



Departamento de Química Analítica, Nutrición y  
Bromatología

Aplicación de sistemas avanzados para la  
mejora de la calidad de productos marinos  
refrigerados de interés comercial

Minia Sanjuás Rey  
TESIS DOCTORAL  
2012





JORGE BARROS VELÁZQUEZ, Catedrático de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Santiago y SANTIAGO AUBOURG MARTÍNEZ, Profesor de Investigación del Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo

INFORMAN

Que la presente tesis doctoral, titulada “**Aplicación de sistemas avanzados para la mejora de la calidad de productos marinos refrigerados de interés comercial**”, ha sido realizada por la doctoranda MINIA SANJUÁS REY bajo nuestra dirección conjunta. Asimismo, y una vez terminada la parte experimental correspondiente, autorizamos a la doctoranda a que realice su presentación y defensa pública.

Santiago de Compostela, 23 de abril de 2012

Fdo: Jorge Barros Velázquez

Fdo: Santiago Aubourg Martínez

Fdo: Minia Sanjuás Rey



## AGRADECEMENTOS

*Nesta derradeira etapa como doutoranda desexo expresar o meu agradecemento aos mestres do coñecemento e da dedicación á investigación, os meus directores de Tese o Profesor Jorge Barros Velázquez e o Profesor Santiago Aubourg, por me deixar formar parte do seu equipo de investigación que deu como resultado esta Tese Doutoral.*

*Agradecer tamén ao Dr. e Catedrático Alberto Cepeda por terme dado a oportunidade no seu momento de continuar a miña formación profesional.*

*Ás miñas compañeiras e amigas, Mónica, Carmen e Bea, dispostas a axudarme sempre. Grazas pola vosa xenerosidade e apoio.*

*Agradecer a colaboración dos membros do CSIC: Marcos Trigo e Cristina Nine, pola súa axuda e coñecemento no campo da bioquímica.*

*Quero agradecer a Marcos, o meu compañeiro na vida, a súa colaboración fotográfica nesta Tese e por compartir comigo nestes últimos anos retos, paixóns e ledicias.*

*Non quero esquecer a Luz e Suso, meus pais, por seren un exemplo para min de amor incondicional, traballo e cultura. Estareivos eternamente agradecida.*

Este trabajo de investigación fue realizado gracias a la financiación concedida por la Xunta de Galicia dentro del Programa Sectorial de Tecnologías de la Alimentación a través de los proyectos de investigación:

PGIDIT08TAL038E, PGIDIT09TAL031E y PGIDIT10TAL018E

## ABREVIATURAS

---

**AA** : Ácido ascórbico

**AC**: Ácido cítrico

**ADP**: Difosfato de adenosina

**AE**: Aceite esencial

**AEO**: Aceite esencial de Orégano

**AET**: Aceite esencial de Tomillo

**AGL**: Ácidos grasos libres

**AGP**: Ácidos grasos poliinsaturados

**AL**: Ácido láctico

**AMP**: Monofosfato de andenosina

**AMR**: Agua de mar refrigerada

**ATP**: Trifosfato de adenosina

**BVT-N**: Bases nitrogenadas volátiles totales

**EAM**: Envasado en atmósfera modificada

**FAO**: Food and Agriculture Organization of the United Nations

**g**: Gramos

**HL**: Hielo líquido

**HLO**: Hielo líquido ozonizado

**HT**: Hielo tradicional en escamas

**Hx**: Hipoxantina

**IMP**: Monofosfato de inosina

**Ino**: Inosina

**mequiv**: Miliequivalente

**min** : Minutos

**ml**: Mililitro

## ABREVIATURAS

---

**mM:** Milimolar

**nm:** Nanómetros

**OTMA:** Óxido de trimetilamina

**PCA:** Plate count agar

**PV:** Índice de peróxidos

**RTE:** Ready to eat

**TBA:** Ácido tiobarbitúrico

**TMA-N:** Trimetilamina nitrogenada

**UE:** Unión Europea

**UFC:** Unidades formadoras de colonias

**VRBD:** Violet red bile agar

# ÍNDICE

<b>I- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>1- ASPECTOS GENERALES DE LAS ESPECIES MARINAS.....</b>	<b>7</b>
1.1- Extracción y acuicultura .....	7
1.2- Valor nutricional .....	9
1.3- Susceptibilidad a la alteración .....	13
1.4- Alimentos derivados de las especies marinas.....	15
<b>2- CONSERVACIÓN EN REFRIGERACIÓN DE ESPECIES MARINAS .....</b>	<b>16</b>
2.1-La refrigeración como estrategia de conservación .....	16
2.2- Vías de alteración durante la conservación en refrigeración.....	19
2.2.1- Autólisis .....	19
2.2.2- Actividad microbiana .....	23
2.2.3- Oxidación de la fracción lipídica .....	27
2.3- Refrigeración tradicional en hielo en escamas .....	28
<b>3- APLICACIÓN DE OTROS METODOS O ESTRATEGIAS PARA LA REFRIGERACIÓN DE ESPECIES MARINAS.....</b>	<b>30</b>
3.1- Agua de mar refrigerada .....	31
3.2- Hielo líquido .....	32
3.3- Combinación de hielo líquido con ozono .....	35
3.4- Aplicación de conservantes naturales en pescado fresco.....	38
3.5- Aplicación de aceites esenciales en productos marinos refrigerados .....	41
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>45</b>
<b>II- PRESENTACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
<b>III- MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
<b>1- SISTEMAS DE PRESERVACIÓN EMPLEADOS.....</b>	<b>61</b>
1.1- Sistemas de refrigeración .....	61
1.2- Mezcla de ácidos orgánicos naturales.....	62
1.2.1- Fórmula comercial BPS2 .....	62
1.2.2- Elaboración de hielo incluyendo ácidos naturales.....	63
1.3- Cobertura con aceites esenciales.....	63
<b>2- MATERIA PRIMA DE ESPECIES MARINAS, PROCESAMIENTO Y MUESTREO .....</b>	<b>64</b>
2.1- Trucha arco iris .....	64
2.2- Especies bivalvas.....	66
2.3- Merluza, gallo y rape.....	68
2.4- Bacaladilla.....	70
2.5- Jurel .....	71

## ÍNDICE

2.6- Caballa .....	72
2.7- Anillas de calamar .....	74
<b>3- ANÁLISIS DE PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA CALIDAD .....</b>	<b>76</b>
3.1- Análisis sensorial.....	76
3.2- Análisis Microbiológico .....	78
3.3- Análisis Bioquímicos .....	80
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>84</b>
<b>IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>87</b>
<b>CAPÍTULO 1:.....</b>	<b>89</b>
Improved quality and shelf life of farmed trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) by whole processing in a combined ozonised flow ice refrigeration system.	
Mejora de la calidad y de la vida útil de trucha arco iris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) mediante conservación en un sistema combinado de hielo líquido y ozono.	
<b>CAPÍTULO 2:.....</b>	<b>105</b>
Improved microbial and sensory quality of clams ( <i>Venerupis rhomboideus</i> ), oysters ( <i>Ostrea edulis</i> ) and mussels ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> ) by refrigeration in a slurry ice packaging system.	
Mejora de la calidad microbiológica y sensorial de almeja ( <i>Venerupis rhomboideus</i> ), ostra ( <i>Ostrea edulis</i> ) y mejillón ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> ) mediante refrigeración en un sistema de hielo líquido envasado.	
<b>CAPÍTULO 3:.....</b>	<b>123</b>
Effect of a natural organic acid-icing system on the microbiological quality of commercially relevant chilled fish species.	
Efecto de un sistema de hielo conteniendo ácidos orgánicos naturales sobre la calidad microbiológica de especies marinas refrigeradas y de relevancia comercial.	
<b>CAPÍTULO 4:.....</b>	<b>141</b>
Effect of a two-step natural organic acid treatment on microbial activity and lipid damage during blue whiting ( <i>Micromesistius poutassou</i> ) chilling.	
Efecto de un sistema de hielo conteniendo ácidos orgánicos naturales sobre la actividad microbiológica y alteración lipídica de la bacaladilla ( <i>Micromesistius poutassou</i> ) durante su almacenamiento en refrigeración.	
<b>CAPÍTULO 5:.....</b>	<b>165</b>
Effect of different icing conditions on lipid damage development in chilled horse mackerel ( <i>Trachurus trachurus</i> ) muscle.	
Efecto de distintos sistemas de hielo sobre el desarrollo de la alteración lipídica en el músculo de jurel ( <i>Trachurus trachurus</i> ) refrigerado.	
<b>CAPÍTULO 6:.....</b>	<b>181</b>

## ÍNDICE

Microbial activity inhibition in chilled mackerel (*Scomber scombrus*) by employment of an organic acid-icing system.

Inhibición de la actividad microbiana en caballa (*Scomber scombrus*) refrigerada mediante el empleo de un sistema de hielo que incluye ácidos orgánicos naturales.

**CAPÍTULO 7:..... 199**

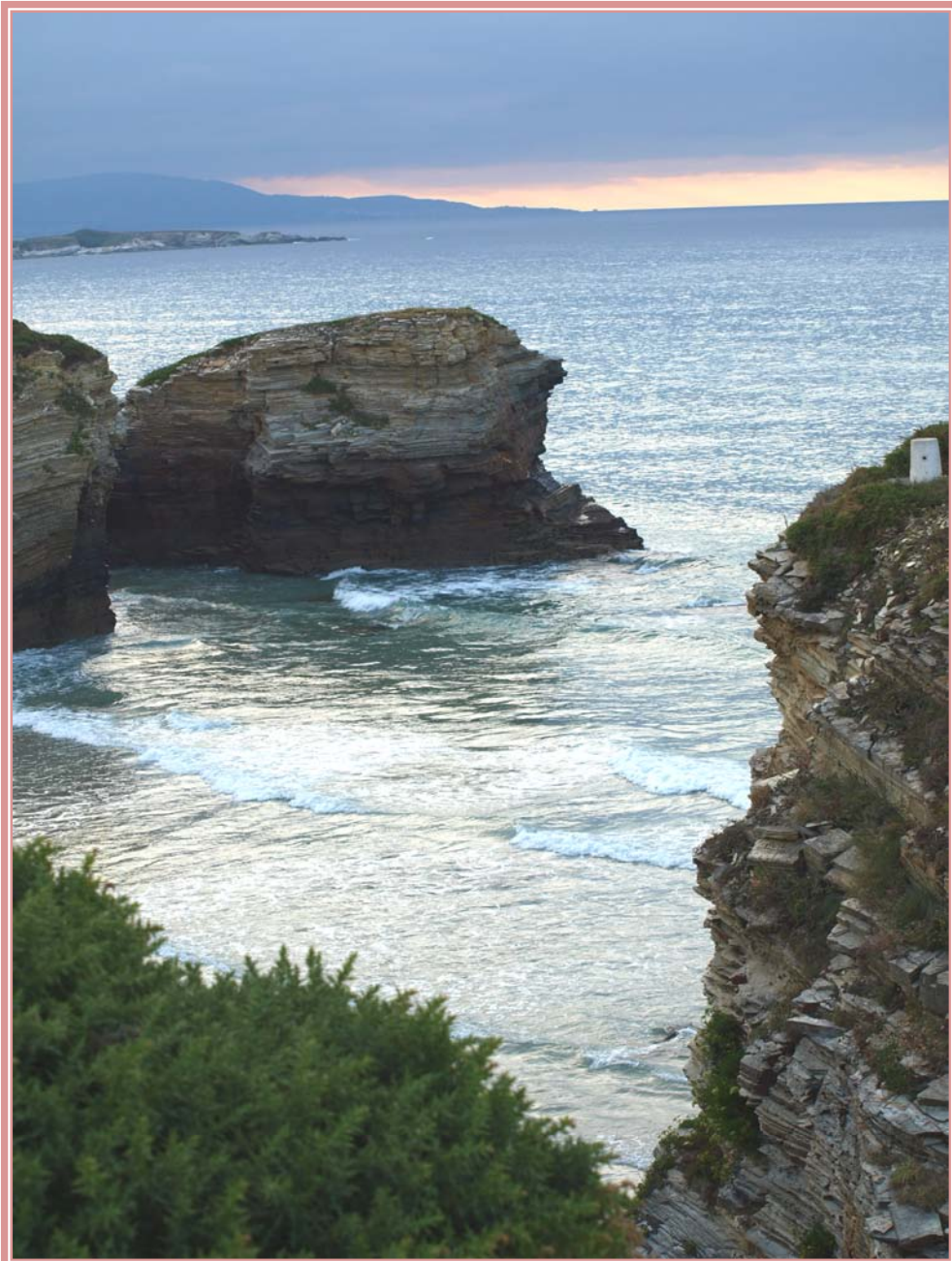
Effect of oregano and thyme essential oils on the microbiological and chemical quality of refrigerated (4° C) ready-to-eat squid rings.

Efecto de aceites esenciales de orégano y tomillo sobre la calidad química y microbiológica de anillas de calamar precocinadas conservadas en refrigeración (4°C).

**REFERENCIAS..... 221**

**V- CONCLUSIONES.....231**





# I- INTRODUCCIÓN



## I- INTRODUCCIÓN

---

### 1- ASPECTOS GENERALES DE LAS ESPECIES MARINAS

#### 1.1- Extracción y acuicultura

Una gran parte de los recursos marinos son obtenidos a partir de productos de la pesca extractiva. España posee una alta actividad pesquera, dado que su situación geográfica permite que en sus costas se concentre una gran población dedicada a esta actividad. Actualmente, España se encuentra a la cabeza de la Unión Europea en tonelaje de flota, volumen, valor de la pesca desembarcada y número de pescadores, lo que la convierte en el país europeo con mayor importancia pesquera (FAO, 2010).

La comunidad autónoma española con mayor número de buques pesqueros es Galicia, que supone casi el 50% de la flota total española y el 6% de la UE (FAO, 2010) según los datos del Censo de la Flota Pesquera Operativa. La flota pesquera gallega está dispersa por todo el litoral, salvo en los casos de las flotas de altura y gran altura, donde las poblaciones de Burela, A Coruña, Ribeira, Marín, A Garda y especialmente Vigo (por su flota congeladora), acaparan prácticamente la totalidad de las embarcaciones.

La oferta mundial de productos de la pesca ha crecido de manera considerable a escala mundial en los últimos años, aunque este crecimiento no es igual en todas las áreas y para todas las especies. En las zonas donde el nivel de explotación es mayor, se encuentran problemas importantes con las poblaciones de peces. Esto ocurre en el caso de especies muy demandadas como el bacalao,

## I-INTRODUCCIÓN

la merluza y el arenque. Este descenso de los recursos pesqueros cuestiona la afirmación de que el mar es una fuente inagotable de alimentos, lo que pone de manifiesto su limitada capacidad, sobre todo en lo que respecta a ciertas especies. Desde la UE se han dirigido políticas para garantizar la pesca sostenible a largo plazo cuyo objetivo principal es la de alcanzar un equilibrio sostenible entre la actividad de la flota y los recursos pesqueros disponibles.

Sin embargo las actividades pesqueras se están viendo reducidas debido a otros factores como el aumento del precio de los combustibles, el cambio climático, las emisiones de carbono y el incremento general del precio de todo tipo de materiales empleados por el sector (FAO, 2010). Por último, otro factor que afecta a este sector, es la preocupación de los consumidores por los riesgos y beneficios percibidos a partir del consumo de pescado. Esto ha generado una demanda orientada hacia técnicas menos intensivas, basadas en medios naturales de producción que garanticen por un lado la calidad del producto consumido y por otro lado, deben garantizar la sostenibilidad de los recursos marinos. Todos estos hechos han beneficiado el desarrollo en las últimas décadas del sector de la acuicultura.

El fin fundamental de los cultivos acuícolas es la producción de materia viva en medio marino. Es decir, la acuicultura consiste en la manipulación de biotopos acuáticos naturales o artificiales para la producción de especies útiles al hombre; por lo tanto, incluye todas las actividades de cría o cultivo de organismos que viven en dichos biotopos (Barnabé, 1989).

El sector de la acuicultura crece más rápido que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal, con un crecimiento medio anual del 6,6%. Con estos avances se está tratando de ayudar a resolver problemas de

conservación de especies, como el caso del camarón y de algunas especies de pescado blanco que están en peligro de extinción en algunos lugares, evitando así la sobreexplotación de sus caladeros (Cifuentes y col., 1997).

En Europa, los principales productos de la acuicultura marina son los pescados de alto valor comercial, destacando el salmón, seguido de la dorada, la lubina y el rodaballo; entre los moluscos, destacan las especies de mejillón, ostra y almeja. A pesar de que la producción de mejillón experimenta bruscas variaciones debido a los episodios de mareas rojas que tienen lugar en Galicia, su cultivo en las bateas de las Rías Gallegas (Ilustración 1), ha situado a España como segundo productor mundial después de China (Consellería de Pesca e asuntos marítimos, 2008).

**Ilustración 1: Batea de La Ría de Vigo**



## **1.2- Valor nutricional**

El estudio de los nutrientes y las funciones que desempeñan en el organismo nos han permitido conocer muchas de las propiedades de los alimentos que hasta hace relativamente pocos años se intuían o formaban parte de la sabiduría popular. No se puede elaborar un producto nuevo sin saber la respuesta de sus componentes frente al proceso al que va a ser sometido; no se

## I-INTRODUCCIÓN

puede aplicar un tratamiento sin conocer en qué cuantía va a disminuir la actividad de ciertos principios nutritivos; no se puede tratar un alimento sin conocer qué modificaciones sensoriales van a producirse. En la actualidad se considera que es imprescindible conocer con el mayor detalle posible la composición de todas aquellas especies que forman parte de nuestra dieta.

