partícula sea más grande. Durante el periodo de conservación en congelación, la firmeza de las muestras aumenta en todos los modelos estudiados aunque los valores son más altos en las muestras homogeneizadas lo que se corresponde con una mejor red formada. Por el contrario, Benjakul y col., 2005 indicaron que en geles de surimi almacenados a -18°C durante 6 meses la firmeza de la muestra iba disminuyendo, atribuyendo este hecho al efecto de la Ca^{2+} -ATPasa. Además, Sánchez-Alonso y col. (2006) indicaron que geles de surimi con fibra de trigo añadida, no presentaban aumento de dureza durante un periodo de almacenamiento de 150 días a -20°C .

VII.CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

Tras haber desarrollado el objetivo principal de la presente Memoria consistente en el estudio de modelos de reestructurados elaborados a partir de músculo de pescado los cuales conservan su apariencia de crudo, y con distintas características y texturas, es posible llegar a las siguientes conclusiones:

Relativas al empleo de alginato sódico en la elaboración de productos reestructurados de músculo de merluza (*Merluccius capensis*).

1.- La incorporación en polvo de las sales cálcicas junto con el alginato sódico, fue de entre las estudiadas la elegida por la sencillez de su incorporación y por permitir una buena difusión de los iones calcio a fin de obtener gel alginato-calcio dentro de la matriz de proteínas miofibrilares.

2.- Se pueden elaborar modelos de reestructurados con características termoestables a baja temperatura (5°C) con adecuadas propiedades físico-químicas cuando se elaboran a base de músculo de merluza picada o troceada mediante la incorporación de 0.05- 0.5 % de alginato sódico junto con el aporte necesario de cloruro cálcico, en forma de polvo, como donante de iones calcio.

3.- La proporción de cloruro cálcico, como donante de iones calcio a una masa de músculo picado de merluza y alginato sódico condiciona notablemente las propiedades fisicoquímicas del reestructurado y debe ser alrededor del 0,1%

Relativas al empleo de transglutaminasa microbiana en la elaboración de modelos de reestructurados a partir de músculo de merluza (*Merluccius capensis*) o surimi de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

1.- La elaboración de modelos de reestructurados a base de músculo de merluza con diferente tamaño de partícula se puede llevar a cabo a temperaturas entre 4° y 30°C, cuando se adiciona transglutaminasa microbiana en concentración de hasta el 1% y suficiente cantidad de caseinato sódico (0.75- 1.5 %).

2.- La incorporación de caseinato sódico incrementa notablemente la actividad de la transglutaminasa microbiana (MTGasa) al incorporarla en el músculo de merluza, lo que se refleja en un aumento de las propiedades mecánicas de los reestructurados debido al aumento de enlaces de tipo covalente. Así mismo, la combinación de ambos favorece la capacidad de retención de agua.

3.- La calidad funcional de la materia prima, es un parámetro importante a considerar cuando se van a elaborar modelos de reestructurados a partir de pequeños

trozos de músculo. Sin embargo no es un factor limitante cuando los modelos se elaboran por proceso de homogeneización (partícula fina) como consecuencia de la mayor solubilización de las proteínas miofibrilares que se consigue con este proceso.

4.- La reducción del pH hasta 6, en las masas para elaborar reestructurados de merluza, a pesar de incrementar su vida útil, únicamente es viable si se incorporan elevadas concentraciones de NaCl (4%), ya que de otra forma, las propiedades fisicoquímicas disminuyen. Sin embargo, a pH fisiológico del músculo (pH 6.8) la incorporación de elevadas cantidades de NaCl dificulta la elaboración de reestructurados con propiedades fisicoquímicas adecuadas, independientemente de la concentración de MTGasa añadida (0.5-1.0%).

5.- La combinación de tratamientos de altas presiones (300 MPa) junto con la incorporación de MTGasa (0.5-1.0%) para elaborar geles a baja temperatura a partir de *surimi* de calamar de baja calidad, permite incrementar satisfactoriamente sus propiedades físico químicas.

Relativas al efecto de la conservación sobre reestructurados elaborados a partir de músculo de merluza (*Merluccius capensis*; *Merluccius merluccius*) y de trucha (*Oncorhynchus mykiss*).

1.- Los reestructurados modelo elaborados con distintas concentraciones de alginato sódico y MTGasa pueden ser conservados en estado refrigerado durante un periodo de hasta 14 días, durante el cual, las propiedades mecánicas se incrementan, sobre todo, en aquellos reestructurados elaborados con alginato sódico.

2.- Es posible obtener reestructurados modelo con adecuadas propiedades físico químicas, a partir de músculo de especies grasas, como es la trucha, basados en la gelificación en frío emplando MTGasa. Además, pueden obtenerse reestructurados modelo a partir de especies magras, como la merluza, enriquecidos con ácidos grasos ω -3, los cuales además son muy estables frente a los procesos de oxidación durante la conservación en refrigeración.

3.- Durante el periodo de almacenamiento en congelación, los reestructurados modelo elaborados mediante homogeneización (tamaño de partícula pequeña), con distintas concentraciones de alginato sódico y MTGasa se observa un incremento de la firmeza sobre todo a partir del segundo mes de conservación, fundamentalmente debido a los cambios acaecidos como consecuencia de la formación de grandes cristales de

helo. El aumento de la firmeza es menor en los modelos elaborados con transglutaminasa debido a que poseen una red mejor formada y por tanto más estable.

Having developed the main objective of the present Memory, which deals with the in the study of restructured fish models, while maintaining the raw fish muscle appearance, and different properties and textures, we have reached the following conclusions:

Regarding the use of sodium alginate in the elaboration of restructured hake muscle models (*Merluccius capensis*).

1.- Thermostable restructured models based on minced or small pieces of hake muscle could be elaborated at low temperature, with suitable physicochemical properties, by adding 0.05-0.5% of sodium alginate and the indispensable calcium chloride in powder form, as a donor of calcium ions.

2.-The proportion of calcium chloride, that should be around 0.1%, as a donor of calcium ions in the restructured models based in minced hake muscle and sodium alginate, significantly affects their physicochemical properties .

3.-The proportion of hydrophobic and covalent links formed between the proteins, does not clearly explain the development of the physicochemical properties of the restructured models to which sodium alginate and calcium chloride have been added.

Regarding the addition of microbial transglutaminase in the models based on hake muscle (*Merluccius capensis*) or giant squid surimi (*Dosidicus gigas*).

1.-The development of restructured models based on hake muscle using different processes (“cutter” or mixing of small pieces) can be carried out by setting temperatures at 4° and 30°C, when microbial transglutaminase (1 %) and sufficient sodium caseinate (0.75-1.5%) have been added.

2.- The incorporation of sodium caseinate to restructured models based on minced or chopped hake muscle and MTGase, sharply increased the enzyme activity which in turn increased the rate of covalent links thus formed together the mechanical properties and water binding capacity.

3.-The functional quality of raw material is an important parameter for developing restructured models based on small pieces of muscle. However it is not a limiting factor, when restructured models are developed by homogenization using the

“cutter” process mainly due to the better contact between ingredients and muscle and also to the higher myofibrillar protein solubilisation .

4.-The reduction of pH up to 6 in the restructured models dough, is only possible when a high concentration of NaCl (4%) is added, due to its significantly decreased physicochemical properties. However, around the neutral value of pH, high amounts of NaCl (4%) make the elaboration of restructured models much more difficult, regardless MTGase (0.5-1.0%) addition.

5.-The utilization of high pressure (300 MPa) in restructured model based on giant squid surimi and MTGase (0.5-1.0%) also at low temperature, improves the physicochemical properties of the gels formed.

Concerning the effect of conservation on restructured models prepared from hake(*Merluccius capensis*; *Merluccius merluccius*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle.

1.-The restructured models developed with different sodium alginate and MTGase concentrations increased their strength during chilled storage especially in those restructured models elaborated with sodium alginate.

2.-Restructured products with good physicochemical properties can be prepared with fatty fish such as trout, using cold gelation and MGTase. The addition of up to 5% cod liver oil to hake muscle in the presence of MTGase was also generating restructured models with good physicochemical properties and with good oxidative stability during chilled storage. This might be a good alternative for generating new type of omega-3 enriched fish products.

3.-During frozen storage period of 150 days, the restructured models developed by the "cutter" process and different sodium alginate and MTGase concentrations, the strength increased during the storage period especially after the second month. These changes were mainly due to the formation of large ice crystals. The increase in the strength is smaller in the restructured models developed with microbial transglutaminase and as a consequence a better and more stable protein network.

REFERENCIAS

AFNOR. 1999. Microbiological Standards Recopilation of food and assimilated and other physical-chemical parameters of health. Enumeration of microorganisms by colony-count technique at 30 degree Celsius. Routine method NF V 08-051.

AFNOR. 1999. Microbiological Standards Recopilation of food and assimilated and other physical-chemical parameters of health. Enumeration of enterobacteria by the colony count technique at 30 degree Celsius. Routine method NF V 08-054.