Los principales componentes químicos del músculo de pescado son el agua, las proteínas y los lípidos. Juntos constituyen aproximadamente el 98% del músculo. Estos componentes son los que tienen mayor impacto sobre el valor nutritivo, las propiedades funcionales, las cualidades sensoriales y la estabilidad en la conservación de estos productos. Los otros constituyentes (carbohidratos, vitaminas y minerales), aunque están presentes en menor cantidad, también juegan un papel importante en los procesos bioquímicos que tienen lugar en el músculo post-mortem.

El agua es el principal componente del músculo de pescado; representa en torno al 80% del peso en especies magras y es menor en aquellas especies que almacenan lípidos en el músculo (Haard, 1992). Es uno de los componentes que más influye en la alterabilidad de los alimentos. Con el objeto de medir su presencia, surgió el concepto de actividad de agua ( $a_w$ ), que se define como la relación existente entre la presión de vapor de un alimento y la presión de vapor de agua pura, medidas ambas a la misma temperatura. Este parámetro es una medida del agua disponible para el crecimiento de microorganismos y para que se puedan llevar a cabo las diferentes reacciones químicas y enzimáticas relacionadas con la pérdida de calidad.

El nitrógeno proteico es la fracción más importante del nitrógeno total, ya que suele suponer en la mayoría de las especies un valor superior al 85% del

nitrógeno total (Pérez-Martín, 1986). El porcentaje de proteína se encuentra en el rango 15-20% en el músculo fresco, y no existen diferencias entre especies magras y grasas. Considerando que la carne de cerdo, cordero y ternera tienen un 20-21% de proteínas, se entiende que se haya catalogado al pescado en el grupo de los alimentos proteicos. Asimismo, la calidad nutritiva de la proteína marina se asemeja mucho a la de la proteína del huevo, la leche y productos cárnicos, en el sentido que contiene igualmente todos los aminoácidos esenciales. Como resultado, el valor biológico y el coeficiente de digestibilidad de las proteínas marinas se encuentra en los mismos rangos que los alimentos recién mencionados (Piclet, 1987).

Lo que caracteriza y distingue a los alimentos marinos frente a los de origen terrestre es su composición lipídica altamente insaturada. Los lípidos marinos están compuestos por ácidos grasos de cadena larga (14-22 átomos de carbono) con un alto grado de insaturación. Los ácidos grasos de los mamíferos raramente contienen más de dos dobles enlaces por molécula, mientras que los depósitos grasos de las especies marinas contienen muchos ácidos grasos con cinco o seis dobles enlaces. Numerosas investigaciones recientes centran en los ácidos grasos poliinsaturados de la serie  $\omega$ 3 el papel positivo de los lípidos marinos en la lucha contra determinadas enfermedades. Dos ácidos destacan por su abundancia en este grupo. Son, el de 22 átomos de carbono y 6 dobles enlaces (ácido docosahexaenoico, DHA) y el de 20 átomos de carbono y 5 dobles enlaces (ácido eicosapentaenoico, EPA). Las especies marinas son también interesantes por su aporte en ácidos grasos esenciales (linoleico, linolénico y araquidónico), aquellos ácidos grasos que el organismo humano necesita pero no es capaz de sintetizar. Recientemente se ha estudiado la relación de contenidos de ácidos  $\omega$ 3

## I-INTRODUCCIÓN

y  $\omega 6$ ; se ha comprobado que en los dos últimos siglos, el desarrollo tecnológico y el cambio de hábitos ha llevado a una proporción superior de  $\omega 6$  de la que sería la correcta en una dieta equilibrada humana ( $1/6$ ,  $\omega 3/ \omega 6$ ) (Simopoulos, 1994).

Un constituyente minoritario, pero de gran importancia desde un punto de vista tecnológico, es el de los compuestos nitrogenados no proteicos. Se trata de un conjunto heterogéneo de moléculas que contienen nitrógeno, son de naturaleza no proteica y son solubles en agua. Los más importantes a nivel tecnológico son las bases volátiles (amoníaco, trimetilamina, dimetilamina), óxido de trimetilamina, aminoácidos libres, urea, nucleótidos, etc. Estos compuestos proceden fundamentalmente del sarcoplasma y constituyen en los teleósteos un 9-18% del nitrógeno total y un 33-38% en los elasmobranquios (Piclet, 1987).

Los carbohidratos representan la fuente de energía más rápida de los seres vivos. En el caso de las especies marinas no es un constituyente abundante, pudiendo llegar a un máximo de 1,2 y 4 g/100 g de músculo fresco en pescado, crustáceos y moluscos. Se encuentran fundamentalmente en la forma de glucógeno, aunque en algún caso se han aislado pequeñas cantidades de glucosa libre y ribosa.

Los alimentos marinos son una fuente muy rica de componentes minerales. El contenido total en músculo oscila en el rango 0,6-1,5% del peso húmedo. Globalmente, se puede decir que los productos marinos son interesantes por su aporte en halógenos (I, F) y también en otros elementos como P, K, Ca, siendo menos importante su contribución en Cl y Na. Desde el punto de vista tecnológico, resulta importante la presencia de determinados elementos de transición (Cu y Fe, especialmente) dado que pueden ser buenos catalizadores de una de las vías de alteración de los productos marinos (oxidación de la fracción grasa).

Las vitaminas son compuestos orgánicos complejos, que en cantidades mínimas y como componentes naturales de los alimentos son esenciales para el curso normal de las funciones fisiológicas. Uno de los valores más positivos de las especies marinas es su aporte en vitaminas del tipo liposoluble (A, D y E, especialmente), siendo también considerable el de algunas proteínas del tipo hidrosoluble como tiamina, riboflavina, B6 y B12. El hígado de las especies magras resulta una fuente muy buena de las vitaminas A y D, mientras que en el caso de las especies grasas es en el músculo donde se pueden encontrar cantidades mayores.

### **1.3- Susceptibilidad a la alteración**

Después de la captura de los productos marinos, se produce una serie de modificaciones, cuya velocidad e intensidad dependen de factores intrínsecos y de factores extrínsecos al animal. En lo referente a factores intrínsecos, se puede afirmar que el pescado, y en general los productos marinos están considerados en el grupo de los alimentos más frágiles y perecederos que existen. Esto es debido fundamentalmente a su gran contenido en determinados constituyentes (agua, aminoácidos libres, lípidos con alto grado de insaturación, compuestos nitrogenados no proteicos, enzimas autolíticas, etc.) que facilitan la puesta en marcha de una serie de vías de alteración. Asimismo, es importante mencionar la pequeña proporción de tejido conectivo que se encuentra presente en el músculo, lo que los hace más susceptibles que los animales terrestres al ataque microbiano en el momento de abandonar su hábitat natural.

Por otra parte, debe destacarse el gran número de enzimas autolíticas presentes en los lisosomas de las células de su tejido muscular. Estas enzimas,

que se caracterizan por presentar su mayor actividad a pH ácido y tener un papel regulador en el animal vivo, son las responsables después de la muerte del fenómeno conocido como autólisis enzimática.

Aunque el músculo y los fluidos fisiológicos del pescado vivo o recién capturado sean normalmente estériles, hay zonas del cuerpo del animal como la capa mucosa superficial, las branquias y el tracto digestivo, que son ricos en diversas poblaciones bacterianas, que difieren según el pez sea de aguas cálidas o frías. Después de la muerte del pez se produce la difusión de dicha microbiota hacia otros tejidos, lo que originará el deterioro de la calidad del producto.

Asimismo, la velocidad de alteración se verá influenciada en gran medida por toda una serie de factores extrínsecos al propio animal, entre los que cabe destacar el hábitat (localización geográfica, temperatura del agua, estación del año, etc.), el método de captura, el tiempo que transcurre desde la captura hasta que el pescado es sometido a cualquiera de los procesos de preservación y la manipulación a que se ve sometido a bordo. De entre todos ellos, el método de captura y su manipulación inmediatamente posterior, son las causas decisorias a la hora de acelerar o no los cambios post-mortem del pescado. En la Ilustración 2 se mencionan de forma esquemática las distintas vías a través de las cuales las especies marinas pueden sufrir alteración post-mortem.



**Ilustración 2: Vías de alteración de las especies marinas**

#### **1.4- Alimentos derivados de las especies marinas**

Debido a la facilidad y a la rapidez con la que se suceden las distintas vías de alteración en los productos marinos, se han diseñado distintos tipos de estrategias con el fin de inhibir y ralentizar los mecanismos por los que se suceden las distintas vías de alteración. El objetivo fundamental de estas estrategias es el de ofrecer al consumidor un producto de alta calidad nutricional, sensorial y al mismo tiempo seguro. Estas estrategias son aplicadas después de la captura.

En función del grado de transformación a la que se somete a la especie marina, se pueden distinguir los siguientes tipos de procesos:

- ❖ De menor grado de transformación: Las características originales de la especie de partida se mantienen, o al menos, se intentan mantener; es el caso de los productos refrigerados y congelados.
- ❖ De mayor grado de transformación: Suponen un cambio drástico en la composición y el aspecto externo del producto; nos referimos a los procesos de secado, salazonado, ahumado, enlatado y pre-cocinados.

Por otra parte, en función de la propia estrategia seguida para detener la alteración, los métodos aplicados pueden dividirse en tres grupos: Aquellos que aplican frío (refrigeración, congelación), los que aplican calor (cocción, enlatado, ahumado) y los que se basan en la reducción de la actividad de agua (salado, secado).

Actualmente se presta gran atención a los denominados alimentos listos para consumir (“ready-to-eat”) o pre-cocinados. Son una solución estratégica para promover el consumo de alimentos altamente perecederos como los marinos y a

la vez adecuarse a la demanda actual de los consumidores. Ante las nuevas necesidades que plantea el ritmo de vida moderno, la industria alimentaria ha reaccionado rápidamente, ampliando considerablemente el surtido de dichos productos: filetes de pescado, hamburguesas, anillas de calamar rebozadas, etc. La elaboración de estos productos implica una serie de transformaciones y tratamientos, que pueden ser aplicados de forma individual o combinada, entre los que se pueden mencionar el tratamiento térmico, rebozado, envasado en atmósferas protectoras, conservación en frío, etc. Todo ello enfocado a que los productos preparados mantengan su calidad nutritiva y su calidad sensorial (Gopinath y col., 2007).

## **2- CONSERVACIÓN EN REFRIGERACIÓN DE ESPECIES MARINAS**

### **2.1- La refrigeración como estrategia de conservación**

Al comienzo de esta memoria se comentó la importancia de los productos marinos en la alimentación por ser una fuente valiosa de proteínas y otros nutrientes. Sin embargo, si estos productos no son manipulados y elaborados correctamente, se puede producir una importante pérdida de sus valores nutricionales y sensoriales, con la posibilidad de dejar al consumidor expuesto al riesgo de sufrir una intoxicación alimentaria.

Debido a que el deterioro post mortem posee una cinética elevada, las condiciones de conservación a bordo ejercen un gran efecto sobre la calidad del producto (Ashie y col., 1996). Así, tanto la manipulación cuidadosa e higiénica como la conservación adecuada, resultan ser parámetros clave para garantizar la salubridad del producto, ya que los daños innecesarios originados durante la

manipulación del producto, tales como cortes y heridas, pueden facilitar el acceso de bacterias acelerando la pérdida de calidad.

El pescado, tras su muerte y posterior conservación, pasa por cuatro fases de deterioro, independientemente de la temperatura de refrigeración a la que se trabaje:

- *Pre-rigor*: en la que el pescado presenta unas características sensoriales externas máximas, destacando su textura firme y elástica. Comienzan los procesos autolíticos de alteración.
- *Rigor mortis*: el cuerpo del pescado pierde flexibilidad, volviéndose totalmente rígido y duro; es el mejor síntoma de frescura. Continúan los procesos autolíticos del deterioro.
- *Post-rigor*: cuando la carne del pescado se encuentra flácida, ligeramente firme pero con una pérdida clara de elasticidad. Comienza el deterioro bacteriano.
- *Alteración*: el deterioro bacteriano es evidente. El pescado presenta una carne más blanda y olor desagradable (Rodríguez & Pascual, 2002).

Las modificaciones que va sufriendo el pescado en su proceso de alteración hasta convertirse en un producto pútrido son fácilmente identificables. Los cambios a nivel de apreciación visual pueden describirse de la siguiente manera:

- Su característico aspecto brillante se torna pálido y adquiere una tonalidad parda, amarilla, o de aspecto sucio.
- La capa viscosa de la superficie aumenta, especialmente en las aletas y branquias

## I-INTRODUCCIÓN

- Los ojos van hundiéndose y arrugándose de modo gradual; las pupilas se enturbian y la córnea se vuelve opaca.
- El músculo se ablanda, expulsa jugo al ser oprimido y se hunde fácilmente al ser presionado.
- La columna vertebral puede separarse del músculo con facilidad, sobre todo cerca de la cola.
- Se desarrolla una coloración pardo-rojiza como consecuencia de la oxidación de la hemoglobina.

Mientras tanto, se produce una sucesión de olores. El olor a fresco y algas marinas da paso a un olor dulce seguido de olor a pescado en malas condiciones, debido fundamentalmente a la presencia de trimetilamina (TMA). Seguidamente, este olor se vuelve de tipo amoniacal. Finalmente, el olor es pútrido debido a la presencia de sulfuro de hidrógeno, indol y otras sustancias con olores desagradables.

La refrigeración es una técnica de conservación alimentaria basada en la reducción de la temperatura de los alimentos y mantenerla por encima del punto de congelación entre 8°C y -1°C. El efecto producido por el frío provoca la ralentización de las reacciones químicas y enzimáticas; además, se crean condiciones disgenéticas para el crecimiento y desarrollo de la microbiota alteradora. Para que la refrigeración sea efectiva es necesario que la materia prima sea de buena calidad, por lo que debe aplicarse inmediatamente después del sacrificio y ser lo más rápida posible. Sin embargo, el descenso de la temperatura no es tan grande como para detener por completo las acciones bacteriana, química y enzimática, por lo que los fenómenos de degradación no se evitan completamente. El factor temperatura resulta de especial importancia de

cara a frenar la velocidad de descomposición del pescado, ya que la velocidad con que se desarrollan las distintas vías de alteración depende de la temperatura. Sin embargo, se acepta que la refrigeración lleva a un alargamiento de la vida útil de los alimentos, con una mínima repercusión en sus características nutritivas y organolépticas.

## **2.2- Vías de alteración durante la conservación en refrigeración**

Al final de la sección 1.2 se expusieron las vías de alteración susceptibles de actuar sobre los alimentos en general. En el caso de la conservación en refrigeración, no todas estas vías tienen la misma importancia. Para la mayoría de las especies marinas podemos destacar las tres siguientes: autólisis, actividad microbiana y oxidación lipídica (Gram, 1992; Kraft, 1992). En los siguientes apartados se menciona lo más característico de ellas en relación con la conservación en refrigeración.

### **2.2.1- Autólisis**

Durante el periodo de vida de las especies marinas, éstas son portadoras de enzimas que desarrollan una actividad fundamental para el desarrollo vital del organismo del que forman parte. Al producirse la muerte, siguen presentes en el cuerpo pero su actividad pasa a realizarse de forma desordenada, detectándose reacciones de tipo hidrolítico y oxidativo. La autólisis significa “auto-digestión” y se ha encontrado que los cambios autolíticos son los responsables de las primeras etapas de la degradación del pescado. Este tipo de cambio puede afectar a distintos tipos de constituyentes:

### **a) Autólisis de los carbohidratos**

El glucógeno es el componente fundamental en las especies marinas dentro del grupo de los carbohidratos. En el momento de la muerte, el suministro de oxígeno al tejido muscular se interrumpe porque la sangre deja de ser bombeada por el corazón y no circula a través de las branquias, dónde en los peces vivos es enriquecida con oxígeno. Por ello, la hidrólisis de glucógeno es la única ruta posible para la producción de energía en el momento que el corazón deja de latir, llegándose a la formación y acumulación de ácido láctico. Como consecuencia, el pH en el músculo disminuye, alcanzándose valores comprendidos entre 6,1-6,5 (Huss, 1998). Esto contribuye a proporcionar al pescado un periodo (“rigor mortis”) de estabilidad microbiológica después de su muerte (Pascual & Calderón, 2000). Sin embargo, este estado de “rigor mortis” dura un tiempo relativamente corto (12-36 horas, según la especie y otros factores). Asimismo, la presencia del ácido láctico acelera otros tipos de reacciones autolíticas, debido a la reducción del pH y a la ruptura de las membranas celulares que liberan las enzimas contenidas en sus lisosomas (proteasas y lipasas, especialmente).

### **b) Degradación de los nucleótidos**

Después de la muerte del pescado, el trifosfato de adenosina (ATP) no puede ser resintetizado y sigue una ruta degradativa.

Por medio de una serie de reacciones de desfosforilación y desaminación, el ATP se degrada para formar difosfato de adenosina (ADP), monofosfato de adenosina (AMP), monofosfato de inosina (IMP), inosina (Ino) e hipoxantina (Hx); esta ruta catabólica se debe fundamentalmente a la acción de enzimas autolíticas (Surette y col., 1988). La degradación de los catabolitos del ATP procede de la

misma forma en la mayoría de los peces, pero la velocidad de cada reacción (de un catabolito a otro) varía enormemente entre especies.

La determinación de los nucleótidos, especialmente el ATP y los productos de su hidrólisis, sirven a menudo de índices de calidad del pescado post-mortem, dado que su degradación es un proceso bioquímico endógeno independiente de la actividad bacteriana. Así, Saito y col. (1959) establecieron el índice K de frescura, que proporciona una puntuación de frescura relativa, basada en los cambios autolíticos que tienen lugar durante la conservación post mortem del músculo. Este índice mide la relación entre la cantidad de Ino, Hx y el contenido total de los compuestos relacionados con el ATP. Cuanto más alto es el valor de K, menor nivel de frescura, y viceversa. La degradación de nucleótidos coincide con los cambios percibidos en la frescura pero no está relacionada con el deterioro del pescado, entendiendo por éste, la actividad microbiana y el desarrollo de la oxidación lipídica (Hughes & Jones, 1996).

### **c) Desarrollo de proteólisis**

Se ha encontrado un gran número de enzimas proteolíticas distribuidas en los tejidos, el aparato digestivo y en el músculo esquelético. Estas enzimas contribuyen a la degradación post-mortem de los productos pesqueros durante su conservación y procesado (Ghaly y col., 2010).

La proteólisis es la degradación de las proteínas durante la conservación inadecuada del pescado. Por otro lado, como consecuencia de la autólisis de las proteínas musculares, se produce un aumento en la concentración de péptidos y de aminoácidos libres, lo que unido a condiciones favorables de temperatura y pH da lugar a un crecimiento bacteriano; la acción enzimática asociada a estas

bacterias degrada los aminoácidos, provocando su descarboxilación y originando la acumulación en el músculo del pescado de diferentes tipos de aminas biógenas.

En los lisosomas se encuentran localizadas proteasas ácidas llamadas catepsinas que generalmente se encuentran inactivas dentro del tejido vivo; al ser liberadas postmortem dentro de los fluidos celulares (Huss, 1998), son susceptibles de originar la degradación de las proteínas en péptidos y aminoácidos (Aoki & Ueno, 1998). Otro tipo de proteasas intracelulares asociadas a la autólisis del músculo del pescado son las calpaínas o proteasas activadas por calcio, que son activas a pH fisiológico; esto da una idea de su efecto directo sobre el ablandamiento del pescado durante la conservación refrigerada. Muramoto y col. (1989) demostraron que las calpaínas de pescado degradan la miosina y son mucho más activas a bajas temperaturas que las catepsinas.

### **d) Desarrollo de lipólisis**

El pescado es portador de un gran contenido en enzimas (lipasas, fosfolipasas, etc.) susceptibles de hidrolizar las clases lipídicas de peso molecular relativamente elevado (triglicéridos y fosfolípidos, fundamentalmente), llevando a la formación de ácidos grasos libres. La presencia en el alimento de tales ácidos grasos no significa un descenso en el valor nutricional ni sensorial, mientras no se llegue a valores muy elevados. Sin embargo, por tratarse de moléculas de peso molecular relativamente pequeño, son más reactivas, pudiendo interaccionar con otros constituyentes. En el caso de interaccionar con las proteínas se puede llegar a un descenso en el valor nutricional. Asimismo, se ha observado que los ácidos grasos libres son claramente más susceptibles a experimentar oxidación lipídica

que clases lipídicas de peso molecular superior. Esto se hace especialmente importante en las especies marinas debido a su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de cadena larga.

De todo ello se deduce la importancia en minimizar el contenido de este tipo de lípidos. Por otra parte, la determinación de su contenido ha demostrado ser un índice válido para el seguimiento del grado de alteración de un producto.

### **2.2.2- Actividad microbiana**

La actividad microbiana es considerada la vía de alteración de mayor repercusión sobre la pérdida de calidad de las especies marinas durante su conservación en refrigeración. Esto se debe en buena medida a que dichas especies presentan una serie de factores intrínsecos con una gran influencia en el desarrollo bacteriano y que pueden desglosarse en:

- Su naturaleza poiquiloterma, que permite el crecimiento de bacterias con rangos de temperaturas amplios.
- Elevado pH muscular post-mortem (>6,0), debido al bajo contenido en carbohidratos y la relativa escasa formación de ácido láctico post mortem. Este hecho, combinado con otros factores, permite el crecimiento de bacterias sensibles al pH, como es el caso de *S. putrefaciens* que sólo crece a pH mayores de 6.
- Alto contenido en compuestos nitrogenados no proteicos (NNP), constituidos principalmente por aminoácidos libres y nucleótidos, que suponen un sustrato fácil para el crecimiento de las bacterias.

## I-INTRODUCCIÓN

- La descomposición del azufre contenido en los aminoácidos cisteína y metionina es particularmente importante en la degradación, porque causa malos olores y sabores debido a la formación de sulfuro de hidrógeno y metilmercaptano, respectivamente (Herbert & Shewan, 1975,1976).
- Presencia de OTMA, que actúa como aceptor final de electrones en la respiración anaerobia de diversas bacterias específicas de la degradación. El resultado de su descomposición es la aparición de malos olores y sabores debido a la formación de TMA (Gram & Huss, 1996).

En lo que se refiere a factores extrínsecos, la población y composición de la microbiota del pescado están influenciadas por el ambiente de la zona de captura, la época del año, las condiciones de pesca, la manipulación y el procesado (Shewan, 1962). La temperatura es el factor ambiental más importante de los que influyen en el número inicial y tipo de bacterias en la superficie del pescado. Las poblaciones bacterianas típicas de los peces de aguas templadas son fundamentalmente psicrófilas que viven en aguas de temperaturas inferiores a 10°C. Sin embargo, la temperatura del agua superficial puede aumentar si se prolonga el tiempo cálido, con lo que las especies pelágicas (por ejemplo el jurel, la caballa o el arenque) pueden ver aumentada su carga bacteriana superficial mesófila (Gram y col., 1987).

La gran mayoría de los microorganismos se encuentran en las superficies externas (piel y branquias) y en los intestinos de los peces vivos. Muchos de estos microorganismos son potenciales agentes de alteración. Las bacterias predominantes en piel y branquias son aerobias facultativas, en especial del género *Vibrio*, que también se han aislado en gran número en los peces pelágicos. Las bacterias anaerobias obligadas son poco frecuentes en la

superficie del pescado pero se presentan en gran número en el intestino. Poco después de la muerte del pez, las bacterias comienzan a invadir los tejidos ya que se pierden los sistemas de defensa naturales (Burgess y col., 1965). Una gran parte de las bacterias presentes en el pescado deteriorado no desempeñan ningún papel en su alteración (Makarios-Aham & Lee, 1993). Cada especie posee sus propias bacterias específicas del deterioro.

La microbiota del pescado que se altera consta de bacilos psicrófilos Gram negativos, pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Psychrobacter* (*Moraxella*), *Shewanella* y *Flavobacterium* (Gram y col., 1987; Huss, 1998; Jay, 1971). Dado su carácter psicrófilo, son capaces de crecer entre 0 y +1°C pero hay un gran número de especies de *Pseudomonas* que son capaces de alterar el pescado a una temperatura de -3°C, aunque la velocidad sea lenta (Shaw & Shewan, 1968). Así, los psicrófilos son los microorganismos dominantes y los principales causantes de la alteración en los alimentos refrigerados. Aunque los tiempos de generación de los microorganismos psicrófilos son bastante largos, su metabolismo es relativamente activo a temperaturas de refrigeración, destacando la producción y actividad de enzimas hidrolíticas (como proteasas y lipasas).

El crecimiento de bacterias consumidoras de oxígeno ocasiona la formación de nichos anaeróbicos o microaerófilos en el pescado. Esto sin embargo, no favorece necesariamente el crecimiento de bacterias anaeróbicas. Algunas de las bacterias presentes en el pescado son capaces de llevar a cabo el proceso respiratorio en anaerobiosis empleando moléculas distintas al oxígeno como aceptores finales de electrones, siendo típico de las bacterias específicas del deterioro del pescado emplear el OTMA como aceptor de electrones durante la respiración anaeróbica.

## I-INTRODUCCIÓN

La reducción del OTMA está asociada a bacterias típicas del ambiente marino, tales como *Shewanella putrefaciens*, *Aeromonas spp.*, *Enterobacteriaceae*, *P. phosphoreum* y *Vibrio spp.*, obtienen energía mediante la reducción del OTMA a TMA, generándose sabor amoniacal (Gram & Dalgaard, 2002). El componente reducido, la TMA, es uno de los compuestos dominantes del pescado deteriorado y el responsable del desagradable y típico olor a pescado conservado en malas condiciones (Boskou & Debevere, 1998). En muchas especies de pescado el desarrollo de la TMA es paralelo a la producción de hipoxantina.

Otro tipo de moléculas relacionadas con la actividad microbiana son las aminas biógenas. Su formación se lleva a cabo a partir de aminoácidos libres, mediante catálisis de enzimas bacterianas. Entre ellas es de destacar la histamina, junto a putrescina, cadaverina, triptamina, agmatina, etc. El contenido en aminas biógenas es útil para la estimación del grado de descomposición del pescado, (Mackie, 1997), ya que en los peces recién capturados, la concentración de estas aminas es muy bajo o prácticamente indetectable. Cabe destacar, por su importancia clínica, la histamina (formada a partir de la descarboxilación del aminoácido histidina). El envenenamiento por histamina es una intoxicación de origen alimentaria producida por el consumo de alimentos con niveles elevados de esta amina biógena. Se asocia normalmente con el consumo de escómbridos (atún, albacora, bonito, bacoreta, caballa, etc.) conservados en malas condiciones (Taylor, 1986); de ahí su nombre “envenenamiento o intoxicación por escómbridos”. Pero también puede ser debida al consumo de pescado no perteneciente al grupo de los escómbridos, como sardinas, arenques, etc., o

incluso de otros alimentos como quesos, productos cárnicos, vino, etc. (Brink y col., 1990).

Finalmente, numerosos microorganismos alterantes pueden producir lipasas extracelulares que catalizan la hidrólisis de los ésteres de glicerol llevando a la formación de ácidos grasos libres. La producción de lipasas de origen microbiano puede limitarse o inhibirse si en el medio están presentes carbohidratos, lípidos y proteínas del tejido muscular (Alford y col., 1971; Kraft, 1992). Por ello, es necesario que se haya agotado la glucosa de la superficie muscular con el fin de que se produzca la actividad lipolítica microbiana (Gill, 1982).

### **2.2.3- Oxidación de la fracción lipídica**

La naturaleza esencialmente insaturada de los lípidos de las especies marinas las convierte en sustancias especialmente susceptibles a sufrir oxidaciones. La oxidación lipídica tiene lugar cuando los ácidos grasos insaturados reaccionan con el oxígeno del aire durante la conservación o procesado del pescado. Estas reacciones han acaparado una gran atención por tener una gran incidencia sobre la calidad y el valor nutritivo del producto, al originarse sabores y olores desagradables de tipo rancio (Frankel, 1991; Harris & Tall, 1994).

La oxidación lipídica es un proceso autocatalítico que transcurre a través de la formación de radicales libres. Una vez producido el primer ácido graso portador de un radical libre, su reactividad con el oxígeno provoca su rápida conversión en radicales de tipo peróxido. Estos compuestos se transforman en hidroperóxidos (productos primarios de oxidación) por interacción con moléculas de ácidos grasos insaturados. Éstos, son inestables y además de originar radicales libres,

pueden sufrir otro tipo de transformaciones dando lugar a una serie de productos de oxidación secundarios (aldehídos, cetonas, alcoholes, etc.). Por último, tanto los productos primarios como los secundarios de la oxidación lipídica (de carácter electrófilo todos ellos), pueden reaccionar con componentes nitrogenados (de carácter nucleófilo) del alimento dando lugar a los denominados productos de oxidación terciarios que son portadores de propiedades fluorescentes y de pardeamiento. Esta interacción resulta especialmente importante en el valor nutricional ante la posible pérdida de aminoácidos y ácidos grasos del tipo esencial.

Es necesario mencionar que en el proceso de oxidación lipídica actúan de forma conjunta dos vías de alteración mencionadas en la Ilustración 2. Dado que la oxidación lipídica es un proceso favorable termodinámicamente, pero no cinéticamente, es necesaria la participación de un catalizador. Este papel puede ser desempeñado por una enzima endógena (lipoxigenasas, peroxidasas y oxidasas), o bien puede ser llevado a cabo por agentes del tipo metales (especialmente de transición), luz, calor, etc. En el primer caso nos encontraríamos con la oxidación de tipo enzimática, mientras que en el segundo se trataría de una oxidación no enzimática. El desarrollo de ambas se superpone durante la alteración de un producto, llevando a productos de oxidación muy similares.

### **2.3- Refrigeración tradicional en hielo en escamas**

El empleo de hielo en escamas es el método más utilizado en los países desarrollados como método de refrigeración para la conservación de productos marinos en estado fresco. Mediante su aplicación, se consigue enfriar con rapidez

el producto, alcanzándose temperaturas ligeramente superiores a 0°C (Heen, 1982) y así extender su vida útil. Este sistema de refrigeración ofrece numerosas ventajas tales como ser es inocuo, fácil de transportar y relativamente barato. Resulta especialmente apropiado para la refrigeración del pescado. Con este método, la transferencia de calor se produce por contacto directo del pescado con el hielo, por conducción entre piezas adyacentes y por el agua de fusión que se desliza sobre la superficie del pescado. El agua de fusión fría, absorbe el calor del pescado y al fluir sobre el hielo se vuelve a enfriar. Así, la mezcla pescado-hielo, no sólo reduce el espesor del estrato de pescado a enfriar, sino que, además, favorece el enfriamiento mediante convección entre el agua de fusión y el pescado. Tan pronto como se coloca el hielo en escamas sobre el pescado caliente, el calor de éste fluye hacia el hielo derritiéndolo. Este proceso continúa mientras exista una diferencia de temperatura entre ambos, siempre que exista hielo suficiente. Toda fusión *a posteriori* se deberá al calor procedente de otras fuentes, por ejemplo, aire caliente circundante durante el posterior periodo de conservación.

A pesar de su amplia utilización, el sistema refleja una serie de inconvenientes tales como:

- ❖ El grado de limpieza puede no ser adecuado en todos los casos.
- ❖ La transmisión de calor es mejorable, ya que deja espacios de aire entre el hielo y el producto, de manera que no lo rodea completamente.
- ❖ Es un sistema difícil de automatizar.
- ❖ Requiere de un espacio de conservación relativamente grande.

- ❖ Control de otros parámetros como temperatura, humedad relativa y purificación y circulación del aire de la cámara. En el caso de temperatura y humedad, se ha visto que cada especie requiere unas condiciones óptimas de conservación en refrigeración.

Como resultado, en las últimas décadas se han buscado nuevos métodos que permitan mejorar las carencias del hielo tradicional con el fin de mejorar la calidad de los productos de la pesca refrigerados. De estos otros métodos o estrategias avanzadas se realizará una breve descripción en la siguiente sección.

### **3- APLICACIÓN DE OTROS METODOS O ESTRATEGIAS PARA LA REFRIGERACIÓN DE ESPECIES MARINAS**

En el momento de la descarga en puerto, es posible que la carga de pesca conservada en la bodega lleve varios días en refrigeración. Este tiempo a bordo se hace especialmente importante en aquellas especies que son capturadas en alta mar por la denominada flota de altura. Además, si a esto le añadimos un proceso poco organizado, posible interrupción de la cadena de frío y una manipulación inadecuada del producto, se acentuarán los signos de deterioro con la consiguiente disminución de su vida útil. Por ello, gran parte de la captura, sobre todo si procede de bancos de peces especialmente lejanos o si se trata de especies de corta vida, puede que ya no estén en condiciones para la venta, lo que se traduce en pérdidas económicas para el sector. Tal y como se viene comentando, los productos marinos constituyen un grupo de alimentos altamente perecederos, y el nivel de su deterioro está directamente relacionado con las condiciones de conservación.

Con el fin de retardar los daños en el pescado tan pronto como sea posible, se han ensayado distintas estrategias al objeto de mejorar el sistema básico de conservación en hielo tradicional mencionado en la sección anterior. Entre estos métodos, clásicos y avanzados, se pueden mencionar el agua de mar refrigerada, hielo líquido, hielo líquido con ozonización y sistemas de refrigeración que combinan hielo en escamas con tratamientos químicos (Toledo-Flores & Zall, 1992; Ashie y col., 1996). A continuación se comentan las características de cada uno de estos sistemas de refrigeración.

### **3.1- Agua de mar refrigerada**

El agua de mar refrigerada (AMR), no ha desplazado al hielo en escamas pero es utilizada en algunas pesquerías como medio de enfriamiento. Consiste en agua de mar enfriada a una temperatura inferior a 0°C y en algunos casos se utiliza una salmuera de aproximadamente la misma salinidad que el agua de mar.

Este sistema ofrece una serie de ventajas con respecto al hielo en escamas como:

- ❖ Enfriamiento más rápido
- ❖ Menor presión ejercida sobre el pescado
- ❖ Posibilidad de una temperatura de conservación más baja
- ❖ Manipulación más rápida de grandes cantidades de pescado con un tiempo de demora corto
- ❖ En algunos casos, mayor tiempo de conservación.