Agasami, T.; Ogiwara, M. Wakameda, A.; Noguchi, S.F. 1995. Effect of microbial transglutaminase on the quality of frozen surimi made from various kinds of fish species. *Fish Sci*, 61(2):267-272.

Ahmed, E.M.; Cornell, J.A.; Tomaszewski, F.B.; Deng, J.C. 1983. Effects of salt, tripolyphosphate and sodium alginate on the texture and flavour of fish patties prepared from minced sheepshead. *J Food Sci*, 48: 1078-1080.

Ajinomoto KK. 1994. Trans-glutaminase to bulk raw cod roe, forming mixt. In mould, etc. Patente Japonesa. JP6153869-A / JP3042226-B2.

Ajinomoto manual, Activa® WM: Ajinomoto Co's Transglutaminase Activa Modification of Physical properties of Protein. <http://meat-n-more.info/test/inglesch/activa/back/back01.htm>. Febrero 2009.

Allen, L.; Nelson, A.I.; Steinberg, MP.; Mcgill, J.N. 1963. Edible corn-carbohydrate food coatings. II. Evaluation on fresh meat products. *Food Technol*, 17(11): 1442-1451.

Anon. 1983. Getting more from less is no fish store. *Quick Frozen Foods*, 45(9): 24-27.

Ando, H.; Adachi, M.; Umeda, K.; Nonaka, M.; Uchio, R.; Tanaka, H.; Motoki, M. 1989. Purificación and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agric Biol Chem*, 53(10): 2613-2617.

Angulas Aguinaga, S.A. 1989. Inventores: Borderías, A.J.; Tejada, M. Procedimiento de fabricación de un producto análogo a la angula y producto así obtenido. Patente. ES2010637 (16/11/1989).

AOAC. Official methods of analysis (17th ed.). 2005. Association of Official Analytical Chemistry, Maryland, USA.

AOCS Official methods Ce 8-89. 1994. Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by HPLC. Official Methods of the AOCS; AOCS: Champaign, IL.

AOCS official methods Ce 2-66. 1998. Preparation of methyl esters of long chain fatty acids. Official Methods of the AOCS; AOCS: Champaign, IL.

Araki, H.; Seki, H. 1993. Comparison of reactivity of transglutaminase to various fish actomyosin. Nippon Suisan Gakkaishi, 59. pp: 2-9

Arvizu-Higuera, D.L.; Hernández-Carmona, G.; Rodríguez-Montesinos, E. 1996. Efecto de la temperatura y el tiempo de extracción en el proceso de alginato de sodio. Ciencias Marinas, 22(4): 511-521

Arvizu-Higuera, D.L.; Hernández-Carmona, G.; Rodríguez-Montesinos, E. 1997. Efecto del tipo de precipitación en el proceso de obtención de alginato de sodio. Ciencias Marinas, 23(2): 195-207

Asagami, T.; Ogiwara, M.; Wakameda, A.; Noguchi, S.F. 1995. Effect of microbial transglutaminase on the quality of frozen surimi made from various kinds of fish species. Fish Sci, 61(2): 267-272.

Ashie, I.N.A.; Lanier, T.C. 1999. High pressure effects on gelation of surimi and turkey breast muscle enhanced by microbial transglutaminase. J Food Sci, 64(4): 704-708.

Ayensa, M.G.; An, H.; Gómez-Guillén, M.C.; Montero, P.; Borderías, A.J. 1999. Partial protease activity characterization of squid (*Todaropsis eblanae*) mantle. Food Sci Tech Int, 5(5): 391-396.

Ayensa, M.G.; Montero, P.; Borderías, A.J.; Hurtado, J.L. 2002. Influence on some protease inhibitors on gelation of squid muscle. J Food Sci, 67(5): 1636-1641.

Baekken, O.; Smidsrod, O.; Draget, K.I.; Johansen, F. 2001. Gelled feed product, usefil as a pet food for cats and dogs, comprising raw materiall of animal or marine origin pre-treated with potasium hydroxide and others alkaline compounds. Patente WO200101792-A1 (11/01/01).

Balny, C.; Masson, P. 1993. Effects of high-pressure on proteins. Food Rews Int, 9(4): 611-628.

Baron, C.P.; Berner, L.; Skibsted, L.; Refsgaard, H.H.F. 2005. Evaluation of activity of selected antioxidants on proteins in solution and in emulsions. Free Radic Res, 39: 77-785.

Baron, C.P.; Kjærsgård, I.V.H.; Jessen F.; Jacobsen, C. 2007. Protein and lipid oxidation during frozen storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Agric Food Chem, 55: 8118-8125.

Bhale, S.D.; Ku, Z.; Prynwatkul, W. ; King, J.M.; Godber J.S. 2007. Oregan and rosemary extracts inhibits oxidation of long-chain n-3 fatty acids in menhanden oil. *J Food Sci*, 72(9):C504-C508.

Bevilacqua, A.; Zaritzky, N.E.; Cavelo, A. 1979. Histological measurements of ice in frozen beef. *J Food Technol*, 14:237-251.

Beltrán-Lugo, A.; Maeda-Martínez, A.N.; Pacheco-Aguilar, R.; Nolasco-Soria, H.G.; Ocaño-Higuera, V.M. 2005. Physical, textural, and microstructural properties of restructured adductor muscles of 2 scallop species using 2 cold-binding systems. *J Food Sci*, 70(2):E78-E84.

Benjakul, S.; Visessangaun, W. 2003. Transglutaminase-mediated setting in bigeye snapper surimi. *Food Res Int*, 36: 253-266.

Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Thonghaekw, C.;Tanaka, M. 2005. Effect of frozen storage on chemical and gel-forming properties of fish commonly used for surimi production in Thailand. *Food Hydrocoll*, 19: 197-207.

Benjakul, S.; Phatcharat, A.; Tammatina, A.; Visessanguan, W.; Kishimura, H. 2008. Improvement of gelling properties of lizardfish mince as influenced by microbial transglutaminase and fish freshness. *J. Food Sci*, 73(6): S239-S246.

Beyrer, M.; Klaas, M.R.S. 2007. Influence of freezing and frozen storage on the specific heat capacity of trout and herring fillet. *Eur Food Res Tech*, 224(3): 349-353.

Bligh, E. G.; Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37: 911-917.

BOE 221, de 14 de Septiembre 2007. (R.D. 1118/2007, de 24 de agosto), por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización.

Boles J.A.; Shand P.J. 1998. Effect of comminution method and raw binder system in restructured beef. *Meat Sci*, 49(3): 297-307.

Boles J.A.; Shand, P.J. 1997. Effect of raw binder system, meat cut and prior freezing on restructured beef. *Meat Sci*, 53(4): 233-239.

Borderías, A.J.; Jiménez-Colmenero, F.; Tejada, M. 1985. Parameters Affecting Viscosity as a Quality-Control for Frozen Fish. *Mar Fish Rev*, 47(4):43-45.

Borderías, A.J. 1995. Aplicación de altas presiones en tecnología de alimentos. *Alimentación, equipos y tecnología*, ISSN 0212-1689, Año nº 14 (2) pp: 109-111.

Borderías, A.J.; Pérez-Mateos, M. 1996. Productos pesqueros reestructurados. *Alimentaria*, 269: 53-62

Borderías, A.J.; Sánchez-Alonso, I.; Pérez-Mateos, M. 2005. New applications of fibres in foods: addition to fishery products. *Trends Food Sci* 16 (10):458-465

Bourne, M.C. 2002. *Food Texture and Viscosity. Concept and Measurement* (2nd edn). Inst Food Technol, Chicago, pp: 107-187.

Brennan, J.G. 1984. Texture perception and measurement. En: sensory analysis of foods. Ed. by J.R. Piggot. Elsevier Applied Science Publisers. London.

Bushuk, W. 1998. Interactions in wheat doughs. In: *Interactions: The key to cereal quality*. American Association of Cereal Chemist, Inc. St. Paul MN, USA, 1-16.

Carballo, J.; Ayo, A.; Jiménez-Colmenero, F. 2006. Microbial transglutaminase and caseinate as cold set binders: Influence of meat species and chilling storage. *Lebensm-wiss. u. Technol*, 39(6): 692-699.

Careche, M.; Tejada, M. 1988. Interference by formaldehyde in the 2-thiobarbituric acid test for rancidity. *J. Sci. Food Agric*, 43, 49-57.

Careche, M.; García, M.L.; Herrero, A.; Solas, M.T.; Carmona, P. 2002. Structural properties of aggregates from frozen stored hake muscle protein. *J Food Chem*, 67 (8):2827-2832.

Cárlez, A., Borderías, A.J., Dunay E. and Cheftel, J.C. 1995. High pressure gelation of fish myofibrillar proteins. In: *Food macromolecules and colloids*, E. Dickinson and D. Lorient, Eds. Royal Society of Chemistry, Cambridge, England, pp: 400- 409.