Pero este método posee también una serie de inconvenientes, como puede ser la excesiva absorción de sal por parte del producto, la absorción de agua por

especies de bajo contenido lipídico, la pérdida de proteínas hidrosolubles, incremento de la actividad de las bacterias anaerobias de putrefacción y la modificación de características sensoriales tales como la decoloración de las branquias y la opacidad de la piel.

Los sistemas AMR han mostrado eficacia en los siguientes casos:

- ❖ Cuando las desventajas de la absorción de sal no son importantes, pudiendo almacenarse así la captura durante períodos relativamente largos.
- ❖ En el enfriamiento de las especies de utilización industrial, ya que permite llevar a cabo viajes largos, mejorar la manipulación y reducir las pérdidas.
- ❖ En el enfriamiento a granel en embarcaciones donde se deben manejar con rapidez grandes cantidades de pescado.
- ❖ En el enfriamiento del pescado a granel, antes de su elaboración, evitando así el exceso de manipulación.

Por todo ello, resulta difícil generalizar la conveniencia o no de aplicar este sistema a escala comercial. Resulta aconsejable realizar, previamente a su uso, una investigación de todos los factores, teniendo en cuenta la naturaleza de la especie, su variabilidad estacional y el producto concreto que se quiere obtener al final.

### **3.2- Hielo líquido**

El hielo líquido es un método de refrigeración alternativo al hielo tradicional; representa una técnica nueva, que está tratando de introducirse en el mercado. Es un sistema binario que consiste en una suspensión de cristales de hielo

esféricos y microscópicos dispersos finamente en el seno de una solución anticongelante, de aspecto similar a un granizado, como se puede ver en la Ilustración 3.

**Ilustración 3: Hielo líquido**



Presenta una alta capacidad de intercambio térmico (mayor de 60 Kcal/kg), claramente superior a la del agua (1 Kcal/kg). El hielo líquido es producido mediante un proceso que remueve continuamente el hielo creado,

quedando suspendido en forma de cristales microscópicos dentro de la solución. La proporción hielo/agua de trabajo es variable, oscilando en el intervalo 20-40% en función de la especie marina a conservar. El contenido en sal de la disolución de partida suele coincidir con el del agua marina, aunque la tecnología permite modificar este parámetro. El sistema de producción de hielo líquido consiste en una fuente de enfriamiento susceptible de substituir la utilización de las máquinas convencionales productoras de hielo en eslabones del sector pesquero tales como conservación de la pesca en alta mar, manipulación en lonjas y climatización y conservación en grandes superficies de alimentación.

Las ventajas derivadas de la utilización del hielo líquido frente al hielo tradicional en escamas pueden resumirse de la siguiente forma:

- ❖ Permite mantener temperaturas inferiores a 0°C para la conservación en refrigeración del pescado, por encima del punto inicial de congelación; esto se traduce en un retardo de las reacciones microbianas, químicas y enzimáticas responsables de la alteración del producto.

- ❖ La conductividad térmica del hielo líquido es superior a la del hielo en escamas; esto, unido al recubrimiento total de la superficie externa de las piezas a conservar, garantiza un enfriamiento más eficiente y evita pérdidas y mermas en el producto por mecanismos de desecación.
- ❖ El coeficiente de transferencia superficial de calor del hielo líquido es cuatro veces superior al del hielo en escamas, con lo que el enfriamiento se produce de un modo más rápido.
- ❖ El flujo de hielo líquido en régimen continuo provoca un efecto de lavado superficial del producto. Esto se traduce en una reducción de la carga microbiana, y contribuye a una menor difusión de microorganismos hacia el músculo a través de la piel.
- ❖ La geometría esférica de los cristales de hielo y su pequeño tamaño limitan considerablemente el daño físico sufrido por las estructuras celulares más externas de los productos de la pesca. Esto implica un mejor mantenimiento tanto en el aspecto como en la textura del producto.
- ❖ La presencia de cloruro sódico en concentraciones similares a las del medio marino permite, además de proporcionar un mayor efecto conservante, un mejor mantenimiento de la capacidad de retención de agua de la fracción de proteínas miofibrilares con respecto al hielo en escamas. Así, los tejidos conservan una mayor turgencia, obteniéndose mayores rendimientos durante el posterior procesado, bien sea durante el fileteado o durante un tratamiento o conservación posterior.

- ❖ Permite la realización de procesos en continuo, al poder automatizarse totalmente este sistema en procesos de conservación y líneas de distribución; de esta manera se consigue una mayor higiene en los procesos de manipulación del producto de la pesca y un mejor mantenimiento de la cadena de frío.
- ❖ Es una técnica versátil, ya que es susceptible de utilizarse en combinación con otros agentes conservantes, como son antioxidantes, antimicrobianos y antimelanósicos; esto permite un mayor control de las distintas vías de alteración que pueden actuar sobre los productos de la pesca.

Como principales beneficiarios de esta tecnología podemos destacar:

- ❖ La industria de la pesca y las compañías armadoras, que dispondrían de tecnología en función de sus necesidades, tanto para el procesado de especies comerciales a bordo como en tierra.
- ❖ Las lonjas, que podrían disponer de sistemas más higiénicos automatizados y controlables en comparación con los actuales sistemas de descarga y distribución de pescado fresco basados en hielo en escamas.

### **3.3- Combinación de hielo líquido con ozono**

Como ya se comentó, una de las ventajas del HL es la versatilidad de su utilización, que lo hace susceptible de combinarse con sustancias antioxidantes, antimicrobianas y antimelanósicas. Dentro de esta estrategia, una posibilidad que ha sido ensayada es la de su combinación con ozono.

En la actualidad, numerosos países, tanto europeos como en el resto del mundo emplean ozono (O<sub>3</sub>) para mantener libres de bacterias, virus, mohos y

## I-INTRODUCCIÓN

olores las bodegas y refrigeradores de distintos tipos de alimentos como quesos, huevos, carnes, pescados, frutas, etc., pudiéndose así prolongar su tiempo de conservación.

La ozonización está ampliamente reconocida como una tecnología práctica y económica para lograr una desinfección general y poder conseguir condiciones óptimas tanto en la elaboración como en la conservación de productos en la industria alimentaria. Se debe hacer especial mención a la aplicación del ozono en las bodegas de congelación o conservación de pescado en los barcos pesqueros. También es importante recordar que uno de los problemas más importantes en la logística de los buques es el consumo de agua potable. Con una ozonización adecuada se eliminan todos los mohos existentes en el depósito y además se consigue la esterilización del agua.

La ozonización del agua de mar a bordo del barco pesquero y la conservación del pescado capturado bajo hielo esterilizado con ozono es susceptible de eliminar la microbiota superficial en el pescado a medida que el hielo se funde. Una vez en el puerto, la conservación del pescado en hielo preparado con agua ozonizada continuará su labor de preservación gracias a la pequeña cantidad de ozono que se libera del hielo a medida que éste se funde; de esta manera, se mantendrá la población microbiana en niveles bajos.

A las ventajas del hielo líquido, citadas en el apartado anterior, se le añaden ahora las propiedades de esterilidad y de eliminación de olores que confiere el ozono. Existe abundante bibliografía acerca de las propiedades bactericidas del ozono y de su efectividad contra microorganismos Gram negativos y Gram positivos. El elevado potencial de oxidación del ozono, hace que sea una sustancia con un gran poder antimicrobiano. La destrucción de los

microorganismos es debida a la oxidación progresiva de los componentes vitales de la célula (Zeynep y col., 2004). Existen diversas opiniones acerca de a quién atribuir la actividad bactericida del ozono, algunos autores aseguran que es debida a la propia molécula de ozono; otros autores, sin embargo, son partidarios de asignar esta actividad a los productos resultantes de la descomposición del ozono tales como el ión radical superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroperóxido ( $HO_2^-$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ). Lo que es bien sabido, es que tanto la molécula de ozono como los productos de su descomposición destruyen microorganismos debido a que:

- ❖ El ozono oxida varios componentes de la envoltura celular, incluyendo ácidos grasos poliinsaturados, enzimas intracelulares, glucoproteínas y glucolípidos; esto provoca la pérdida de los contenidos celulares, llegándose en ocasiones a la lisis celular.
- ❖ La inactivación enzimática es uno de los mecanismos más importantes mediante el cual el ozono destruye las células.
- ❖ El ozono acuoso reacciona con los ácidos nucleicos *in vitro*, lo que apoya la idea de que el ozono daña el material nucleico dentro de la célula.

El hecho de poseer un potencial de oxidación elevado, supone, por otro lado, un inconveniente. Autores como Fukunaga (1991) y Takigiendo (2002) han demostrado el efecto perjudicial que ejerce el ozono en las proteínas de membrana, ácidos grasos poliinsaturados y fosfolípidos. Sin embargo, diversos estudios realizados en los últimos años, confirman las ventajas de combinar el sistema de refrigeración de hielo líquido con ozono, a especies como la sardina (Campos y col., 2005), besugo (Álvarez y col., 2009) y trucha arco iris (Aubourg y

col., 2009); dichos estudios no reflejaron una alteración significativa de las fracciones proteica y lipídica como resultado de la presencia de ozono.

### **3.4- Aplicación de conservantes naturales en pescado fresco**

Los conservantes alimentarios son compuestos químicos añadidos o presentes en el alimento que inhiben o retardan el crecimiento de microorganismos y previenen la oxidación, retrasando así el deterioro del producto.

En el año 1961, Tarr llevó a cabo una revisión de las investigaciones realizadas hasta el momento en relación al uso de conservantes químicos adecuados para los alimentos marinos frescos. Se probó la eficacia de muchos compuestos químicos, como los ácidos bórico y salicílico, ácido benzoico y sus ésteres, cloraminas e hipoclorito sódico, formaldehído, glicoles, peróxido de hidrógeno, fosfatos, que eran aplicados en forma de baño o bien adicionados al hielo. Sin embargo, los resultados no fueron satisfactorios debido a la escasa actividad de los compuestos aplicados en bajas concentraciones. Así, un aumento de concentración en estos compuestos implicaba un producto rechazable a nivel organoléptico, o suponía una amenaza para la salud del consumidor (Sikorski, 1994). En este sentido, los ácidos orgánicos naturales representan una opción interesante como tratamiento complementario a la refrigeración, ya que la concentración permitida aplicable en alimentación es bastante amplia.

Muchos ácidos orgánicos son usados como aditivos alimentarios, pero no todos poseen actividad antimicrobiana. Algunos estudios, sugieren que los ácidos más activos son acético, láctico, propionico, sórbico y benzoico. Otros autores incluyen además los ácidos cítrico, málico y fumárico. Estos ácidos se

caracterizan por ser ácidos débiles con valores de pKa comprendidos entre 3 y 5. A pesar de tener una estructura química diferente, los ácidos orgánicos débiles, comparten modos de acción en cuanto a su efecto antimicrobiano. Por un lado, este efecto es debido a la bajada del pH extracelular; por otro lado, la forma no disociada del ácido es la principal responsable de la inhibición del crecimiento de los microorganismos, estando ambos efectos íntimamente relacionados. Los ácidos orgánicos, en su forma no disociada, pueden atravesar la bicapa lipídica de la membrana celular, ya que en su forma no disociada son apolares. Una vez dentro de la célula, el ácido se disocia, porque el pH en el interior es mayor que en el exterior, generándose protones y acidificando el interior de la célula.

Generalmente, las bacterias mantienen el pH interno próximo a la neutralidad para evitar cambios conformacionales en las proteínas estructurales, enzimas, ácidos nucleicos y fosfolípidos. El exceso de protones en el interior celular es expulsado al exterior utilizando energía en forma de ATP, según el modelo de Lambert & Stratford (1999), ya que los protones poseen carga, y por tanto no pueden atravesar la bicapa lipídica. Finalmente, el pH intracelular es elevado a un punto en el que la célula puede reanudar su crecimiento. El tiempo necesario para llevar a cabo este aumento en el pH intracelular (*lag time*) depende del pH extracelular y de la concentración de la sustancia inhibidora.

Algunos estudios sugieren que solamente posee actividad la forma no disociada del ácido orgánico. Sin embargo, Eklund (1983) demostró que mientras el ácido no disociado posee una gran actividad antimicrobiana, el anión también contribuye ligeramente a esta actividad. Paul & Hirshfield (2003) proponen un mecanismo de acción que implica la acumulación de concentraciones inhibitorias de aniones en el citoplasma de la célula. Estas concentraciones elevadas pueden

## I-INTRODUCCIÓN

conducir a un aumento de la osmolaridad y la interferencia con los procesos metabólicos. Otra consecuencia negativa de este proceso es que para compensar este aumento de carga eléctrica negativa, la bacteria debe aumentar los niveles de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y/o glutamato, lo que lleva a un incremento de la fuerza iónica intracelular y del turgor. Este proceso provoca un gran aumento de la presión mecánica sobre la pared del microorganismo, lo que hace que estalle (Foster, 1999).

El efecto inhibitor relacionado con la forma no disociada del ácido, no tiene lugar en el caso de emplear ácidos inorgánicos fuertes, debido a que éstos se encuentran totalmente disociados en la disolución, y por tanto los compuestos polares resultantes no pueden atravesar la membrana plasmática. Por eso la actividad inhibitoria de la forma no disociada depende de la polaridad y del tamaño de las moléculas. En este sentido, los ácidos orgánicos láctico (E-270), cítrico (E-330) y ascórbico (E-300) resultan apropiados para este fin.

Alakomi y col. (2000) comprobaron el efecto inhibitor ejercido por el ácido láctico sobre el crecimiento de bacterias Gram-negativas, conocidas por ser el grupo responsable del deterioro del pescado. Tratamientos previos con ácido láctico en filetes de pescado (Kim y col., 1995; Metin y col., 2001; Erkan & Mol, 2004), pescado rebozado (Gogus y col., 2006) y rodajas de pescado (Sallam, 2007), pusieron de manifiesto la eficacia en la conservación y extensión de la vida útil de los productos marinos.

Además de propiedades antimicrobianas, los ácidos ascórbico y cítrico, así como sus sales, son conocidos por su papel como quelantes, acidulantes en sistemas biológicos y sinérgicos de antioxidantes primarios. Su efecto ha sido probado en pescado desmenuzado, (Hwang & Regenstein, 1995; Stodolnik y col.,

1992), filetes de pescado (Badii & Howell, 2002; Kilinc y col., 2009; Pourashouri y col., 2009) y piezas enteras (Aubourg y col., 2004).

Sin embargo, cuando estos ácidos se aplican por encima de ciertas concentraciones o durante tiempos prolongados, existen evidencias de digestión del pescado, con el consiguiente deterioro sensorial (ataque a piel y ojos, especialmente) y de las propiedades físicas del mismo (Kim y col., 1995; Metin y col., 2001). Estos posibles inconvenientes deben ser evitados mediante un estudio previo de optimización de la concentración empleada de los ácidos conservantes.

### **3.5- Aplicación de aceites esenciales en productos marinos refrigerados**

En la actualidad, existe una demanda creciente por parte del consumidor, de productos alimentarios frescos sin aditivos sintéticos. Por lo que, tanto investigadores como la industria de la alimentación, han mostrado un fuerte interés por el uso de conservantes naturales de amplio espectro como alternativa a los aditivos químicos sintéticos. Para la preservación de los productos de la pesca, se han sugerido varios métodos de bioconservación, tales como el uso de bifidobacterias o extractos naturales de plantas. Estos tratamientos no sólo se están probando en el pescado fresco, sino también en alimentos como el pollo (Royo y col., 2010). En la actualidad, se están implementando nuevos métodos de aplicación de sustancias antimicrobianas a los alimentos, ya sea mediante películas de embalaje o añadidos al rebozado, como es el caso de los langostinos (Yerlikaya y col., 2008), con el fin de aplicar altas concentraciones de conservantes en la superficie de los alimentos. De este modo se consigue, por

tanto, aumentar el periodo de conservación de los mismos (Gennadios & Kurth, 1997).

El deterioro de los productos marinos elaborados es muy rápido, sobre todo debido a las etapas de pre-elaboración en las que el acceso de microorganismos al producto puede verse facilitado. Además, dicha calidad puede verse afectada negativamente por reacciones químicas y enzimáticas de degradación. Aunque todos estos procesos de deterioro son dependientes de la temperatura, la conservación en condiciones óptimas de los mismos no está garantizada por un control estricto de la temperatura de conservación. Así, plantas como el orégano, tomillo, ajo, hoja de laurel, romero, clavo, etc., o sus extractos, conocidos como aceites esenciales, se están empleando solos o en combinación con otros métodos de conservación como EAM o la irradiación, para mejorar las características sensoriales y alargar la vida útil de los alimentos (Burt, 2004; Giménez y col., 2004; Mahmoud y col., 2004; Mejholm & Dalgaard., 2002; Miguel y col., 2004; Varelziz y col., 1997; Wong & Kitts, 2002).

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos, aromáticos y volátiles, que se obtienen a partir de materia prima de origen vegetal. Normalmente se forman en células especializadas o grupos de células de tallos y hojas, y se concentran, habitualmente, en una región particular como la corteza, las hojas o los frutos (Oussalah y col., 2006). Históricamente, han servido como agentes saborizantes en alimentos y bebidas, y debido a su contenido variable de compuestos antimicrobianos, poseen un gran potencial como agentes naturales para la conservación de alimentos. La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se asigna a una variedad de pequeños compuestos fenólicos y terpenoides que,

en su forma pura, han demostrado poseer actividad antimicrobiana (Aureli y col., 1992; Hanaa y col., 2009) y antifúngica (Aligiannis y col., 2001; Thompson, 1989).

Los aceites esenciales y sus componentes, son conocidos por mostrar actividad contra una gran variedad de microorganismos. Los aceites de orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) se encuentran entre los aceites esenciales con una mayor actividad antimicrobiana (Smith-Palmer y col., 1998; Hammer y col., 1999; Dorman & Deans, 2000; Moreira y col., 2005; Oussalah y col., 2006; Gutiérrez y col., 2008). Sin embargo, se debe tener en cuenta, que la aplicación de aceites esenciales de plantas para el control de patógenos transmitidos por alimentos y de bacterias contaminantes, requiere la evaluación previa de su eficacia en productos alimentarios o en sistemas modelo que simulan la composición de los alimentos (Glass & Johnson, 2004). Ello es debido a que, por lo general, la eficacia de muchos agentes antimicrobianos de origen natural puede verse reducida debido a interacciones con ciertos componentes de los alimentos.

Otro aspecto a tener en cuenta para la optimización del uso de aceites esenciales en los alimentos, es el impacto sobre la aceptabilidad sensorial. Si son necesarias concentraciones muy altas de aceites esenciales para conseguir una actividad antimicrobiana notable, la calidad organoléptica de los alimentos puede verse afectada; de este modo, pueden producirse olores y sabores inaceptables para su consumo (Gutiérrez y col., 2008).

Por lo tanto, para la aplicación exitosa de los aceites esenciales, las investigaciones deben centrarse en la optimización de las combinaciones de aceites esenciales y sus aplicaciones. El objetivo básico sería el de obtener una actividad antimicrobiana eficaz a concentraciones lo suficientemente bajas como

## I-INTRODUCCIÓN

para que la calidad organoléptica de los alimentos no se vea afectada negativamente.

---

**REFERENCIAS**

---

- Alakomi, H. L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattilda-Sandholm, T., Latva-Kala, K. & Helander, I. M.** 2000. Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 2001- 2005.
- Alford, J. A., Smith, J. L. & Lilly, H. D.** 1971. Relationship of microbial activity to changes in lipids in foods. *Journal of Applied Microbiology*, **34**, 133-146.
- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Chinou, I. B., Mitakou, S., Gikas, E. & Tsaibopoulos, A.** 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Wve* taxa of *Sideritis* from Greece. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **49**, 811–815.
- Álvarez, V., Feás, X., Barros-Velázquez, J. & Aubourg, P. S.** 2009. Quality changes of farmed blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) subjected to slaughtering and storage under flow ice and ozonised flow ice. *International Journal of Food Science and Technology*, **44**, 1561-1571.
- Aoki, T. & Ueno, R.** 1998. Involvement of cathepsins B and L in the post-mortem autolysis of mackerel muscle. *Food Research International*, **30**, 585-592.
- Ashie, I., Smith, J. & Simpson, B.** 1996. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **36**, 87–121.
- Aubourg, S., Pérez-Alonso, F. & Gallardo, J.** 2004. Studies on rancidity inhibition in frozen horse mackerel (*Trachurus trachurus*) by citric and ascorbic acids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **106**, 232–240.
- Aubourg, P. S., Testi, S., Sanxuás, M., Gil, C. & Barros-Velázquez, J.** 2009. Improved quality and shelf life of farmed trout (*Oncorhynchus mykiss*) by whole processing in a combined ozonised flow ice refrigeration system. *International Journal of Food Science and Technology*, **44**, 1595-1601.
- Aureli, P., Constantini, A. & Zolea, S.** 1992. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, **55**, 344–348.
- Badii, F. & Howell, N.** 2002. Effect of antioxidants, citrate, and cryoprotectants on protein denaturation and texture of frozen cod (*Gadus morhua*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 2053–2061.
- Barnabé, G.** 1989. Acuicultura. Tomos I y II. Edición española. Ed. Omega. Barcelona.

- Boskou, G. & Debevere, J.** 1998. In vitro study of TMAO reduction by *Shewanella putrefaciens* isolated from cod fillets packed in modified atmosphere. *Food Additives and Contaminants*, **15**, 229-236.
- Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M L. J. & Huisintveld, J. H.** 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology* **11**, 73-84.
- Burguess, G. H. O., Cutting, C. L., Lovern, J. A. & Waterman, J. J.** 1965. Alteración del pescado. En: El pescado y las industrias derivadas de la pesca. (Ed.) Acribia, Zaragoza, pp. 354-364.
- Burt, S.** 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Science and Technology*, **94**, 223-253.
- Campos, C., Rodríguez, Ó., Losada, V., Aubourg, S. & Barros-Velázquez, J.** 2005. Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*Sardina pilchardus*). *International Journal of Food Microbiology*, **103**, 121-130.
- Cifuentes Lemos, J. L., Torres-García, M. P. & Frías Mondragón, M.** 1997. El océano y sus recursos. Acuicultura. Volumen 11. Fondo de cultura económica. México.
- Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos.** 2008. O cooperativismo no mar. Situación Histórica e Potencialidades. <http://www.pescagalicia.com/arquivos/articulos/1720.pdf>
- Dorman, H. J. D. & Deans, S. G.** 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 308-316.
- Eklund, T.** 1983. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *Journal of Applied Bacteriology*, **54**, 383-389.
- Erkan, N. & Mol, S.** 2004. The effect of calcium lactate treatment on the shelf life and quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **55**, 73–96.
- FAO.** 2010. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma, FAO. 219P .
- Foster, J. W.** 1999. When protons attack: Microbial strategies of acid adaptation. *Current Opinion in Microbiology*, **2**, 170-174.
- Frankel, E.** 1991. Review: Recent advances in lipid oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **54**, 495-511.
- Fukunaga, K., Suzuki, T. & Takama, K.** 1991. Effect of ozone exposure on the compositions of gill and erythrocyte membrane lipids and proteins of Japanese charr (*Salvelinus leucomaenis*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **100B**, 481-487.

- Gennadios, A. & Kurth, L. B.** 1997. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: a review. *Lebensm.-Wiss. Technology*, **30**, 337–350.
- Ghaly, A. E., Dave, D., Budge, S. & Brooks, M. S.** 2010. Fish Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: Review. *American Journal of Applied Sciences*, **7**, 859-877.
- Gill, C. O.** 1982. Microbial interaction with meats. En: Meat Microbiology. (Ed.) Brown, M. H. Applied Science Publisher Ltd., Inc. NY. USA, pp. 225-264.
- Giménez, B., Roncales, P. & Beltran, J. A.** 2004. The effects of natural antioxidants and lighting conditions on the quality characteristics of gilt-head sea bream fillets (*Sparus aurata*) packaged in a modified atmosphere. *Journal of Science Food and Agriculture*, **84**, 1053–1060.
- Glass, K. A. & Johnson, E. A.**, 2004. Antagonistic effect of fat on the antibotulinal activity of food preservatives and fatty acids. *Food Microbiology*, **21**, 675–682.
- Gogus, U., Bozoglu, F., & Yurdugul, S.** 2006. Comparative effects of lactic acid, coating combined and alone applications on some postmortem quality criteria of refrigerated *Sardina pilchardus*. *Journal of Food Quality*, **29**, 658-671.
- Gopinath, S. P., Kochery Anthony, M. X., Nagarajarao, R. C., Jaganath, B. & Krishnaswamy, S. G. T.** 2007. Standardisation of process parametres for ready-to-eat squid masala in indigenous polymer-coated tin-free steel cans. *International Journal of Food Science and Technology*, **42**, 1148–1155.
- Gram, L., Trolle, G. & Huss, H. H.** 1987. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, **4**, 65-72.
- Gram, L.** 1992. Evaluation of the bacteriological quality of seafood. *International Journal of Food Microbiology*, **16**, 121-137.
- Gram, L. & Huss, H. H.** 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, **33**, 121-37.
- Gram, L. & Dalgaard, P.** 2002. Fish spoilage bacteria-problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, 262-266.
- Gutiérrez, J., Barry-Ryan, C. & Bourke, P.** 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, **124**, 91-97.

**Haard, N. F.** 1992. Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Research International*, **25**, 289-307.

**Hammer, K. A., Carson, C. F. & Riley, T. V.** 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, **86**, 985–990

**Hanna, H. Abd El-Baky, Farouk, K. El Baz, Gamal, S.E I Baroty.** 2009. Evaluation of Marine Alga *Ulva lactuca L.* as A Source of Natural Preservative Ingredient. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environment Science*, **3**, 434-444.

**Harris, P. & Tall, J.** 1994. Rancidity in fish. En: Rancidity in foods. (Eds.) J. Allen y R. Hamilton. Chapman y Hall, Londres (G. B.), pp. 256-272.

**Heen, E.** 1982. Developments in chilling and freezing of fish. *International Journal of Refrigeration*, **5**, 45-49.

**Herbert, R. A. & Shewan, J. M.** 1975. Precursor of volatile sulphides in spoiling North Sea Cod (*Gadus morhua*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **26**, 1195-1202.

**Herbert, R. A. & Shewan, J. M.** 1976. Roles played by bacterial and autolytic enzymes in the production of volatile sulphides in spoiling North sea cod (*Gadus morhua*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **27**, 89-94.

**Hughes, R. B. & Jones, N. R.** 1996. Measurement of hypoxanthine concentration in canned herring as an index of the freshness of the raw material with a comment of flavour relations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **17**, 434-436.

**Huss, H. H.** 1998. El pescado fresco: Su calidad. Documento técnico de pesca nº348. FAO. Roma. Italia.

**Hwang, K. & Regenstein, J.** 1995. Hydrolysis and oxidation of mackerel (*Scomber scombrus*) mince lipids with NaCl & NaF treatments. *Journal of Aquatic Food Products Technology*, **4**, 19–30.

**Jay, J.** 1971. Microbiología moderna de los alimentos. (Ed.) Acribia, Zaragoza, España, 320 pp.

**Kilinc, B., Cakli, S., Dincer, T. & Tolasa, S.** 2009. Microbiological, chemical, sensory, color, and textural changes of rainbow trout fillets treated with sodium acetate, sodium lactate, sodium citrate, and stored at 4°C. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **18**, 3–17.

**Kim, C. R., Hearnberger, J. O., Vickery, A. P., White, C. H. & Marshall, D.L.** 1995. Sodium acetate and bifidobacteria increase shelf life of refrigerated catfish fillets. *Journal of Food Science*, **60**, 25–27.

- Kraft, A. A.** 1992. Psychrotrophic Bacteria in Foods: Disease and Spoilage, CRC Press, Inc. Boca Raton, FL.USA.
- Lambert, R. J. & Stratford, M.** 1999. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology*, **86**, 157-164.
- Mackie, I. M.** 1997. The effects of post-mortem storage on fish muscle proteins. En "Proceedings of the Final Meeting of the Concerted Action: Evaluation of Fish Freshness". AIR3CT94 2283. FAIR, EU, pp. 185-189.
- Mahmoud, B. S. M., Yamazakia, K., Miyashitab, K., Il-Shick, S., Dong-Sukd, C. & Suzukia, T.** 2004. Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology*, **21**, 657-666.
- Makarios- Laham, I. & Lee, T. C.** 1993. Protein hydrolysis and quality deterioration of refrigerated and frozen seafood due to obligately psychrophilic bacteria. *Journal of Food Science*, **58**, 310-313.
- Mejholm, O. & Dalgaard, P.** 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, **34**, 27-31.
- Metin, S., Erkan, N., Varlik, C. & Aran, N.** 2001. Extension of shelf life of chub mackerel (*Scomber japonicus* Houttuyn 1780) treated with lactic acid. *European Food Research and Technology*, **213**, 174-177.
- Miguel, G., Simoes, M., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G. & Carvalho, L.** 2004. Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chemistry*, **86**, 183–188.
- Moreira, M. R., Ponce, A. G., Del Valle, C.E. & Roura, S. I.** 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT–Food Science and Technology*, **38(5)**, 565–570.
- Muramoto, M., Yamamoto, Y. & Seki, N.** 1989. Comparison of calpain of various fish miosins in relation to their thermal stabilities. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fish*, **55**, 917-923.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. & Lacroix, M.** 2006. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, **18 (5)**, 414–420.

**Pascual Anderson, M. R. & Calderón Pascual, V.** 2000. Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. Díaz de Santos. Madrid.

**Paul, B. & Hirshfiel, I.** 2003. The effect of acid treatment on survival protein expression of a laboratory K-12 strain *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, **154**, 115-121.

**Pedrosa-Menabrito, A. & Regenstein, J. M.** 1988. Shelf-life extensión of fresh fish: A review. I. Spoilage of fish. *Journal of Food Quality*, **11**, 117-127.

**Pérez- Martín, R., Banga, J., Sotelo, C., Aubourg, S. & Gallardo, J.** 1989. Prediction of precooking times for albacore (*Thunnus alalunga*) by computer simulation. *Journal of food Engineering*. **10**, 83-95

**Piclet, G.** 1987. Le poisson aliment: Composition, intérêt nutritionnel. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. **22**, 317-335.

**Pourashouri, P., Shabanpour, B., Aubourg, S., Daghigh Rohi, J. & Shabani, A.** 2009. An investigation of rancidity inhibition during storage of Wels catfish (*Silurus glanis*) fillets by previous ascorbic and citric acid treatment. *International Journal of Food Science and Technology*, **44**, 1503–1509.

**Rodríguez Vázquez, C. J. y Pascual López, M. C.** 2002. La alteración del pescado: los factores naturales (www.redvya.com). Red veterinaria y agropecuaria.

**Royo, M., Fernández-Pan, I. & Maté, I. J.** 2010. Antimicrobial effectiveness of oregano and sage essential oils incorporated into whey protein films or cellulose-based filter paper. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **90**, 1513-1519.

**Saito, T., Arai, K. & Matsuyoshi, M.** 1959. A new method for estimating the freshness of fish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fish*. **24**, 749-750.

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

**Shaw, B. G. & Shewan, J. M.** 1968. Psychrophilic spoilage bacteria of fish. *Journal of Applied Bacteriology*, **31**, 89-96.

**Shewan, J. M.** 1962. The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes. En: Recent Advances in Food Science. (Eds.) J. Hawthorn y Muil Leitch. J., pp. 167-193.

**Sikorski, J. M.** 1994. Tecnología de los Productos del Mar: Recursos, composición Nutritiva y Conservación. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España.

**Simopoulos, A.** 1994. Fatty acids. En: Functional foods, designer foods, pharma-foods, nutraceuticals. (Ed.) Goldberg I., New York (USA), Chapman and Hall, pp.355-392.

- Smith-Palmer, A., Stewart, J. & Fyfe, L.** 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters of Applied Microbiology*, **26**, 118–122.
- Stodolnik, L., Blasiak, E. & Broszedzka, H.** 1992. Effect of Tween 80, citric acid and acetylsalicylic acids on changes in muscle tissue lipids of Baltic herrings during storage. *Chłodnictwo*, **27**, 29–35.
- Surette, M. E., Gill, T. A. & Leblanck, P. J.** 1988. Biochemicals basis of post mortem nucleotide catabolism in cod (*Gadus morhua*) and its relationship to spoilage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **36**, 19-22.
- Takigi-Endo, M., Ono, K., Nakagawa, K., Yotsu-Yamashita, M. & Miyazawa, T.** 2002. Ozonation of PC in ethanol: Separation and identification of a novel ethoxyhydroperoxide. *Lipids*, **37**, 1007-1012.
- Tarr, H. L. A.** 1961. Chemical Control of microbiological deterioration. En: Fish as Food. (Ed.) Borgstrom, G., Academic Press, New York, pp. 639-640.
- Taylor, S. L.** 1986. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, **17**, 91-128.
- Thompson, D. P.** 1989. Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. *Mycologia*, **81**, 151–153.
- Toledo-Flores, L. & Zall, R.** 1992. Methods for extending the storage life of fresh tropical fish. En: Advances in Seafood Biochemistry. (Eds.) Flick, G., Martin, R., Technomic Publishing, Lancaster, PA (USA), pp. 233–243.
- Vareltzis, K., Koufidis, D., Gavriilidou, E., Papavergou, E. & Vasiliadou, S.** 1997. Effectiveness of a natural Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the stability of filleted and minced fish during frozen storage. *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und-Forschung*, **205**, 93–96.
- Wong, P. Y. Y. & Kitts, D. D.** 2002. The effects of herbal pre-seasoning on microbial and oxidative changes in irradiated beef steaks. *Food Chemistry*, **76**, 197–205.
- Yerlikaya, P., Gokoglu, N. & Topuz, O. K.** 2008. Use of natural plant extracts in batter coating of shrimp and their effects on the quality of shrimp during frozen storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, **34**, 127-138.
- Zynep, B. Guzel-Sydem, Annel K. Greene, A.C. Seydim.** 2004. Use of ozone in the food industry. *LWT- Food Science and Technology*, **37**, 453-460.





## II- PRESENTACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS



## II- PRESENTACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

---

El objetivo general del presente trabajo de investigación es el estudio de nuevos sistemas de refrigeración para la conservación de productos pesqueros con alto interés comercial. Se trata pues, de una mejora de los métodos de refrigeración ya conocidos, hielo en escamas y hielo líquido, sistemas estudiados con anterioridad en otros trabajos y que ocupan una gran parte de la bibliografía científica.