Cathell, M.D.; Schauer, C.L. 2007. Structurally colored thin films of Ca²⁺-cross-linked alginate. *Biomacromolecules*, 8(1):33-41.

Cheftel, J.C. 1992. Effects of fish hydrostatic pressure on foods constituents: an overview. En Balny, C.; Hayashi, R.; Heremans, K. & Masson, P. (eds.), *High pressure and Biotechnology*, Paris: Inserm, pp: 195-211.

Chen, H.H.; Chiu, E.M.; Huang, J.R. 1997. Colour and gel forming properties of Hourse mackerel (*Trachurus japonicus*) as related to washing conditions. *J Food Sci*, 62(5): 985-991.

Christensen, L., Andersen, E.; Christensen, M.; Andersen, M.L.; Baron, C. 2008. Texture changes and myosin oxidation during ripening of salted herring. *Proceeding ICoMST*.

Clarke, A.D.; Sofos, J.N.; Schmidt, G.R. 1988. Effect of Algin Calcium, pH and Muscle Proteins on Gelation and Microstructure of Gels and Structured Beef. *Lebensm-wiss. u. Technol*, 21(1): 46-53.

Clarke, D.D.; Mycek, M.; Neidle, A.; Waelsch, H. 1959. The incorporation of the amines into protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 79: 338-354.

Cofrades, S.; Ayo, J.; Serrano, A.; Jiménez-Colmenero, F. 2006. Walnut, microbial transglutaminase and chilling storage time effects on salt-free beef batter characteristics. *Eur Food Res Int*, 222(3-4): 458-466.

Cochran, W.G. & Cox, G.M. 1957, *Experimental Designs*. 2nd edition. Wiley, International. New York.

CSIC, 1991. Inventores: Borderías, A.J.; Cavestrany, M. Procedimiento de fabricación de un producto reconstituido análogo a lomos gruesos de bacalao seco, salado, rehidratado y congelado. Patente. ES 2021973-A6 (16/11/1991).

CSIC, 1994. Montero, M.P.; Borderías, A.J.; Gómez-Guillén, M.C. Un producto alimenticio análogo a manto de cefalópodo y su procedimiento de fabricación. Patente. ES2046953-A1 (01/02/94).

CSIC. 2004. Inventores: Careche, M.; Borderías, A.J., Sánchez-Alonso, I. Method of producing a functional protein concentrate from cephalopod muscles and product thus obtained, which is used in the production of similar products and other novel products. Patente. ES2208105-A1 (01/06/2004) y WO2004/052117-A1 (24/06/2004).

CSIC, 2005. Inventores: Careche, M.; Sánchez-Alonso, I.; Borderías, A.J. Mejora del procedimiento de elaboración de un concentrado proteico funcional a partir de músculo de cefalópodos y producto así obtenido para ser utilizado en la elaboración de productos análogos y otros nuevos productos. Patente. ES2231 023-A1 (01/05/05).

CSIC, 2007. Inventores: Borderías, A.J.; Carballo, J.; Moreno, H.M. Conformación de Miotomos y mioseptos en productos pesqueros reestructurados. Patente. ES 2 281 282-A1 (16/09/2008) y W0 2007/090916-A1 (16/08/2007).

de Jong, G. A. H.; Wijngaards, G.; Boumans, H.; Koppelman, S. J.; Hessing, M. 2001. Purification and substrate specificity of transglutaminases from blood and *Streptovercillium mobaraense*. *J Agri Food Chem*, 49(7): 3389-3393.

de Jong, G. A. H.; Wijngaards, G.; Koppelman, S. J. 2003. Transglutaminase inhibitor from milk. *J Food Sci*, 68(3): 820-825.

Dickinson, E. 1997. Enzymatic crosslinking as a tool for colloid rheology control and interfacial stabilization. *Trends Food Sci Tech*, 8(10): 334-339.

Documentos COTEC sobre necesidades tecnológicas. 1995. Productos pesqueros reestructurados. Fundación COTEC para la innovación tecnológica. pp: 13-31.

Devatkal, S.; Mendiratta, S.K. 2001. Use of calcium lactate with salt-phosphate and alginate-calcium gels in restructured pork rolls. *Meat Sci*, 4: 371-379.

Dondero, M.; Curotto, E.; Figueroa, V. 2002. Transglutaminase effects on gelation of jack mackerel surimi *Trachurus murphyi*. *Food Sci Tech Int*, 8(1): 49-54.

Dondero, M.; Figueroa, V.; Morales, X.; Curotto, E. 2006. Transglutaminase effects on gelation capacity of thermally induced beef protein gel. *Food Chem*, 99(3): 545-554.

Dublán-García, O.; Cruz-Camarillo, R.; Guerrero-Legarreta, I.; Ponce Alquiciría, E. 2005. Effect of refrigerated storage on proteolytic activity and physicochemical and microstructural properties of Giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle. *J. Muscle Food*, 17: 291-310.

Earle, R.D. 1968. Algin coating for extending shelf life of seafood and meat. U.S. Patente. 3.395.024. (En: *Natural Gums for edible purposes*, pp: 165. A.A. Lawrence. 1976. Noyes Data Corp., Park Ridge, NJ.

Esguerra, C.M. 1994. Quality of cold-set restructured beef steaks: effects of various binders, marination and frozen storage. Meat Industry Research Institute NZ Pub, n° 945. Hamilton, New Zealand.

FAOSTAT, 2004. <http://faostat.fao.org/site/629/default.aspx>.

Fernández, P.; Lespagnol, L. 2003. Food pet food products contains gels capsules or tablets based on alginate and pectate, and comprising oil, vitamins, aminoacids, proteins, minerals, colorants, flavours and specially targeted functional ingredients. Patente. WO2003053159-A1 (03/07/2003).

Fernández-Martín, F.; Pérez-Mateos, M.; Montero, P. 1998. Effect of pressure/heat combinations on blue whiting (*Micromesistius poutassou*) washed mince: Thermal and mechanical properties. *J. Agric. Food Chem*, 46(8): 3257-3264.

Fagan, J.D.; Gormley, T.R.; Mhuircheartaigh, M.U. 2003. Effect of freeze-chilling, in comparison with fresh, chilling and freezing, on some quality parameters of raw whiting, mackerel and salmon portions. *Lebensm-wiss. u. Technol*, 23: 647-655

- Fernández-Martin, F.; Cofrades, S.; Carballo, J.; Jiménez-Colmenero, F. 2002. Salt and phosphate effects on the gelling process of pressure/heat treated pork batters. *Meat Sci*, 61(1): 15-23.
- Field, R.A.; Williams, J.C.; Prasad, V.S.; Cross, H.R.; Secrit, J.L.; Brewer, M.S. 1984. An objective measurement for evaluation of bind in restructured lamb roast. *J Text Stud*, 15(2): 173-178.
- Fisher, R.A. 1999. Seafood restructuring using cold-set binding technology. Gloucester Point, Va.: Virginia Sea Grant Marine Advisory Program (VSGCP-G-99-002), pp: 1-16.
- Flanagan, J.; Gunning, T.; Fitzgerald, R.J. 2003. Effect of cross-linking with transglutaminase on the heat stability and some functional characteristics of sodium caseinate. *Food Res Int*, 36(3): 267-274.
- Folk, J.E. 1970. Transglutaminase in method in enzymology. Tabor, H and Tabor, C.W. Ed.: New York: Academic Press. 17 pp: 889-849.
- Galazca, V.B.; Ledward, D.A.; Dickinson, E. Langley, K.R. 1995. High Pressure effects on emulsifying behavior of whey protein concentrate. *J Food Sci*, 60(6): 1341-1343.
- Gallart-Jornet, L.; Barat, J.M.; Rustad, T.; Erikson, U.; Escriche, I.; Fito, P. 2007. Influence of brine concentration on Atlantic salmon fillet salting. *J Food Ingeneering*, 80 (1): 267-275.
- Gao, H.; Liu, K.; Zhu, M. 2001. Nover compound useful as antistaling agent for marine fishes and shrimps. Patente. CN1285151-A (28/02/2001) y CN1088561-C (07/09/2002).
- Geirsdottir, M.; Hlynsdottir, H.; Thorkelsson, G.; Sigurgisladottir, S. 2007. Solubility and viscosity of herring (*Clupea harengus*) proteins as affected by freezing and frozen storage. *J Food Sci*, 72(7): C376-C380.
- Gerrard, J.A.; Fayle, S.E.; Brown, P.A.; Surrón, K.H.; Simmons, L.; Rasiah, I. 2001. Effects of microbial transglutaminase on the wheat proteins of bread and croissant bough. *J Food Sci*, 66(6): 782-786.
- Gerrad, J.A. 2002. Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Trends Food Sci Technol*, 13(12): 391-399.
- Gilleland, G.M.; Lanier, T.C.; Hamann, D.D. 1997. Covalent bonding in pressure induced fish protein gels. *J Food Sci*, 62(4): 713-716.