Para alcanzar el objetivo general planteado en esta Tesis Doctoral, este trabajo se divide en las siguientes cuatro partes diferenciadas y complementarias:

### Parte 1

Su objetivo básico es el de evaluar los efectos derivados de aplicar la tecnología del hielo líquido ozonizado sobre la calidad organoléptica, microbiológica y bioquímica de productos de acuicultura. Se estudiará como especie representativa de la acuicultura continental la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), comparando los resultados de su conservación en hielo líquido y hielo líquido ozonizado. Asimismo, se evaluarán también a nivel sensorial y microbiológico los efectos derivados de aplicar el sistema de hielo líquido ozonizado envasado, como sistema de embalaje, para enfriamiento, distribución y cocción en destino, en tres especies de moluscos bivalvos de gran interés comercial en Galicia: almeja (*Venerupis rhomboideus*), ostra (*Ostrea edulis*) y mejillón (*Mytilus galloprovincialis*).

*Esta parte se corresponde con los capítulos 1 y 2 de este trabajo, donde se evalúan las ventajas del empleo del hielo líquido ozonizado en especies de acuicultura.*

## Parte 2

Su objetivo básico es el de desarrollar un sistema de hielo en escamas a partir de una disolución comercial (BPS2) de ácidos orgánicos naturales, evaluando su influencia a distintas concentraciones como conservante en especies comerciales del Gran Sol: merluza (*Merluccius merluccius*), gallo (*Lepidorhombus whiffiagonis*) y rape (*Lophius piscatorius*). Asimismo, se evaluará el efecto de la inmersión en la mezcla de ácidos orgánicos del bacaladilla (*Micromesistius poutassou*), especie abundantemente capturada pero considerada como descarte, por su rápido deterioro a bordo y por tanto de bajo valor comercial en la actualidad.

*Esta parte se corresponde con los capítulos 3 y 4, de este trabajo de investigación, donde se evalúan las ventajas, las concentraciones y el sistema de aplicación adecuadas del empleo de la solución comercial BPS2, sobre la inhibición de los distintos mecanismos de alteración y extensión de la vida útil de especies marinas representativas y de gran importancia por su valor comercial.*

## Parte 3

Su objetivo básico es el de evaluar el sistema de hielo en escamas desarrollado a partir de una disolución de los ácidos cítrico, ascórbico y láctico

sobre la calidad microbiológica, bioquímica y sensorial de especies marinas correspondientes a la denominada pesca de bajura: jurel (*Trachurus trachurus*) y caballa (*Scomber scombrus*).

*Esta parte se corresponde a los capítulos 5 y 6 que completan la segunda parte de este trabajo, donde se evalúan las ventajas de la presencia en el hielo de estos ácidos orgánicos sobre distintos parámetros de calidad de las dos especies de bajura referidas.*

#### Parte 4

Su objetivo básico es evaluar el efecto de un tratamiento combinado de aceites esenciales de orégano y tomillo y el envasado en atmósfera modificada sobre la calidad microbiológica, sensorial y oxidación lipídica en anillas de calamar precocinadas.

*Esta parte corresponde con el capítulo 7 y última parte del presente estudio.*





### III- MATERIALES Y MÉTODOS



## III- MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 1- SISTEMAS DE PRESERVACIÓN EMPLEADOS

#### 1.1- Sistemas de refrigeración

Para la preparación de hielo tradicional en escamas (HT), se empleó un equipo F100 Compact, modelo Icematic (Caltelmac, Castelfranco, Italia).

Para obtener el hielo líquido (HL) se utilizó un prototipo FLO-ICE cedido por Kinarca S.A.U., Vigo, (Ilustración 4). La mezcla obtenida fue 40% hielo y 60% agua a  $-1.5^{\circ}\text{C}$ , a partir de agua de mar filtrada (salinidad 3,3%).

El hielo líquido ozonizado (HLO) se preparó a partir de agua de mar filtrada mediante el prototipo FLO-ICE cedido por Kinarka S.A.U (Vigo) (Ilustración 5). La composición de hielo líquido fue 40/60 hielo/agua de mar (salinidad 3,3%). El hielo líquido fue esterilizado mediante inyección de ozono. Esta inyección se logró gracias al sistema proporcionado por Cosemar Ozono (Madrid). El potencial fue ajustado a 700 mV (0,2 mg ozono/L) en la fase líquida.

Ilustración 4: Generador de HL



Ilustración 5: Ozonizador. Una fotografía de un sistema de ozonización industrial que incluye un tanque vertical, tuberías y un soporte metálico.



En el experimento de las especies bivalvas (capítulo 2), tanto el HT como el HLO fueron envasados al vacío en bolsas de polietileno. El generador de vacío empleado fue INELVI TV Series, model 2000 (INELVI, Sta. Coloma de Cervelló, Barcelona). En la Ilustración 6 se puede ver la línea de producción de HLO y posterior envasado al vacío para los moluscos bivalvos.

**Ilustración 6:**  
**Línea de producción y envasado de HLO**



## **1.2- Mezcla de ácidos orgánicos naturales**

En los capítulos 3, 4, 5 y 6 se evaluó la eficacia de ácidos orgánicos naturales (ascórbico, láctico y cítrico) como sistemas de conservación intensificadores de los mecanismos de protección del sistema de hielo en escamas. Este apartado se subdivide en las dos siguientes partes:

### **1.2.1- Fórmula comercial BPS2**

La fórmula comercial (BPS2) que incluyó una mezcla de ácidos orgánicos naturales fue proporcionada por Atlantic One, S.L (Vigo). Este producto consiste en un líquido viscoso, soluble en agua, que incluyó ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (AC) y ácido láctico (AL) (1 mequiv. ácido/120 mg de producto) en glicerol,

teniendo en cuenta la seguridad de su uso en la alimentación conforme a las administraciones americana y europea (Madrid y col., 1994; Giese y col., 1996). Esta fórmula comercial fue empleada en los estudios correspondientes a los capítulos 3 y 4.

### **1.2.2- Elaboración de hielo incluyendo ácidos naturales**

Las disoluciones acuosas preparadas en nuestro laboratorio a partir de los ácidos orgánicos naturales puros, incluyeron valores de concentración equitativos de cada uno de los ácidos (ascórbico, láctico y cítrico), las concentraciones empleadas fueron 0,005% y 0,020% en el caso del jurel y 0,05% en el caso de la caballa. Estas mezclas fueron envasadas en cajas de polietileno y mantenidas en congelación a -20°C, para obtener un tamaño de hielo común en el momento de su aplicación al jurel (capítulo 5) y caballa (capítulo 6).

Los ácidos orgánicos empleados en esta investigación son considerados seguros para uso alimentario conforme a la administración americana y europea (Madrid y col., 1994; Giese y col., 1996).

### **1.3- Cobertura con aceites esenciales**

Los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*; AEO) (densidad 0,939 g/l a 25°C y punto de ebullición 239°C) y tomillo (*Thymus vulgaris*; AET) (densidad 0,917 g/l a 25°C y punto de ebullición 195°C) fueron adquiridos de Sigma Aldrich, Madrid.

La formulación de la cobertura consistió en una mezcla 3:2 de harina y agua fría, que posteriormente se homogeneizó durante 5 min en Ultraturrax (Janke and Kunkel, Ultraturrax T25). Después de la homogeneización, se añadió a esta

### III- MATERIALES Y MÉTODOS

cobertura un volumen de aceite esencial seguido de homogenización durante 1 minuto. Posteriormente las anillas de calamar fueron sumergidas en la cobertura durante 2 minutos para posteriormente introducirse en una freidora (Fritaurus Professional 4, Taurus, Barcelona) durante 20 s y a una temperatura de  $180 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Después del paso de fritura, las anillas fueron colocadas en bandejas de plástico (20 cm x12 cm) y envasadas en bolsas retráctiles de plástico del tipo en multicapas y coextruido. La mezcla de gases constituida por 70%  $\text{N}_2$ , 25%  $\text{CO}_2$  and 5%  $\text{O}_2$  fue inyectada en cada una de las muestras en la relación 1/2 (w/v) de anillas-atmósfera. Las cajas fueron selladas inmediatamente para obtener el producto comercial RTE. Cada una de las bandejas estuvo constituida por 3 anillas de calamar, por lo que fueron necesarias 24 bandejas en el caso del primer experimento con AEO, y 18 bandejas para el segundo experimento con AET.

## 2- MATERIA PRIMA DE ESPECIES MARINAS, PROCESAMIENTO Y MUESTREO

### 2.1- Trucha arco iris

La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) se denomina así por las numerosas manchas irisadas en su piel. Es la principal especie acuícola de la acuicultura europea, elegida por su alta resistencia y rápido crecimiento.

**Ilustración 7. *Oncorhynchus mykiss*****Nombre inglés: Farmed Trout****Nombre gallego: Troita arco da vella**

Un total de 108 ejemplares de trucha arco iris de cultivo procedentes de Isidro de la Cal (Coruña, España). La longitud de dichos ejemplares estaba comprendida entre los 25 y 30 cm y su peso osciló entre los 0,23 y 0,33 kg.

La mitad de estos individuos fueron sacrificados en la piscifactoría mediante inmersión durante 20 minutos en HL y la otra mitad en HLO. Ambos tratamientos fueron empleados como sistemas de refrigeración para su traslado al laboratorio durante 2h, en una proporción pescado: hielo 1:1 y a una temperatura de 0°C. Una vez allí, los especímenes fueron colocados en una habitación isoterma a 1°C con sus correspondientes sistemas de refrigeración.

A día 1, se tomaron para análisis nueve muestras de cada uno de los lotes y se dividieron en tres grupos (tres individuos en cada grupo), que se estudiaron independientemente (n=3). En cada día de análisis, se tomaron tres lotes, con tres individuos por lote, para cada sistema de refrigeración. Las tomas de muestra se llevaron a cabo en los días 1, 3, 6, 9, 13 y 16 de los días de almacenamiento en refrigeración. Las mezclas de hielo fueron renovadas cuando fue requerido.

## 2.2- Especies bivalvas

Los moluscos bivalvos representan en la acuicultura marina uno de los grupos más importantes desde el punto de vista productivo y económico, debido a sus bajos costes de producción y alta rentabilidad (Sikorski, 1994; Pillay, 1998)

Los ejemplares vivos de las tres especies de bivalvos considerados en este estudio: almeja (*Venerupis rhomboideus*; Ilustración 8), mejillón (*Mytilus galloprovincialis*; Ilustración 9) y ostra (*Ostrea edulis*; Ilustración 10), fueron obtenidos de un productor local de Cambados (Galicia), después de ser purificados según la Regulación Española (Real Decreto 571/1999).

Ilustración 8: *Venerupis rhomboideus*



**Nombre inglés: Clam**  
**Nombre gallego: Ameixa Rubia**

Ilustración 9: *Mytilus galloprovincialis*



**Nombre inglés: Mussel**  
**Nombre gallego: Mexillón**

Ilustración 10: *Ostrea edulis*



**Nombre inglés: Oyster**  
**Nombre gallego: Ostra**

Todos los bivalvos procedieron de la Ría de Arousa, cuyo estuario es conocido por ser un productor a nivel mundial de mejillones y ostras. Tanto las ostras como los mejillones procedieron de bateas, mientras que las almejas fueron recogidas de la orilla del mar.

Los parámetros ambientales existentes durante la recogida de las muestras de primavera fueron los siguientes: (i) Temperatura del aire: 12°C, (ii) Humedad relativa: 76%, (iii) Temperatura del agua: 13,5°C, (iv) Salinidad: 3,1%.

Mientras los parámetros ambientales en otoño fueron: (i) Temperatura del aire: 16°C, (ii) Humedad relativa: 78%, (iii) Temperatura del agua: 15°C, (iv) Salinidad: 3,1%.

Para cada estación se estudiaron dos lotes de cada especie de bivalvo, siendo uno almacenado en hielo líquido ozonizado (HLO) y el otro en hielo tradicional (HT). Cada lote fue almacenado y etiquetado en cajas de poliespan (80 x 40 x 20 cm) con su correspondiente bolsa de HLO o HT, en una cámara termostaticada a 2°C.

Los lotes estudiados de cada una de las especies de bivalvos consistieron en 40–45 unidades de almeja, 30–35 unidades de mejillón y 30–35 unidades de ostra. Las longitudes y los pesos de las muestras de bivalvos presentaron rangos comprendidos entre: 3-5 cm y 30-40 g para la almeja, 6-9 cm y 40-80 g para el mejillón, 6-10 cm y 40-60 g para la ostra.

El estudio se llevó a cabo en dos estaciones (otoño y primavera), con el fin de determinar el efecto de la variabilidad estacional de los métodos de preservación. En cada punto de muestreo se examinaron tres muestras de cada uno de los lotes, para análisis microbiológico, bioquímico y sensorial.

### 2.3- Merluza, gallo y rape

En el capítulo 3 de este trabajo se pretende evaluar el efecto de conservación proporcionado por el empleo de la fórmula comercial BPS2 en el hielo en tres especies representativas de la pesca extractiva:

- Merluza (*Merluccius merluccius*)

Ilustración 11: *Merluccius merluccius*



Nombre inglés: Hake  
Nombre gallego: Pescada

- Gallo (*Lepidorhombus whiffiagonis*)

Ilustración 12: *Lepidorhombus spp.*



Nombre inglés: Megrin  
Nombre gallego: Rapante

- Rape (*Lophius piscatorius*).

Ilustración 13: *Lophius spp.*



Nombre inglés: Angler  
Nombre gallego: Peixe sapo

Los ejemplares de merluza (*Merluccius merluccius*; 96 individuos), gallo (*L. whiffiagonis*; 78 individuos) y rape (*Lophius piscatorius*; 78 individuos) fueron capturados cerca de la costa atlántica de Galicia y se mantuvieron a bordo en refrigeración bajo hielo tradicional. Una vez en el laboratorio, día 0, se realizó un análisis por triplicado de cada una de las especies. Los ejemplares restantes fueron divididos en tres lotes y almacenados bajo diferentes tipos de hielo (C-0, C-400 y C-800) en proporción 1:1 pescado-hielo. Este sistema de hielo fue preparado con dos concentraciones diferentes de la fórmula comercial BPS2, que incluye la mezcla de ácidos ascórbico, láctico y cítrico; la concentración acuosa de dicho producto es 800mg/kg para el lote C-800 y 400mg/kg para el lote C-400. El lote C-0 fue almacenado en hielo preparado únicamente con agua.

Las concentraciones elegidas, 400mg/kg y 800mg/kg, fueron el resultado de la optimización de una serie de ensayos preliminares, con las tres especies marinas, en los que se evaluó un rango de concentración de mezcla de ácidos comprendido entre 70-2000 mg/kg basados en términos de calidad sensorial.

Todos los lotes se mantuvieron en refrigeración en una cámara termostaticada a 4°C. Estas cajas permitieron el vaciado, y los diferentes tipos de hielo fueron renovados cuando fue requerido.

Las muestras fueron tomadas para análisis en los días 1, 5, 8 y 12 para las tres especies. En el caso de la merluza, también a día 15. A día 0 se analizaron 6 individuos de cada una de las especies considerándose como muestras iniciales (tres grupos de dos individuos). Para cada especie de pescado y condiciones de hielo, se analizaron tres grupos de manera independiente con el fin de obtener resultados estadísticamente significativos (n=3).

## **2.4- Bacaladilla**

Se partió de ejemplares de bacaladilla fresca capturados en la costa atlántica de Galicia, que fueron transportados en hielo hasta el laboratorio. Las longitudes y los pesos de los individuos recibidos comprendieron valores entre los 22-25 cm y 70-120 g, respectivamente.

**Ilustración 14: *Micromesistius poutassou***



**Nombre inglés: Blue whiting**

**Nombre gallego: Lirio**

Una vez en el laboratorio, se separaron 8 individuos y se consideraron como punto de partida de pescado crudo (día 0), se analizaron dos grupos de manera independiente (4 individuos por grupo).

Los ejemplares de bacaladilla restantes se dividieron en dos lotes. El primer lote (pescado preservado, lote P) se sumergió durante 2 minutos en una solución acuosa de 800 ppm de concentración de ácidos orgánicos, posteriormente los individuos fueron colocados en cajas y rodeados directamente con hielo preparado con 800 ppm del producto comercial.

Los ejemplares de bacaladilla correspondientes al segundo lote (pescado control, lote C) fueron sumergidos en agua durante 2 minutos y posteriormente fueron almacenados en cajas rodeados de hielo tradicional preparado con agua.

La elección de la concentración más conveniente para ser empleada tanto en inmersión como en sistema de hielo, fue resultado de varios experimentos previos, en los que se evaluó el efecto de aceptación sensorial (branquias, apariencia, textura, olor y color) de un rango de concentración (70–2000 ppm, BPS2 en agua) de la fórmula comercial. Valores de concentración incluidos en el

rango 70-500 ppm, no proporcionaron una mejora de la calidad del producto refrigerado, mientras que valores por encima de 1000 ppm, llevaron en algunos casos, al deterioro de las propiedades físicas y sensoriales del pescado. La concentración de 800 ppm proporcionó los mejores resultados al ser empleado en ambos pasos del procesado. Esta concentración fue la elegida para ser empleada en el presente estudio.