Gómez-Guillén, M. C.; Montero, P.; Solas, M.T.; Pérez-Mateos, M. 2005. Effect of chitosan and microbial transglutaminase on gel forming ability of horse mackerel *Trachurus spp.* muscle under high pressure. *Food Res Int*, 38(1): 103-110.

Groves, K. 2006. Microscopy: A tool to study ingredients interactions in foods. En: *Ingredients interactions: Effects on Food Quality*. Second edition. Ed: Gaonkar, A.G. y Mcpherson, A. CRC Press. U.S. pp: 21-28.

Hamm, R. 1972. *Kolloidchemie des Fleisches. Das Wasserbindungsvermögen des Muskelweisses in Theorie und Praxis*.

Hamann, D.D. 1990. Surimi, a building block for formulated foods. En Iir (ed.), *Chilling and Freezing of New Fish Products*, Paris: International Institute of refrigeration. pp: 11-21.

Hames, B.D. 1985. *An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis*. Oxford: IRL Press, Oxford. pp: 1-86.

Hamman, D.D.; MacDonald, G.A. 1992. Rheology and texture properties of surimi and surimi-based food. En: *Surimi Technology*. Editado por: Lanier, T.C. y Lee, C.M.

Han, M.; Zang, Y.; Fei, Y.; Xu, X.; Zhou, G. 2009. Effect of microbial transglutaminase on NMR relaxometry and microstructure of pork myofibrillar protein gel. *European Food Res. Technol*, 228: 665-670.

Hemmarsson, R. 1989. Denaturation and aggregation reactions involved in gel formation, *American Chemical Society*, 175 (3):17.

Heremans, K.; Van Camp, J.; Huyghebaert, A. 1997. High pressure effects on proteins. In *Food proteins and their applications*, S. Damodaran and A/ paraf (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York. pp: 473-502.

Herrero, A.M.; Carmona, P.; García, M.L.; Solas, M.T.; Careche, M. 2005. Ultrastructural changes and structure and mobility of myowater in froze-stored hake (*Merluccius merluccius L.*) muscle: Relationship with functionality and texture. *J Agric Food Chem*, 53: 2558-2566.

Huffman, D.L.; Ande, C.F.; Cordray, J.C.; Stanley, M.H.; Egbert, W.R. 1987. Influences of polyphosphate on storage stability of restructured beef and pork nuggets. *J Food Sci*, 52: 275-278.

Hurtado, J.L.; Montero, P.; Borderías, J. 2000. Extension of shelf life of chilled hake (*Merluccius capensis*) by high pressure. *Food Sci Tech Int*, 63(3): 242-249.

- Ikeuchi, Y.; Tanji, H.; Kim, K.; Suzuki, A. 1992. Mechanism of heat-induced gelation of pressurized actomyosin: Pressure-induced changes in actin and myosin in actomyosin. *J Agric Food Chem*, 40(10): 1756-1761.
- Ikura, K.; Kometani, T.; Sasaki, R.; Chiba, H. 1980. Crosslinking of soybean-7S and soybean-11S proteins by transglutaminase. *Agric Biol Chem*, 44(12): 2979-2984.
- Imm, J.Y.; Regenstein, J.M. 1997. Interaction of commercial dairy proteins and chicken breast myosin in an emulsion system. *J Food Sci*, 62(5): 967-971.
- Ironside, J.I.M.; Love, R.M. 1985. Studies on protein denaturation in frozen fish. Biological factors influencing the amounts of soluble and insoluble proteins present in the muscle of the North Sea Cod. *J Sci Food Agric*, 9: 597-617.
- James, D. 1990. Seafood Technology in the 90's: the needs of developing countries. *Actas de Seafood 2000*. Canadian Institute Fisheries Technology, Technical University of Nova Scotia.
- Jarmoluk, T.; Pietrasik, K. 2003. Response Surface Methodology study on the effects of blood plasma, microbial transglutaminase and kappa-carragen on pork batter gel properties. *J Food Engin*, 60(3): 327-334.
- Jena, R.; Bhattacharya, S. 2003. Viscoelastic characterization of rice gel. *J Text Stu*, 34: 349-360.
- Jiang, S.T.; Hsieh, J.F.; Ho, M.L.; Chung, Y.C. 1989. Microbial transglutaminase affects gel properties of golden threadfin-bream and pollack surimi. *J Food Sci*, 65(4): 694-699.
- Jiménez-Colmenero, F. 2002. Muscle protein gelation by combined use of high pressure/temperature. *Trends Food Sci Tech*, 13(1): 22-30.
- Jiménez-Colmenero, F.; Ayo, M.J.; Carballo, J. 2005. Physicochemical properties of low sodium frankfurter with added walnut: Effect of transglutaminase combined with caseinate, KCl and dietary fibre as salt replacers. *Meat Sci*, 69: 781-788.
- Johnston, W.A.; Roger, A. 1982. Two machines for reforming fish for frozen products. *Refrigeration Sci Tech*, 49: 167-171.
- Kamath, G.G.; Lanier, T.C.; Foeding, E.A.; Hamann, D.D. 1992. Nondisulfide covalent cross-linking of myosin heavy chain in "setting" of Alaska Pollock and Atlantic croaker surimi. *J Food Biochem*, 16: 151-172.
- Kashiwagi, T.; Yokoyama, K.; Ishikawa, K.; Ono, K.; Ejima, D.; Katsui, H.; Suzuki, E. 2002. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. *J Biol Chem*, 277(46): 44254-44260.

Katayama, K.; Chin, K.B.; Yoshihara, S.; Muguruma, M. 2006. Microbial transglutaminase improves the the property of meat protein and sausage texture manufactured with low-quality pork loins. *Aust J Anim Sci*, 19(1): 102-108.

Kato, H.; Nakamura, Y. 2006. Processing soy protein for use as a flavour improving component in pickles, drinks and livestock meat processed foods. Comprises, sequentially using transglutaminase and protease. Patente. JP 2006141231-A.

Kauzman, W. 1959. Some factors in the interpretation of protein denaturation. En: *Advances in protein chemistry*, ed. by Anson ML, Edsall JT, Bailey K. Academic Press, New York, pp: 1-64.

Kellerby, S.S.; Gu, Y.S.; McClements, D.J.; Decker, E.A. 2006. Lipid oxidation in a menhaden oil-in-water emulsion stabilized by sodium caseinate cross-linked with transglutaminase. *J Agric. Food Chem*, 54: 10222-10227.

Kerry, J.K.; O'Donnell, A.; Brown, H.; Kerry, J.P.; Buckley, D.J. 1999. In: *Proceedings 45th international Congress of Meat Science and Technology*, 1-6 August, Yokohama, Japan, pp: 140-141.

Kelco. 1986. Kelco algin hydrophilic derivatives of alginic acid for scientific water control. Kelco and Co., pp: 56-80.

Killic, B. 2003. Effect of microbial transglutaminase and sodium caseinate on quality of chicken doner kebab. *Meat Sci*, 63(3):417-421.

Kim, B.Y.; Park, J.; Yoon, W. 2004. Rheology and texture properties of surimi gels. En: *Surimi and surimi seafood*. Ed. By J. Park, CRC Press, Boca Raton, FL.

Kimura, I.M.; Sugimoto, M.; Toyoda, K.; Seki, N.; Arai, K.; Fujita, T. 1991. A study on cross-links reaction of myosin in kamaboco "suwari" gels. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57: 1386-1396.

Knorr, D.; Bottcher, A.; Dornenberg, H.; Eshtiagi, M.; Oxen, P.; Richwin, A.; Seyderhelm, I. 1992. High pressure effects on microorganisms, enzyme activity and food functionality. Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. In *High Pressure and Biotechnology*. Ed: Balny, C.; Hayashi, R.; Heremans, K.; Masson, P. vol. 224, pp: 211-218.

Kok, T.N.; Park, J.W. 2007. Extending the shelf life of set fish ball. *J Food quality*, 30(1): 1-27.

Kolle, D.S.; Savell, J.W. 2003. Using ActivaTM TG-RM to bind beef muscles after removal of excessive seam fat between the *m. longissimus thoracis* and *m. spinalis dorsi* and heavy connective tissue from within the *m. infraspinatus*. *Meat Sci*, 64: 27-33.

- Kong, F.; Tang, J.; Lin, M.; Rasco, B. 2008. Thermal effects on chicken and salmon muscles: Tenderness, cook loss, area shrinkage, collagen solubility and microstructure. *Lebensm-wiss. u. Technol*, 14: 1210-1222.
- Konno, K.; Young-Je, C.; Yoshioka, T.; Shinho, P.; Seki, N. 2003. Thermal denaturation and autolysis profiles of proteins of mantle muscle of jumbo squid *Dosidicus gigas*. *Fish. Sci*, 69(1): 204-209.
- Kumar, M.; Sharma, B.D.; Kumar, R.R. 2007. Evaluation of sodium alginate as a fat replacer on processing and shelf-life of low-fat ground pork patties. *Asian-Australasian J Animal Sci*, 20(4): 588-597.
- Kumazawa, Y.; Numazawa, T.; Seguro, K.; Motoki, M. 1995. Suppression of surimi gel setting by transglutaminase inhibitors. *J Food Sci*, 60: 715-717
- Kumazawa, Y.; Sakamoto, H.; Kawajiri, H.; Seguro, K.; Motoki, M. 1996. Determination of epsilon-(gamma-glutamyl)lysine in several fish eggs and muscle proteins. *Fish Sci*, 62(2): 331-332.
- Kuraishi, C.; Sakamoto, J.; Yamanazaki, K.; Susa, Y.; Kuhara, C.; Soeda, C. 1997. Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *J Food Sci*, 62(3): 488-490+515.
- Kuraishi, C.; Sakamoto, J.; Soeda, T. 1998. Application of transglutaminase for meat processing. *Fleischwirtschaft*, 78(6): 657-662.
- Kuraishi, C.; Yamazaki, K.; Susa, Y. 2001. Transglutaminase: Its utilization in the food industry. *Food Rev* 17(2): 221-246.
- Kwan, S.W.; Easa, A. M. 2003. Comparing physical properties of retort-resistant glucono-delta-lactone tofu treated with commercial transglutaminase enzyme or low levels of glucose. *Lebensm-wiss u Technol*, 36(6): 643-646.
- Lanier, C.T. 1992. New Technologies in surimi manufacture. En: *Surimi Technology*. Ed: Lanier CT y Lee CM. New Cork, Marcel Dekker INC. pp: 167-207.
- Lanier, T.C.; Carvajal, P.; Yongsawatdigul, J. 2005. Surimi gelation Chemistry. In *Surimi and Surimi Seafood*. Ed. Jae W. Park. Taylor & Francis group. Second edition, pp: 435-477.
- Lauber, S.; Henle, T.; Klostermeyer, H. 2000. Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt. *Eur Food Res Tech*, 210(5): 305-309.
- Lauber, S.; Noack, I.; Klostermeyer, H.; Hemle, T. 2001. Stability of Microbial transglutaminase to high pressure treatment. *Eur Food Res Tech*, 213 (4-5): 273-276.

Lee, C.M.; Chung, K. H. 1990. The role of hydrodynamic properties of biopolymers in texture strengthening/modification and freeze-thaw stabilizing of surimi gel. En: Voig, M; Botta, R. (Ed.), *Advances in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased Profitability*, Lancaster, PA: Tech. Pub. Co., Inc. pp: 397-412.

Lee, C.M. 1994. Surimi processing from lean fish. En: *Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality*. Ed. Shahidi, F.; Botta, J.R. Glaswov: Blackie Academic and Professional. pp: 263-287.

Lee, H.G.; Lanier, T.C.; Hamann, D.D.; Knopp, J.A. 1997. Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein sols. *J Food Sci*, 62(1):20-24.

Lee, E. Y.; Park, J. 1998. Surimi processing from lean fish. En: *Seafoods: Chemistry. Processing Technology and Quality*. Ed. Shahidi, F. Y Botta, J.R. Glaswov: Blackie Academic and Professional. pp: 689-715

Lee, E.Y.; Park, J. 2002. Pressure inactivation kinetics of microbial transglutaminase from *Streptovercillium mobaraense*. *J Food Sci*, 67(3): 1103-1107.

Lee, E.Y.; Park, J. 2003. Microbial transglutaminase induced cross-linking of a selected comminuted muscle system: Processing conditions for physical properties of restructured meat. *Food Sci Biotech*, 12(4): 356-370.

Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.G.; Ahn, B.W.; Shaltiel, S.; Stadtman, E.R.1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 186: 464-478.

Levine, R.L.; Williams, J.A.; Stadtman, E. R.; Shacter, E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 233:346-357.

Lorenzen, P.C.; Schlimme, E.; Roos, N. 1998. Crosslinking of sodium caseinate by a microbial transglutaminase. *Nahrung-Food*, 42(3-4): 151-154.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem*, 193(1): 265-275.

Lullien-Pellerin, V.; Balny, C. 2002. High pressure as a tool to study some proteins properties: Conformational modifications, activity an oligomeric dissociation. *Innovative Food Sci Emerging Technol*, 3: 209-221.

Manseth, E.; Skjervol, P.O.; Fjaera, S.O.; Brosstad, F.R.; Odegaard, O.R.; Flengusrud, R. 2003. Development a fish meat-binding agent: purification of salmon thrombin. *J Foo Sci*, 68(5): 1648-1652.

Massaux, C.; Bitar, C.; Bera, F.; Sindic, M.; Deroanne, C. 2000. High pressure-induced gel formation of chicken meat patties. *High pressure Res*, 19(1-6): 465-473.

- Matsumura, Y.; Lee, D.S.; Mori, T. 2000. Molecular weight distributions of alpha-lactoalbumin polymers formed by mammalian and microbial transglutaminases. *Food Hydrocoll*, 14(1): 49-59.
- Maza, S.; Salas, A.; Rosales, M.; Castro, R. 2003. Efectos de un proceso de lixiviación ácida salina sobre la calidad del surimi de *Dosidicus gigas* "pota". *Boletín de Investigación del Instituto Tecnológico Pesquero del Perú* vol. 5. pp: 81-88.
- McCormick, R.D. 1975. Edible coating isolates oxygen and moisture, controls structure-seals in flavor. *Food Prod Dev*, 9(4): 14-19.
- Means, W.J.; Schmidt, G.R. 1986. Algin Calcium Gel as a Raw and Cooked Binder in Structured Beef Steaks. *J Food Sci*, 51 (1): 60-65.
- Means, W.J.; Schmidt, G.R. 1987. Restructuring fresh meat without the use of salt or phosphate. En: *Advanced in meat research. Restructured meat and poultry products*. Ed.: Pearson, AM.; Dutson, TR. pp : 469-487
- Menéndez, O.; Rawel, H.; Schwarzenbolz, U.; Henle, T. 2006. Structural changes of microbial transglutaminase during thermal and high-pressure treatment. *J Agri Food Chem*, 54(5): 1716-1721.
- Mercier. 1994. La industria de las algas. *Industria Química*. pp: 313-350.
- Messens, W.; VanCamp, J.; Huyghebaert, A. 1997. The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. *Trends Food Sci Tech*, 8(4): 107-112.
- Mills, A. 1990. Utilization of retextured deboned mackerel fish. En: Burt, J.R.; Hardy, R.
- Milkowski, A.; Sosniki, A.A. 1999. Method for treating PSE meat with transglutaminase. Kraft Foods, I., Patente. US- P-5928689.
- Ministerio Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. 2008. Evolución de los hábitos de consumo y compra en España: 1987-2007. www.mapya.es/es/alimentacion/consumo/comercialización/estudios/varios .
- Mohan, M.; Ramachandran, D.; Sankar, T.V.; Anandan, R. 2007. Influence of pH on solubility and conformational characteristics of muscle proteins from mullet (*Mugil cephalus*). *Process Biochem*, 42: 1056-1062.
- Moller, A.J. Nielsen, G.S.; Petersen, B.R. 1997. Methods of raw meat for production of restructured raw meat by addition to the meat of transglutaminase. Patente. *Official Gazette of the United States Patent and trademark office patents*, 1204(4): 1263. PREV200200086169 (11/09/997)

Montero, P.; Martí de Castro, M.A.; Solas, M.T.; Gómez-Guillén, M.C. 1997. Textural and microstructural changes in frozen stored sardine mince gels. *J Food Sci*, 64(4): 838-842.

Montero, P.; Pérez-Mateos, M.; Solas, T. 1997b. Comparison of different gelation methods using washed sardine (*Sardina pilchardus*) mince: Effects of temperature and pressure. *J Agric and Food Chem*, 45(12):4612-4618.

Montero, P.; Hurtado, J.L.; Pérez-Mateos, M. .2000. Microstructural behaviour and gelling characteristics of myosystem protein gels interacting with hydrocolloids. *Food Hydrocoll*, 14(5): 455-461.

Montero, P.; Pérez-Mateos, M. 2001. Mince gels with hydrocolloids and salts: composition/function relationships and discrimination of functionality by multivariate analysis. *Eur Food Res Int*, 213(4-5): 338-342.

Montero, P.; Pérez-Mateos, M. 2002. Effects of cations on the gelling characteristics of fish mince with added non ionic and ionic gums. *Food Chem*, 6: 363-373.

Montero, P.; López-Caballero, M.E.; Pérez-Mateos, M.; Solas, M.T.; Gómez-Guillén, M.C. 2005. Transglutaminase activity in pressure-induced gelation assisted by prior setting. *Food Chem*, 90(4): 751-758.