En ambos lotes, los individuos estuvieron rodeados de hielo (con mezcla de ácidos orgánicos o sin ella) en una relación pescado-hielo 1:1. Ambos lotes se almacenaron en una cámara termostaticada a 4°C. Las cajas empleadas permitieron el drenaje y el hielo fue renovado siempre que fue necesario. Las muestras de pescado de cada uno de los dos lotes fueron tomadas para análisis en los días 2, 5, 7 y 9.

### **2.5- Jurel**

Cabe destacar de esta especie su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, que la convierten en una especie de notable futuro, debido al efecto beneficioso que dichos lípidos ejercen en la prevención del riesgo cardiovascular.

#### **Ilustración 15. *Trachurus trachurus***



**Nombre inglés: Horse mackerel**

**Nombre gallego: Xurelo**

Los ejemplares de jurel (*Trachurus trachurus*, 117 individuos) capturados en la costa atlántica de Galicia fueron transportadas en hielo al laboratorio. La longitud y el peso de los individuos presentaron rangos comprendidos entre los valores 25-30 cm y 200-250 g,

respectivamente. Una vez en el laboratorio, se separaron 9 ejemplares que fueron considerados como muestra inicial (día 0).

Se analizaron tres grupos de manera independiente, con tres individuos en cada grupo (n=3). Los ejemplares restantes fueron divididos en tres lotes (36 individuos en cada uno de los lotes). El primer lote fue almacenado en cajas y rodeado directamente con el hielo preparado mediante una solución acuosa de ácidos orgánicos en una concentración de 0,005% (p/v) de cada ácido en agua (condición P-1). El segundo lote fue tratado de igual manera al anterior pero la concentración de la mezcla de ácidos fue 0,020% en agua (p/v) (condición P-2). El lote control almacenado en cajas, estuvo en contacto solamente con hielo tradicional preparado únicamente a partir de agua (condición C). Los ejemplares de jurel fueron analizados en los días 4, 7, 11 y 13.

En cada punto de muestreo, se tomaron para analizar nueve individuos de cada lote, clasificados en tres grupos (tres individuos por grupo), siendo analizados de manera independiente (n=3).

Todos los lotes fueron almacenados en una cámara termostata a 4°C, y las mezclas de hielo fueron renovadas cuando fue requerido.

#### **2.6- Caballa**

Los ejemplares de caballa (*Scomber scombrus*, 81 individuos), fueron

**Ilustración 16. *Scomber scombrus***



**Nombre inglés: Atlantic mackerel**

**Nombre gallego: Xarda**

capturados cerca de la costa atlántica gallega.

La longitud y el peso de los ejemplares de caballa presentaron un rango comprendido entre 21-25 cm y 175-230 g respectivamente.

Una vez en el laboratorio, se separaron 9 individuos que fueron considerados como muestras iniciales (día 0). Se analizaron tres grupos diferentes de manera independiente (tres individuos por grupo) para realizar el análisis estadístico (n=3).

El resto de ejemplares se dividieron en dos lotes (36 individuos en cada lote). El primer lote fue depositado en cajas y rodeado con hielo preparado mediante una disolución acuosa de ácidos orgánicos en una concentración de 0,050% para cada uno de ellos en agua (p/v) (condición P). El segundo lote, correspondiente al lote control, fue colocado en cajas y rodeado con hielo tradicional (condición C).

Con el fin de evaluar la concentración de ácidos adecuada para ser utilizada en la elaboración del hielo, se realizaron ensayos preliminares con disoluciones preparadas a partir de la combinación de los tres ácidos. El resultado obtenido en el análisis visual del pescado para el rango de concentraciones comprendidas entre 0,005% y 0,250%, indicó que la concentración 0,050% era la más adecuada para llevar a cabo la investigación.

En ambos lotes (P y C), la proporción empleada pescado-hielo fue 1:1. Todos los lotes fueron almacenados en una cámara termostaticada a 4°C, y las mezclas de hielo fueron renovadas cuando hubo necesidad. Las muestras de caballa de ambos lotes fueron analizadas a días: 3, 6, 10 y 13. En cada día de muestreo, se tomaron 9 individuos de caballa de cada uno de los lotes para su análisis, considerados en tres grupos (tres individuos en cada grupo), que fueron analizados de manera independiente con el fin de realizar el análisis estadístico (n=3).

## **2.7- Anillas de calamar**

Las anillas de calamar congeladas fueron suministradas por una industria local especializada en la comercialización de productos del mar del tipo “*ready to eat*”. Las anillas de calamar fueron preparadas a partir de calamar fresco y posteriormente congeladas a -40°C durante 1 mes.

**Ilustración 17. *Loligo vulgaris***



**Nombre inglés:** Squid

**Nombre gallego:** Calamar

Los pesos medios de las anillas presentaron un rango comprendido entre 18-20 g. Se llevaron a cabo dos experimentos para evaluar el efecto de la presencia de aceite esencial de orégano (AEO) y aceite esencial de tomillo (AET). En ambos experimentos, la descongelación se llevó a cabo

durante toda la noche en almacenamiento a 4°C.

El primer experimento correspondiente a AEO incluyó 306 anillas de calamar, que fueron asignadas de manera aleatoria a cuatro lotes (72 anillas en cada uno). Tres de estos lotes fueron procesados con la mezcla de cobertura de AEO en las siguientes concentraciones 0,010% (lote O-1), 0,025% (lote O-2) y 0,050% (lote O-3) (w/w, AEO/calamar). El cuarto lote, designado como lote control (C-O) no contuvo orégano. Las anillas restantes (n=18) consideradas como muestras iniciales del experimento con orégano, fueron distribuidas en tres grupos (6 anillas en cada uno) y analizadas independientemente.

El segundo experimento corresponde a AET, este experimento incluyó 234 anillas de calamar, que fueron asignadas aleatoriamente en 4 lotes (54 anillas en cada lote). Se procedió de igual modo que en el experimento anterior, tres de los lotes fueron procesados con la mezcla de cobertura de AET en las siguientes

concentraciones: 0,010% (lote T-1), 0,025% (lote T-2) y 0,050% (lote T-3) (w/w, AET/calamar). El cuarto lote, designado como lote control (C-O) no contuvo tomillo. Las anillas restantes (n=18) consideradas como muestras iniciales del experimento con tomillo, fueron distribuidas en tres grupos (6 anillas en cada uno) y analizadas independientemente.

Los procesos de cobertura, fritura, embalaje y temperatura de almacenamiento fueron las mismas que en el experimento AEO.

Las muestras una vez preparadas, como se indicó en el apartado 1.4, fueron envasadas bajo atmósfera modificada y almacenadas en refrigeración a 4° C. Las muestras del experimento con AEO fueron tomadas para análisis en los días: 3, 7, 10 y 14; en el caso del experimento con AET, las muestras fueron tomadas para análisis en días: 5, 8 y 12.

Para ambos experimentos, se analizaron 6 bandejas correspondientes a cada uno de los tratamientos al mismo tiempo de refrigeración. Para este análisis, las bandejas se distribuyeron en 3 grupos (con dos bandejas por grupo) y cada uno de los grupos fue analizado de manera independiente.

Antes de la elección de la concentración adecuada de AE, se realizaron ensayos preliminares con el fin de establecer el máximo de concentración que se podría emplear para cada uno de los aceites, sin que este valor afectase al olor del producto.

El análisis sensorial de las anillas de calmar, lo realizó un panel de 5 jueces expertos. Las muestras se presentaron a los panelistas, codificadas con tres dígitos y fueron calificadas como “afectada” “no afectada” “dudosa”. Al finalizar este experimento, se llegó a la conclusión que si los aceites esenciales son

añadidos a concentraciones de 0,075% (p/p) o mayores, se hace notar la presencia del aceite esencial en las anillas de calamar RTE; por tanto, en este estudio, los valores de concentración elegidos, fueron menores de 0,075%.

## **3- ANÁLISIS DE PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA CALIDAD**

### **3.1- Análisis sensorial**

La evaluación de la calidad sensorial en los moluscos bivalvos, tanto en crudo como cocinados, se llevó a cabo por un panel de cinco jueces experimentados, quienes, durante 10 años, han analizado diferentes clases de productos marinos.

Las muestras de bivalvos se cocinaron a 100°C durante 5 minutos en HLO (lote HLO) o en agua fresca suplementada con 3,3% de NaCl (lote HT).

Las muestras de bivalvos crudas y cocidas (140 g) se presentaron de manera individual a los panelistas. La parte comestible se retiró de la concha, de manera que se consiguió al menos 20 g de parte comestible. Las muestras fueron preparadas en una habitación y analizadas en una habitación aislada, bien ventilada y con buena luz. Los panelistas puntuaron olor y apariencia de las muestras de bivalvos, tanto crudas como cocidas, de acuerdo a las indicaciones presentadas en la Tabla 1 (Anonymous, 1999). Se utilizó una escala de valoración de 1-5, siendo la puntuación de 5 correspondiente a la máxima calidad y 1 para la peor calidad. En el caso de las muestras cocinadas, los panelistas evaluaron además la jugosidad de las muestras usando la escala de puntuación de 1 a 5.

Atributo	Escala 5	Escala 4	Escala 3	Escala 2	Escala 1
<b>Olor</b>	Fresco y característico	A mar	Sin olor, tras cocer agradable	Ligero pútrido	Pútrido
<b>Apariencia</b>	Valvas cerradas	Valvas abiertas se cierran al golpearlas.  Músculo adherido a las valvas y de aspecto esponjoso	Valvas semiabiertas no cierran al golpearlas.  Músculo adherido a las valvas se mantiene el color	Valvas abiertas con flexibilidad.  El músculo se suelta fácilmente.  Pérdida ligera de color	Valvas abiertas. Tendencia a separarse  Pérdida total del color
<b>Jugosidad/ Sabor</b>	Alta jugosidad  Sin pérdida de agua	Jugosidad media  Sin pérdida de agua	Jugosidad media y pérdida de agua	Pérdida de agua y de jugosidad	

Tabla 1: Criterios de calidad sensorial para bivalvos

La evaluación de calidad sensorial en el pescado, fue realizada por un panel de cinco jueces experimentados, de acuerdo a las indicaciones presentadas en la Tabla 2 (Council Regulation, 1989). Los análisis sensoriales se llevaron a cabo con los especímenes de pescado enteros. Se establecieron cuatro categorías: (E) alta calidad, (A) buena calidad, (B) calidad aceptable, (C) calidad inaceptable. Las muestras de análisis sensorial fueron tratadas en una sala de preparación y se analizaron en una habitación aislada, bien ventilada y con buena iluminación.

Se examinaron los siguientes atributos: piel, ojos, olor externo, branquias, consistencia y olor del músculo. El color de las muestras se evaluó como un aspecto subjetivo del atributo de la piel.

En cada día de muestreo, las muestras de pescado fueron codificadas y presentadas a los panelistas de manera ciega, siendo puntuadas individualmente. El papel de expertos compartió todas las muestras.

Atributo	Calidad alta (E)	Buena Calidad (A)	Calidad aceptable (B)	Rechazable (C)
<b>Piel</b>	Mucosidad transparente; pigmentación intensa	Mucosidad lechosa; pérdidas insignificantes de pigmentación	Mucosidad débilmente gris; pigmentación sin brillo	Mucosidad opaco; importantes pérdidas de pigmentación
<b>Olor externo</b>	Marcadamente a algas y crustáceos	Débilmente a algas y crustáceos	Incipientemente agrio y rancio	Marcadamente agrio o rancio
<b>Branquias</b>	Color rojo brillante; sin olor; láminas perfectamente separadas	Color rosa; sin olor; láminas adheridas en grupos	Color débilmente pálido; olor incipientemente pútrido; láminas adheridas en grupos	Color gris amarillento; olor pútrido; láminas totalmente adheridas
<b>Consistencia</b>	Presencia o aparición parcial de rigor mortis	Firme y elástica; los signos de presión desaparecen inmediatamente y completamente	Elasticidad notablemente reducida; presencia de signos mecánicos	Cambios importantes en la forma debido a factores mecánicos
<b>Olor del músculo</b>	Marcadamente a algas y crustáceos	Débilmente a algas y crustáceos	Incipientemente agrio o rancio	Marcadamente agrio o rancio
<b>Ojos</b>	Convexos; córnea transparente; pupila negra brillante	Convexos y débilmente hundidos; córnea débilmente opalescente; pupila negra nublada	Planos; córnea opalescente; pupila opaca	Cóncavos y córnea lechosa; órganos internos movidos

Tabla 2. Criterios de calidad sensorial del pescado. Council Regulation (1989)

### 3.2- Análisis Microbiológico

#### 3.2.1- Preparación de las muestras

Para realizar el análisis microbiológico de las muestras, se realizó una etapa de preparación mediante una serie de equipos, materiales y medios de cultivo. Inicialmente se tomó una porción de muestra en cámara de flujo laminar y en condiciones asépticas. Esta porción de muestra se colocó en una bolsa estéril con un volumen (1/9) (p/v) de agua de peptona (Merck, Darmstadt, Germany). Esta mezcla se homogeneizó en un masticador (AES, Combours, France) (Ben-Gigirey y col., 1998, 1999). En el caso del análisis de la superficie del pescado, 5 cm<sup>2</sup> de

la superficie de las muestras fueron frotadas con un hisopo. La carga microbiológica del hisopo fue resuspendida en 10 ml de agua de peptona.

Se realizaron diluciones seriadas de los extractos microbiológicos preparados con el agua de peptona para los dos casos anteriores y posteriormente se llevó a cabo el análisis microbiológico cuantitativo.

### **3.2.2- Microbiota aerobia mesófila**

Los microorganismos aerobios mesófilos fueron investigados en Plate Count Agar (PCA, Oxoid Ltd, London, UK), después de incubación a 30°C durante 48 horas (Ben-Gigirey y col., 1998, 1999).

### **3.2.3- Microbiota anaerobia**

Los microorganismos anaerobios fueron investigados en Plate Count Agar (PCA, Oxoid Ltd, London, UK), después de incubación a 30°C durante 48 horas en el interior de una jarra de anaerobiosis y bajo atmósfera anaerobia (Oxoid) (Ben-Gigirey y col., 1998, 1999).

### **3.2.4- Microbiota psicrófila**

Los microorganismos psicrófilos fueron investigados en Plate Count Agar (PCA, Oxoid Ltd, London, UK), después de incubación a 7-8°C durante 7 días) (Ben-Gigirey y col., 1998, 1999).

### **3.2.5- *Enterobacteriaceae***

*Enterobacteriaceae* fueron investigados mediante agar glucosa rojo violeta bilis (VRBG) (Merck, Darmstadt, Alemania) después de incubación a 30 °C durante 24 h (Merck Microbiology Manual, 2002).

### **3.2.6- Microbiota proteolítica**

Los microorganismos que exhiben un fenotipo proteolítico fueron investigados en agar-caseína tras su incubación a 30°C durante 48h (Ben-Gigirey y col., 2000; Phaff y col., 1994).

### **3.2.7- Microbiota lipolítica**

Los microorganismos que exhiben un fenotipo lipolítico fueron investigados en agar-tributirina después de ser incubados a 30°C durante 48 h (Ben-Gigirey y col., 2000).

## **3.3- Análisis Bioquímicos**

### **3.3.1- Valoración de pH**

Se utilizó un pHmetro (Crison, Barcelona) provisto de un electrodo de penetración de 6 mm de diámetro. Para su calibración se utilizaron soluciones patrón de pH 4 y 7, siguiendo los métodos oficiales de análisis. La lectura del pH se efectuó mediante penetración del electrodo en el músculo en los puntos de muestreo establecidos.

### **3.3.2- Análisis composicional**

El contenido en agua fue determinado por la diferencia de peso de músculo homogeneizado (1-2 g) y el peso después de mantener durante 24 h a 105°C. Los resultados fueron expresados como g agua/100g músculo. Los lípidos fueron extraídos y determinados por el método de Bligh & Dyer (1959). Los resultados se expresaron en g lípidos/ 100g músculo húmedo.

### 3.3.3- Índice de peróxidos

El índice de peróxidos (PV), medida de la oxidación lipídica primaria, fue determinado espectrofotométricamente (Beckman Coulter, DU 640, London, UK) en los extractos lipídicos mediante previa reducción de una alícuota con tiocianato férrico (método Chapman & McKay, 1949). Los resultados se expresan como mequiv. de oxígeno activo/ kg lípidos.

### 3.3.4- Índice de ácido tiobarbitúrico

El índice de ácido tiobarbitúrico (TBA-i), indicativo de la oxidación lipídica secundaria, fue determinado de acuerdo con el método Vyncke (1970). Este método está basado en la reacción entre el extracto del músculo de pescado en tricloroacético y el ácido tiobarbitúrico. El contenido en sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) fue medido espectrofotométricamente a 532 nm y los resultados fueron expresados como mg malondialdehído/ kg músculo.

### 3.3.5- Formación de compuestos fluorescentes

La formación de compuestos fluorescentes, medida de la oxidación lipídica terciaria, fue determinada mediante espectrofluorimetría (Fluorímetro LS 45, Perkin, Elmer España, Tres Cantos, Madrid), tras medidas a 393/463 nm y 327/415 nm (Aubourg y col., 2004). La fluorescencia relativa (RF) fue calculada como sigue:  $RF = F/F_{st}$ , donde F es la fluorescencia media a cada máximo de excitación/emisión y  $F_{st}$  es la intensidad de la fluorescencia de una disolución de sulfato de quinina (1 µg/ml en 0,05M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a la correspondiente longitud de onda. La relación de fluorescencia (FR) fue calculada como la relación de los dos valores relativos:  $FR = RF_{393/463 \text{ nm}}/RF_{327/415 \text{ nm}}$ . El valor de FR fue determinado

en las fases acuosa y orgánica resultantes de la extracción de lípidos (Bligh & Dyer, 1959).