Montero, M.P., Gómez-Guillén, MC.; Borderías A.J. 2007. Uso de la alta presión en miosistemas. Importancia en el procesado de pescado. In: Aplicación de tecnologías emergentes de procesado mínimo en el sector pesquero. Ed: Centro Tecnológico del Mar. Fundación CETMAR. Vigo. España. pp: 157- 175.

Moon, S. S.; Kim, Y.T.; Jin, S.K.; Kim, I.S. 2008. Effects of sodium chloride, potassium chloride, potassium lactate and calcium ascorbate on the physico-chemical properties and sensory characteristics of sodium-reduced pork patties. *Korean J Food Sci Animal*, 28(5): 567-573.

Morales, O.G.; Ramírez, J. A.; Vivanco, I. D.; Vázquez, M. 2001. Surimi of fish species from the gulf of Mexico: evaluation of the setting phenomenon. *Food Chem*, 75: 43-48.

Moreno, H.M.; Carballo, J.; Borderías, A.J. 2008. Influence of Alginate and Microbial Transglutaminase as binding ingredients on restructured fish muscle processed at low temperature. *J Sci Food Agric*, 88:1529-1536.

Moreno, H.M.; Carballo, J.; Borderías, A.J., 2009a. Gelation of fish muscle using microbial transglutaminase and the effect of sodium chloride and pH levels. *J Muscle Food* (Aceptado, Julio 2008).

Moreno H.M.; Carballo, J.; Borderías, A.J. 2009b Cold gelification of two different quality minced hake (*Merluccius capensis*) muscles at different setting times by adding microbial transglutaminase. *J Sci Food Agric*, (Aceptado, Marzo, 2009)

Motoki, M.; Okiyama, A.; Nonaka, M.; Tanaka, H.; Uchio, R.; Matsuura, A.; Ando, H.; Umeda, K. 1990. Novel transglutaminase. Ajinomoto Co. Inc y Amano Pharmaceutical Co. Ltd., assignee. Patente. E P 0379606-A1.

Motoki, M. and Seguro, K. 1998. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends Food Sci Tech*, 9(5): 204-210.

Motoki, M.; Nio, N. 1983, Crosslinking between different food proteins bt transglutaminase. *J Food Sci*, 48: 561-566

Muguruma, M.; Tsuruoka, K.; Fujino, H.; Kawahara, S.; Yamauchi, K., Matsamura, S.; Soeda, T. 1999. Gel strength enhancemenet of sausages by treating with microbial transglutaminase. *Proceedings of the 45th international congress of meat science and technology*, yokohama, Japan. pp: 138-139.

Muguruma, M.; Tsuruoka, K.; Katayama, K.; Erwanto, Y.; Kawahara, S.; Yamauchi, K.; Sathe, K.; Soeda, T. 2003. Soybean and milk proteins modified by transglutaminase improves chicken sausage texture even at reduced leves of phosphate. *Meat Sci*, 63(2): 191-197.

Mujoo, R.; Ng, P. K. W. 2003. Identification of wheat protein components involved in polymer formation on incubation with transglutaminase. *Cereal Chem*, 80(6): 703-706.

Nio, N.; Motoki, M.; Takiami, K. 1986. Gelation mechanism of protein solution by transglutaminase. *Agric Biol Chem*, 115(2): 335-345.

Noguchi, T.; Tanimoto, H.; Mori, M. 1992. A promoting material for absorption of materials and compositions containing it. Japan Kokai Tokkyo Koho, assignee. Patente. JP 04349868.

Noguchi, K.; Ishika, K., Yokoyama, K.; Ohtsuka, T.; Nio, N.; Suzuki, E. 2001. Crystal structure of red sea bream transglutaminase. *J Biol Chem*, 276(15): 12055-12059.

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1992. *Enzyme Nomenclature*. International Union of Biochemistry

and Molecular Biology. World wide web material prepared by G.P. Moss, Department of chemistry, University of London. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>.

Nonaka, M.; Tanaka, H.; Okiyama, A.; Motoki, M.; Ando, H.; Umeda, K.; Matsuura, A. 1989. Polymerization of several proteins by Ca^{2+} independent transglutaminase derived from microorganisms. *Agric Biol Chem*, 53(10): 2619-2623.

Nonaka, M.; Toiguchi, S.; Sakamoto, H.; Kawajiri, H.; Soeda, T.; Motoki, M. 1994. Changes caused by microbial transglutaminase on physical-properties of thermally-induced soy protein gels. *Food Hydrocoll*, 8(1): 1-8

Nonaka, M.; Matsuura, Y.; Motoki, M. 1996. Incorporation of lysine-and lysine dipeptides into alpha-(S1)-casein by Ca^{2+} independent microbial transglutaminase. *Biosci Biotech Biochem*, 60(1): 131-133.

Nonaka, M.; Ito, R.; Sawa, A.; Motoki, M.; Nio, N. 1997. Modification of several proteins by using Ca^{2+} independent microbial transglutaminase with high-pressure treatment. *Food Hydrocoll*, 11(3): 351-353.

Novo-Nordisk, A.S. (NOVO-C). 1995. Use of a transglutaminase modified protein-to replace fat in foods. Patente. RD369013-A.

O'Connor, P.L.; Brewer, M.S.; McKeith, F.K.; Novakofski, J.E.; Carr, T.R. 1993. Sodium lactate/sodium chloride effects on sensory characteristics and shelf-life of fresh ground pork. *J. Food Sci*, 58: 978-980+986.

O'Kennedy, B.T.; Kelly, P.M. 2000. Evaluation of milk protein interactions during acid gelation using a simulated yoghurt model. *Milchwissenschaft*, 55(4): 187-190.

Oh, J.H.; Field, P.D.; Aglan, H.A. 2004. Characteristics of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysate cross-linked with transglutaminase. *Int J Food Sci Tech*, 39(3): 287-294.

Offer, G.; Knight, P. 1988. The structural basis of water-holding in meat. Part 1: General principles and water uptake in meat processing. In R. Lawrie (Ed), *Developments in meat science*, vol.4. pp: 63-171. London: Elsevier Applied Science.

Ohshima, T.; Ushio, H.; Koizumi, C. 1993. High-pressure processing of fish and fish products. *Trends Food Sci Tech*, 41(11): 370-375.

Okamoto, K. T.; Hagura, Y.; Suzuki, K. 2005. Estimation of cryo-cutting conditions for frozen surimi gel using DSC. *Food Sci. Technol. Res*, 11(2): 236-239.

Ordóñez, J.A.; Cambero, M.I.; Fernández, L.; García, M.L.; García de Fernando, G.; De la Oz, L.; Selgas, M.D. 1998. Productos derivados de la pesca. En: Tecnologías de los alimentos. Volumen II. Editado por Ordóñez, J.A. Editorial Síntesis, S.A., Madrid. pp: 304-340.

O'Sullivan, M.M.; Nelly, A.L.; Fox, P.K. 2002. Influence of transglutaminase treatment on some physico-chemical properties of milk. *J Dairy Res*, 69(3): 433-442

Ogawa, T. 2008. Formulation for fish roe processing to prepare fish roe processed foods such as salted cod roe with red pepper, comprises transglutaminase and acid or alkali treated collagen of fish origin. Patente. JP2008008966-A.

Özrenk, E. 2006. The use of transglutaminase in dairy products. *Int J Dairy Tech*, 59(1): 1-7.

Park, J.W. 2005. Surimi Resources. En: Surimi and Surimi Seafood. Second edition. Editado por Park, J.W. Marcell Dekker, New York. pp: 3-29.

Pedersen, M.H.; Hansen, T.K.; Sten, E.; Seguro, K.; Ohtsuka, T.; Morita, A.; Bindslev-Jensen, C.; Poulsen, L.K. 2004. Evaluation of the potential allergenicity of the enzyme microbial transglutaminase using the 2001 FAO/WHO Decision Tree. *Molecular Nutrition Food Res*, 48(6): 434-440.

Pérez-Mateos, M; Montero, P. 1997. High-pressure-induced gel of sardine (*Sardina pilchardus*) washed mince as affected by pressure-time-temperature. *J Food Sci*, 62(6): 1183-1188.

Pérez-Mateos, M., Lorenço, H.M., Montero, P. and Borderías A. J. 1997b. Rheological and chemical studies on high pressure-induced gels from blue whiting (*Micromesistius poutassou*) muscle. *J. Agric. Food. Chem*, 15: 4544-4549.

Pérez-Mateos, M; Hurtado, JL; Montero, P, Gómez-Guillén, C. 2001. Interactions of kappa-carrageenan plus other hydrocolloids in fish myosystem gels. *J Food Sci*, 66(6): 838-843.

Pérez-Mateos, M.; Gómez-Guillén, M.C.; Hurtado, J.L., Solas, M.T.; Montero, P. 2002. The effect of rosemary extract and omega-3 unsaturated fatty acids on the properties of gels made from the flesh of mackerel *Scomber scombrus* by high pressure and heat treatment. *Food Chem*, 79(1): 1-8.

Pérez-Mateos, M; Solas, T; Montero, P. 2002. Carrageenans and alginate effects on properties of combined pressure and temperature in fish mince gels. *Food Hydrocoll*, 16(3): 225-233.

Pietrasik, Z.; Li-Chan, E.C.Y. 2002. Response surface methodology study on the effects of salt, microbial transglutaminase and heating temperature on pork batter gel properties. *Food Res Int*, 35(4): 387-396.

Pietrasik, Z. 2003. Binding and textural properties of beef geles processed with kappa-carrageenan, egg albumin and microbial transglutaminase. *Meat Sci*, 63(3): 317-324.

Poulsen, L.K. 2004. Allergy assessment of food or ingredients derived from biotechnology, gene-modified, or level foods. *Molecular Nutrition Food Res*, 48(6): 413-423.

Proceso de "Sferificación" con alginatos. www.texturasebuli.com.

Pszczola, D.E. 2002. Beefing up innovations for meat and poultry ingredients. *Food Tech*, 53(3): 54-66+79.

Raharjo, S.; Dexter, D.R.; Worfel, R.C.; Sofos, J.N.; Solomon, M.B.; Shults, G.W.; Schmidt, G.R. 1994. Restructuring Veal Steaks with salt. *J Food Sci*, 59 (3): 471-473.

Raharjo, S.; Dexter, D.R.; Worfel, R.C.; Sofos, J.N.; Solomon, M.B.; Shults, G.W.; Schmidt, G.R. 1995. Quality Characteristics of Restructured Beef Steaks Manufactured by various Techniques. *J Food Sci*, 59-60 (1): 68-71.

Ramírez, J.A.; Martín-Polo, M.O.; Bandman, E. 2000. Fish Myosine aggregation as affected by freezing and initial physical state. *J Food Sci*, 65: 556-560.

Ramírez, J.; Uresti, R.; Téllez, S.; Vázquez, M. 2002. Using salt and microbial transglutaminase as binding agents in restructured fish products resembling hams. *J Food Sci*, 67(5): 1779-1784.

Ramírez, J.A.; Santos, I.A.; Morales, O.G.; Morrissey, M.T.; Vázquez, M. 2006. Application of microbial transglutaminase to improve mechanical properties of surimi from silver carp. *Sci Tech Aliment*, 3(1): 21-28.

Rey, D.K.; Labuza, T.P. 1981. Characterization of the effects of solutes on the water binding and gel strength properties of carragenan. *J Food Sci*, 46: 786-789.

Rhee, K.S. 1999. Storage stability of meat products as affected by organic and inorganic additives and functional ingredients. In Y.L. Xiong, C.T. Ho & F. Shahidi (Eds) *Quality attributes of muscle food*. pp: 95-113. New York: Plenum Publishing.

Richards, M.P.; Modra, A.M.; Li, R. 2002. Role of deoxyhemoglobin in lipid oxidation of washed cod muscle mediated by trout, poultry and beef hemoglobins. *Meat Sci*, 62: 157-163.

- Rocker, R.K.; Deng, J.C.; Otwell, W.S.; Cornell, J.A. 1983. Effect of soy flour, soy protein concentrate and sodium alginate on the textural attributes of minced fish patties. *J Food Sci*, 48: 1048-1052.
- Rosell, C.M.; Rojas, J.A.; de Barber, C.B. 2001. Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food Hydrocoll*, 15(1): 75-81.
- Roudot, A.C. 2004. *Reología y Análisis de la textura de los alimentos*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.
- Rowe, R.W.D. 1989. Electron microscopy of bovine muscle: II-The effects of heat denaturation on post rigor sarcolemma and endomyosium. *Meat Sci*, 26: 281-294.
- Roopa, BS; Bhattacharya, S .2008.I. Characterization of textural attributes. *J Food Engineering* , 85: 123-131.
- Ruiz-Carrascal, J.; Regenstein, J. 2002. Emulsion stability and water uptake ability of chicken breast muscle proteins as affected by microbial transglutaminase. *J Food Sci*, 67(2): 734-739.
- Rourke, T.J.; Clarke, A.D.; Bailey, M.E.; Hedrick, H.B. 1997 Ionic interactions in algin/calcium/myofibrillar protein gels. *J Muscle Foods*, 8(1): 33-46.
- Sallam, Kh.I.; Samejima, K. 2004. Microbial and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. *Lebensm-wiss. u. Technol*, 37: 865-871.
- Sakai, T. Munashingham, D.M.S.; Kashimura, M.; Sugamoto, K.; Kawahara, S. 2004. Effect of NaCl on lipids peroxidation-derived aldehyde, 4-hydroxy-2-nonenal formation in minced pork and beef. *Meat Sci*, 66(4): 789-792.
- Sakamoto, H.; Kumazawa, Y.; Toiguchi, S.; Seguro, k.; Soeda, T.; Motoki, M. 1994. Gel strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during onshore surimi manufacture. *J Food Sci*, 60(2): 300-304.
- Sánchez-Alonso, I.; Careche, M.; Borderías, A.J. 2007c. Method of producing a functional protein concentrate from giant squid (*Dosidicus gigas*) muscle. *Food Chem*, 100(1): 48-54.
- Sánchez-Alonso, I.; Hají-Maleki, R.; Borderías, A.J. 2007a. Wheat fiber as a functional ingredient in restructured fish product. *Food Chem*, 100(3): 1037-1043.
- Sánchez-Alonso, I.; Solas, M.T.; Borderías, A.J. 2007b. Physical study of minced fish muscle with a white-grape by-product added as an ingredient. *J Food Sci*, 72(2): E94-E101.

Sánchez-Alonso, I.; Solas, T.; Borderías, A.J. 2007c. Technological implications of addition of wheat dietary fibre to giant squid (*Dosidicus gigas*) surimi gels. *J Food Engineering*, 81: 404-411.

Sánchez-Alonso, I.; Borderías, A.J. 2008. Technological effect of red grape antioxidant dietary fibre added to minced fish muscle. *Int J Food Sci Technol*, 43(6): 1009-1018.

Sánchez-Bambila, G. Y.; Álvarez-Manilla, G.; Soto-Cordova, F.; Lyon, B. G.; Pacheco-Aguilar, R. 2004. Identification and characterization of the off-flavour in mantle muscle of jumbo squid (*Dossidicus gigas*) from the gula o Clifornia. *J Aquatic Food Product Tech*, 13(1): 55-67.

Sato, K.; Tanaka, C.; Kotaru, M.; Yoshikawa, H.; Kawabata, M.; Ikeuchi, T.; Nakamura, Y.; Ohtsuki, K. 2001. Different arrangement of epsilon(gamma-glutamyl)Lisine cross-linking in Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) surimi porteins by *Streptoverticillium* and endogenous transglutaminases during suwari porcess. *J Food Biochem*, 25(5): 397-409.

Sato, S.; Tsuchiya, T. 1992. Microstructure of surimi and surimi-based products. En: *Surimi Technology*. Ed.: Lanier, TC.; Lee, CM.; Marcel Dekker, INC. New. pp: 501.

Schmitd, G.R.; Trout, G.R. 1982. Chemistry of meta binding. In *Meat Science and Technology International Symposium Proceedings*. Lincoln, NE 1-4 November. pp: 265. Chicago, ILL. International Live Stock and Meat Board.

Seguro, K.; Kumazawa, Y.; Kurahisi, C.; Sakamoto, C.; Sakamoto, H.; Motoki, M. 1996. The épsilon-(gamma-glutamyl)lysine in crosslinked casein is an available source of lysine for rats. *J Nutrition*, 126(10): 2557-2562.

Seki, N.; Uno, H.; Lee, N.H.; Kimura, I.; Toyoda, K.; Fujita, T.; Arai, K. 1990. Transglutaminase activity in alaska pollack muscle and surimi, and its reaction with myosin.B. *Nippon Suissan Gakkaishi*, 56(1): 125-132.

Shand, P.J.; Sofos J.N.; Schmidt, G.R. 1993. Properties of algin calcium and salt phosphate structured beef rolls with added gums. *J Food Sci*, 58(6): 1224-1230.

Shantha, N.C.; Decker, E.A. 1994. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *J. Assoc Off Anal Chem*, 77: 421-424.

Sharma, R.; Zakora, M.; Qvist, K.B. 2002. Susceptibility of an industrial alpha-lactalbumin concentrate to cross-linking by microbial transglutaminase. *Int Dairy J*, 12(12): 1005-1012.

Shimba, N.; Yonkoyama, Y.; Suzuki, E. 2002. NMR-based screening method for transglutaminases: Rapad analysis of their substrate specifities and reaction rates. *J Agric Food Chem*, 50(6): 1330-1334.

Shimada, T.; Aratake, T.; Niwano, Y. 2008. Fat substitute used in gel-form for livestock meat (containing cow, pig, and chicken meat) or fish-meat processed food, e.g. hamburger, boiled fish paste, ground fish cake, and Chinese dumpling, contains alginic acid or alginate. Patente. JP2007289009-A.

Shika, F.H.; Hossan, M.I.; Morioka, K., Kubota, S.; Itoh, Y. 2006. Effect of decreasing pH on gel microstructure of walleye pollack surimi. *Fish Sci*, 72(5): 1127-1129.

Shimizu, Y.; Toyohara, H.; Lanier, T.C. 1992. Surimi production from fatty and dark flash species. En: *Surimi Technology*. Ed.: Lanier, TC y Lee, CM. New York, Marcell Dekker Inc. pp: 181-207.

Shoji, T.; Saeki, H.; Wakameda, A.; Nakamura, M.; Nonaka, M.1990. Gelation of salted paste of Alaska pollack by high hydrostatic pressure and change in myofibrillar protein in it. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56 (12): 2069-2076.

Siró, I.; Vén, Cs.; Balla, Cs.; Jónás G.; Zeke, I.; Friedrich, L. 2009. Application of an ultrasonic assisted curing technique for improving the diffusion of sodium chloride in porcine meat. *J Food Engineering*, 91: 353-362.

Steffensen, C. L.; Andersen, M. L.; Degn, P. E.; Nielsen, J. 2008. H. Cross-linking proteins by laccase-catalyzed oxidation: importance relative to other modifications. *J Agric Food Chem*, 56, 12002-12006.

Soeda, T. 2000. Cheese whey protein having improved texture, process for producing the same and thereof. Ajinomoto Co. Inc. asignee. Patente. EP 0966887-A1.

Soeda, T.; Kasagi, T.; Hokazono, A.; Yamazaki, K.; Mugumura, M. 2006. Effects of salt and polyphospahte on physiscal properties of meat gel treated with microbial transglutaminase. *J Japanese Soc Food Sci Tech*, 53(2): 109-113.

Sofos, J.N. 1986. Use of phosphates in low-sodium meat products. *Food Tech*, 40 (9): 52-59.

Sokolova, V.M.; Talabaeva, S.V.; Podkorytova, A.V. 2005. Method for producing of dietary paste-like canned fish foods. Patente. RU2250049-C2.

Sonu, S.C. 1986. Surimi NO A A Technical Memorandum NMFS, US Department of Commerce, Terminal Island CA.

Spencer, K.E.; Tung, M.A. 1994. Surimi processing from fatty fish. En: *Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality*. Ed. Shahidi, F. Y Botta, J.R. Glaswow: Blackie Academic and Professional. pp: 288-319.

Stainley, D.W.; Tung, M.A. 1976. Microstructure of food and its relation to texture. En: *Rheology and Texture in Food Quality*. Ed: DeMan, JM.; Voisey, PW; Rasper, VF.; Stainley, DW. The AVI Pub. Comp. pp: 28

Suklim, K.; Flick, G.J.; Marcy, J.E.; Eigel, W.N.; Haugh, C.G.; Granata, L.A. 2004. Effect of cold-set binders: Alginates and microbial transglutaminase on the physical properties of restructured scallops. *J Text Stu*, 35 (6): 634-642.

Suzuki, T. 1981. En: *Tecnología de las proteínas de pescado y krill*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España. pp. 106-168.

Suzuki, T. 1987. Kamaboko (gel de pescado). En: *Tecnología de las proteínas de pescado y krill*. Editorial ACRIBIA SA. Zaragoza. pp: 55-100.

Tabilo-Munizaga, G.; Barbosa-Canovas, G.V. 2004. Colour and textural parameters of pressurized and heat-treated surimi gels as affected by potato starch and egg White. *Food Res Int*, 31: 767-775.

Takagaki, Y.; Norakawa, K.; Uchio, R. 1991. Coating of vegetables and fruits with transglutaminasa and proteins for preservation. Japan kokai Tokkyo koho, asignee. Patente. JP 03272639.

Tejada, M. 2001. Aggregation of myofibrillar proteins during frozen storage of fish. *Novel processes and control technologies in the food industry*. Eds: Bozoglu, F.; Deak, T.; Ray, B. Book series: Nato Science Series, Sub-series 1: Life and Behavioural sciences, 338: 212-226.

Téllez-Luis, S.J.; Uresti, R.M.; Ramírez, J.A.; Vázquez, M. 2002. Low-salt restructured fish products using microbial transglutaminase as binding agent. *J. Sci. Food Agric*, 82(9): 953-959.

Tornberg, E. 2005. Effects of heat on meat proteins-implications on structure and quality of meat products. Review. *Meat Sci*, 70: 493-508.

Trespacios, P.; Pla, Reyes. 2007. Synergistic action of transglutaminase and high pressure on chicken meat and egg gels in absence of phosphates. *Food Chem*, 104: 1718-1727.

Trout, R.G. 1989. Colour and bind strength of restructured pork chops: The effect of Calcium carbonate and sodium alginate concentration. *J Food Sci*, 54(6): 1466-1470.

Tsai, G.J.; Lin, S.M.; Jiang, S.T. 1996. Transglutaminase from *Streptovorticillium ladakanum* and application to minced fish products. *J Food Sci*, 61(6): 1234-1238.

Tsai, S.J.; Unklesbay, N.; Unklesbay, K.; Clarke, A. 1998. Water and absorptive properties of restructured beef products with five binders at four isothermal temperatures. *Lebensm-wiss. u. Technol*, 31(1):78-83.

Tsuchiya, T.; Yamada, N.; Matsumoto, J. J. 1978. Studies on squid mantle muscle proteins. 4. Extraction and purification of squid myosin. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 44 (2): 175-179

Tsukamasa, Y.; Miyake, Y.; Ando, M.; Makinodan, Y. 2002. Total activity of transglutaminase at various temperatures in several fish meat. *Fish Sci*, 68(4):929-933.

Underlan, I.; Hultin, H.O.; Richards, M.P. 2002. Added triacylglycerols do not hasten hemoglobin-mediated lipid oxidation in whasted minced cod muscle. *J Agric Food Chem*, 50: 6847-6853.

Uresti, R.M.; Ramírez, J.A.; López-Arias, N.; Vázquez, M. 2003. Negative effect of combining microbial transglutaminase with low methoxyl pectins on the mechanical properties and colour attributes of fish gels. *Food Chem*, 80(4): 551-556.

Uresti, R.M.; Velázquez, G.; Ramírez, J.A.; Vázquez, M. 2004a. Effect of high-pressure treatments on mechanical and functional properties of restructured products from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). *J Sci Food Agric*, 84(13): 1741-1749.

Uresti, R.M.; Velázquez, G.; Vázquez, M.; Ramírez, J.A.; Torres, J.A. 2006. Effects of combining microbial transglutaminase and high pressure processing treatments on the mechanical properties of heat-induced gels prepared from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). *Food Chem*, 94(2): 202-209.

Vácha, F.; Novik, I.; Špička, J.; Podola, M. 2006. Determination of the effect of microbial transglutaminase on technological properties of common carp (*Cyprinus carpio L.*) meat. *Czech. J. Anim. Sci*, 51(12): 535-542.

Vieira E.;S.A. 2000. Preparation of edible coating on fresh, frozen or defrosted fish roe-involves application of sodium alginate solution followed by treatment with strong solution of calcium chloride. Patente. ES2138559-A1 (01/01/00)y ES2138559-B1 (16/08/00).

Vignisson, E. 2004. Production of reconstituted fish roe-like products by

homogenizing fish mass, and forming alginate-based particles from liquid fish mass to produce reconstituted alginate-based fish roe-like particles. Patente. WO2004056211-A1 (08/07/04).

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

Vyncke, W. 1975. Evaluation of the direct thiobarbituric acid extraction methods for determining oxidative rancidity in Mackerel (*Scomber scombrus* L). *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 77: 239-240.

Vyncke, W. 1981. Influence of Citric-Acid on the shelf life of Saithe and Redfish. *Revue De L Agriculture*, 34(1): 149-154.

Wilhelm, B.; Meinhard, A.; Seitz, J. 1996. Transglutaminases: Purification and activity assays. *J Chromatography B: Biomedical Applications*, 684(1-2):163-177

Young, K.W.; White, J. 1985. Colour measurement of fish minces using Hunter L,a,b values. *J Sci Food Agric*, 36: 383-392.

Yi, J.B.; Kim, Y.T; Bae, H.J.; Park, H.J. 2006. Influence of transglutaminase-induced cross-linking on properties of fish gelatin films. *J Food Sci*, 71(9): E376-E383.

Zhu, Y.; Bol, J.; Rinzema, A.; Tramper, J. 1995. Microbial transglutaminase :A review of its production and application in food processing. *Appl. Microbiology Biotechnol*, 44(3-4):277-282.

Ziegler, G.R.; Foegeding, E.A. 1991. The gelation of proteins. En: Kinsellas, J.E. (Ed), *Advances in Food and Nutrition Research*, J.E. Nueva York: Academic Press. pp: 203-298.