#### **3.3.6- Ácidos grasos libres**

El contenido en ácidos grasos libres (AGL), resultado de la acción de enzimas lipolíticos endógenos y microbianos sobre lípidos de alto peso molecular (triglicéridos y fosfolípidos, principalmente) del pescado, fue determinado por el método espectrofotométrico de Lowry & Tinsley (1976), basado en la formación de un complejo con acetato cúprico y piridina. Los resultados fueron expresados como g AGL/ kg músculo en el experimento de jurel, y como g AGL/ kg lípidos en los de trucha arco iris y bacaladilla.

#### **3.3.7- Degradación de nucleótidos**

Los extractos de nucleótidos fueron extraídos del músculo de pescado con ácido perclórico al 6% de acuerdo con Ryder (1985). El análisis se llevó a cabo mediante HPLC utilizando un equipo Beckman provisto de un módulo programable de solvente 126, y el escáner del módulo detector 167 conectado al programa System Gold, versión 8,1 (Beckman Coulter, Londres, UK). La separación se logró con una columna de fase reversa 250 x1,60 mm, Spherisorb ODS- 2 C18 (Waters, Milford, MA, USA) y con un diámetro de partícula interno de 5 µm. La combinación de la fase móvil fue: disolvente A compuesto por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,04M y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,006M a  $\text{pH}>7$ ; el disolvente B fue acetonitrilo. Los disolventes se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm antes de su uso. La separación se llevó a cabo con una elución con gradiente continuo. El eluyente fue monotorizado a 254 nm y el tiempo de 10 min.

Se construyeron curvas estándar en el rango 0-1 mM para adenosina 5'-trifosfato (ATP) y para cada uno de los compuestos involucrados en su ruta de degradación: adenosina 5'-difosfato (ADP), adenosina 5'-monofosfato (AMP), inosina 5'-monofosfato (IMP), inosina (INO) e hipoxantina (Hx).

Los resultados obtenidos para cada uno de los compuestos de degradación fueron calculados como mmol/kg músculo. El valor de K (%) fue calculado según la siguiente relación de concentraciones:

$$K = 100 \times (Hx + INO) / (ATP + ADP + AMP + IMP + INO + Hx)$$

### **3.3.8- Bases nitrogenadas volátiles totales**

Las bases nitrogenadas volátiles totales (BVT-N) fueron determinadas por el método de Antonacopoulos (1960) con las modificaciones realizadas por Aubourg y col. (1997). Así, se extraen 10 gramos de músculo con ácido perclórico (6%) y se llevan a un volumen de 50 ml. Después de la destilación de los extractos ácidos llevados a pH 13 con NaOH (200 g/l), el contenido de BVT-N fue determinado por valoración del destilado con HCl 10 mM. Los resultados fueron expresados como mg BVT-N/ kg músculo

### **3.3.9- Trimetilamina**

Los valores de TMA-N fueron determinados por el método del picrato, descrito por Tozawa y col. (1971). Este método implica la preparación del extracto de músculo en ácido tricloroacético (TCA) al 5% (10 g/ 25ml de TCA). Los resultados son expresados en TMA-N/100g músculo.

## REFERENCIAS

- Antonacopoulos, N.** 1960. Verbesserte apparatus zur quantitativer destillation wasserdampfllüchtiger stoffe. *Z. Lebensm. Unter. Forsch*, **13**, 113,160.
- Anonymous.** 1999. Codex guidelines for the sensory evaluation of fish and shellfish in laboratories. *CAC-GL*, **31**, 1–33.
- Aubourg, S., Sotelo, C. & Gallardo, J.M.** 1997. Quality assessment of sardines during storage by measurement of fluorescent compounds. *Journal of Food Science*, **304**, 295–298.
- Aubourg, S., Pérez-Alonso, F. & Gallardo, J.** 2004. Studies on rancidity inhibition in frozen horse mackerel (*Trachurus trachurus*) by citric and ascorbic acids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **106**, 232-240.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J., Villa, T. & Barros- Velázquez, J.** 1998. Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *Journal of Food Protection*, **61**, 608–615.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J., Villa, T. & Barros- Velázquez, J.** 1999. Histamine and cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen albacore (*Thunnus alalunga*). *Journal of Food Protection*, **62**, 933–939.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J., Villa, T. & Barros-Velázquez, J.** 2000. Characterization of biogenic amine-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from white muscle of fresh and frozen albacore tuna. *International Journal of Food Microbiology*, **57**, 19–31.
- Bligh, E. & Dyer, W.** 1959. A rapid method of total extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**, 911–917.
- Chapman, R. & McKay, J.** 1949. The estimation of peroxides in fats and oils by the ferric thiocyanate method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **26**, 360–363.
- Council Regulation.** 1989. Baremo de clasificacion de frescura. In: Diaro Oficial de las Comunidades Europeas, L5/21, Pp. 5–6. Brussels: European Commission
- Giese, J.** 1996. Antioxidants: tools for preventing lipid oxidation. *Food Technology*, **50**, 73–80.
- Lowry, R. & Tinsley, I.** 1976. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **53**, 470–472.

**Madrid, A., Madrid, J. & Madrid, R.** 1994. Chilling, freezing and ultra-freezing of fish and derivatives. En: *Technology of Fish and its Derivatives*. (Ed.) Mundi-Prensa, Madrid, Spain, pp. 45–103.

**Merck Microbiology Manual.** 2002. Coliforms and E. coli. VRB Agar. En: <http://service.merck.de/microbiology>.

**Pillay, T. V. R.** 1998. *Acuicultura: Principios y prácticas*. Editorial Limusa-Wiley. México, D.F.

**Phaff, H. J., Starmer, W. T., Lachance, M. A. & Ganter, P. F.** 1994. *Candida caseinolytica* sp. nov., a new species of yeast occurring in necrotic tissues of *Opuntia* and *Stenocereus* species in the Southwestern United States and Baja California, Mexico. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **44**, 641–645.

**Real Decreto (571 / 1999).** El 9 de abril, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria que fija las normas aplicables a la producción y comercialización de moluscos bivalvos vivos. *Boletín Oficial del Estado*, **86**, 13522–13531.

**Ryder, J.** 1985. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **33**, 678–680.

**Sikorski, J.M.** 1994. *Tecnología de los Productos del Mar: Recursos, composición Nutritiva y Conservación*. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España

**Tozawa, H., Erokibara, K. & Amano, K.** 1971. Proposed modification of Dyer's method for trimethylamine determination in codfish. En: *Fish Inspection and Quality Control*. (Ed.) R. Kreuzer, London, UK: Fishing News Books Ltd., pp.187–190.

**Vyncke, W.** 1970. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, **72**, 1084–1087.





## IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**CAPÍTULO 1:**

**Improved quality and shelf life of farmed trout (*Oncorhynchus mykiss*) by whole processing in a combined ozonised flow ice refrigeration system.**

***Mejora de la calidad y de la vida útil de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) mediante conservación en un sistema combinado de hielo líquido y ozono.***



Original article

## Improved quality and shelf life of farmed trout (*Oncorhynchus mykiss*) by whole processing in a combined ozonised flow ice refrigeration system

Santiago P. Aubourg,<sup>1</sup> Silvia Testi,<sup>2</sup> Minia Sanxuás,<sup>3</sup> Carolina Gil<sup>1</sup> & Jorge Barros-Velázquez<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Seafood Chemistry, Institute for Marine Research (IIM-CSIC), C/ Eduardo Cabello 6, E-36208 Vigo, Spain

<sup>2</sup> Department of Veterinary Morpho-Physiology Sciences and Animal Production, University of Bologna, Bologna, Italy

<sup>3</sup> LHICA, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences, University of Santiago de Compostela, E-27002 Lugo, Spain

(Received 11 August 2008; Accepted in revised form 13 November 2008)

**Summary** A combined refrigeration system consisting of ozone and flow ice was evaluated for the sacrifice, cooling and chilled storage of continental trout. The batch processed in ozonised flow ice exhibited significant ( $P < 0.05$ ) reductions (0.97 and 1.51 log CFU cm<sup>-2</sup>) in skin aerobes and psychrotrophs on days 6 and 9, respectively, and significant ( $P < 0.05$ ) reductions (0.94 log CFU g<sup>-1</sup> and 0.96 log CFU g<sup>-1</sup>) in aerobes, and proteolytic bacteria in muscle on day 13. A significant ( $P < 0.05$ ) inhibition of TMA-N formation after 9 days was also observed, with an average reduction of 28.4% along the storage period. Slight reductions in autolytic breakdown mechanisms were also observed in the ozonised batch, a maximum reduction of 14.82% being reached on day 13. The microbial and biochemical changes were well correlated with the sensory evaluation, which revealed relevant differences between the batches on day 13 and a shelf life extension of the ozonised batch up to day 16.

**Keywords** Chilled storage, fish processing, flow ice, ozone, quality, refrigeration, shelf life, slaughter, trout.

### Introduction

Flow ice (FI) – also known as slurry ice, fluid ice or liquid ice – is an advanced refrigeration method for the sub-zero storage of fish and other food products. FI consists of a biphasic ice–water suspension that provides a remarkably high chilling rate when compared with alternative and more traditional refrigeration systems such as flake ice or chilled water. FI also prevents the physical damage suffered by seafood products thanks to the spherical geometry of its microscopic particles, which are less harsh to the product than the aciculate crystals of conventional flake ice. FI can also be pumped, thus allowing a more hygienic manner of fish processing and process automation (for a review: Piñeiro *et al.*, 2004). In recent years, sound scientific evidence has confirmed the theoretical advantages of FI for the refrigeration of marine fish specimens. Thus, as the pioneer works with finfish (Chapman, 1990) and albacore (Price *et al.*, 1991), to the more recent reports for turbot (Rodríguez *et al.*, 2006), sardine (Losada *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2005) and horse mackerel

(Rodríguez *et al.*, 2005), FI systems have provided quality retention and shelf life extension in marine fish species.

The present work was aimed at gaining scientific data at three different levels: (i) the suitability or not of the application of FI systems to continental species such as trout, a fish species whose farming is making it more readily available and better appreciated by European consumers; (ii) the usefulness of FI systems for the whole processing of fresh fish material, this including slaughter, chilling and refrigerated storage; (iii) the benefits of the combination of FI and ozone for the whole processing of farmed trout. Ozone has traditionally been used as a disinfectant for fresh water aquaculture systems, and its applications for improving the sensory quality and shelf life of fish have been described recently (Kötters *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999, 2000; Campos *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2006). The microbial identity of the bacteria present in trout intestine has been studied (Spanggaard *et al.*, 2000), although no quantitative information is currently available about microbial activity in trout muscle as affected by different preservation techniques.

On comparing refrigeration systems and other processing methods, quality control is mandatory to

\*Correspondent: Fax: +34 982 252195;  
e-mail: jorge.barros@usc.es

elucidate the significance of the differences observed (for a review, see Arvanitoyannis *et al.*, 2005). Thus, chemical parameters such as total volatile base nitrogen (TVB-N), trimethylamine-nitrogen (TMA-N) and thio-barbituric acid-index (TBA-i) have been successfully employed to elucidate the appropriateness or not of the irradiation of sea bass (Özden *et al.*, 2007). Likewise, gutted and ungutted refrigerated sea bream and sea bass have been studied comparatively by means of chemical – TVB-N, TMA-N, TBA-i –, microbiological – aerobic mesophiles and psychrophilic bacteria –, and sensory analyses (Cakli *et al.*, 2006). Also, mechanical methods and computer image analyses have been considered to complement sensory analyses in certain specific cases, such as the detection of blood residues in refrigerated farmed turbot (Roth *et al.*, 2007).

In this work, we evaluated an integral slaughter, chilling and storage refrigeration system – resulting from the combination of ozone and FI – for farmed trout. The effects of FI systems on the quality of trout specimens were evaluated by assessing relevant biochemical, sensory and microbial quality indicators.

## Materials and methods

### Refrigeration systems

Flow ice was prepared using a FLO-ICE prototype (Kinarca S.A.U., Vigo, Spain). The composition of the FI binary mixture was 40% ice and 60% water, prepared from filtered seawater (salinity: 33.0 g kg<sup>-1</sup>). The temperature of the FI mixture was -1.5 °C. When required, injection of ozone into the FI mixture was accomplished with a prototype provided by Cosemar Ozono (Madrid, Spain), the redox potential being adjusted to 700 mV (0.20 mg ozone L<sup>-1</sup>). In this batch, the ozone concentration was constantly monitored by checking the redox potential in the liquid phase.

### Fish material and sampling protocol

Specimens (108 individuals) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (weight range: 0.23–0.33 kg; length range: 25–30 cm) were obtained from an aquaculture facility (Isidro de la Cal, La Coruna, Spain) and were sacrificed at the farm by immersion for at least 20 min in either FI (54 individuals) or ozonised FI (OFI: 54 individuals). The fish specimens were not headed or gutted. In both systems, the fish were surrounded by FI or OFI at a 1:1 fish-to-ice ratio and transported for 2 h at 0 °C to the laboratory. Then, the specimens were maintained in their corresponding icing medium and placed directly in an isothermal room at +1 °C. On day 1, nine specimens from each batch were taken for analysis and divided into three groups (three individuals in each group), which were studied separately ( $n = 3$ ).

Once the specimens had been subjected to sensory analyses, the white muscle was dissected out aseptically and used for microbial and biochemical analyses. Fish sampling was performed on days 1, 3, 6, 9, 13 and 16 of refrigerated storage, according to the same sampling design ( $n = 3$ ).

### Sensory analyses

Sensory analyses were performed with whole fish, following official guidelines concerning fresh and refrigerated fish (Council Regulation, 1989). Four categories were ranked: highest quality (E), good quality (A), fair quality (B), and unacceptable quality (C). The samples for sensory analysis were handled in a preparation room and were analysed in a well-ventilated isolated room provided with good lighting. The following attributes were examined: skin, eyes, external odour, gills, consistency and flesh odour. The colour of the samples was evaluated as a subjective aspect of the 'skin' attribute. At each sampling time, coded fish specimens were presented to panellists in a 'blind' manner, and were scored individually. Panel members shared the samples tested.

The sensory analyses were conducted by a panel consisting of five experienced judges who had been involved in the sensory analysis of different fish species for 10 years. Prior to this study, the panellists were specially trained with chilled rainbow trout by means of the discriminative triangle test (ISO standard 4120). This method can be applied to reveal slight differences between fish samples. The differences concern all the attributes of the samples, the principle consisting of the simultaneous presentation to the panellists of a set of three coded samples, two of which are identical. The panellists were trained in basic aspects, the most frequent fish aspect and odour, and had to learn the difference between off-flavour and taints in rainbow trout. Chemical and microbial quality indices were also developed for the standard reference samples to assist in the standardisation of the judges' evaluation of product sensory attributes. The judges had to demonstrate their competency to evaluate the fish specimens in compliance with the standards.

### Microbiological analyses

Fish skin sections of 5 cm<sup>2</sup> were swabbed with 1 g L<sup>-1</sup> of sterile peptone water (Oxoid Ltd., London, UK) and the microbial load was resuspended in 10 mL of peptone water (1 g L<sup>-1</sup>). In parallel, samples (5 g) of fish muscle were also dissected out aseptically from skinned chilled specimens, mixed with 45 mL of peptone water (1 g L<sup>-1</sup>), and homogenised in a stomacher (Seward Medical, London, UK). In both cases, serial dilutions from the skin or muscle microbial extracts were prepared in

peptone water (1 g L<sup>-1</sup>). Total aerobic and psychrotrophic bacteria from surface and muscle samples were investigated in Plate Count Agar (PCA; Oxoid) after incubation at 30 °C for 48 h or at 7–8 °C for 10 days, respectively, as described elsewhere (Ben-Gigirey *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2004). Microorganisms exhibiting a proteolytic phenotype were investigated in casein-agar medium, as previously described (Phaff *et al.*, 1994).

**Chemical analyses**

Analysis of the autolytic nucleotide degradation rate was carried out by HPLC as described elsewhere (Ryder, 1985). The *K* value was calculated according to the following concentration ratio: *K* value = 100 × (hypoxanthine + inosine)/(adenosine triphosphate + adenosine diphosphate + adenosine monophosphate + inosine monophosphate + inosine + hypoxanthine). TVB-N contents were measured as described elsewhere (Aubourg *et al.*, 1997). Briefly, fish muscle (10 g) was extracted with 6% perchloric acid and volume was brought up to 50 mL. After steam-distillation of the acid extracts rendered alkaline to pH 13 with NaOH (200 g L<sup>-1</sup>), TVB-N contents were determined by titration of the distillate with 10 mM HCl. The results were expressed as mg TVB-N kg<sup>-1</sup> muscle. TMA-N values were determined by the picrate method, as previously described (Tozawa *et al.*, 1971). This involves the preparation of a 50 g L<sup>-1</sup> trichloroacetic acid extract of fish muscle. The results are expressed as mg TMA-N kg<sup>-1</sup> muscle.

The lipid fraction was extracted using the method of Bligh & Dyer (1959). Lipid oxidation was assessed with the TBA-i, which was determined according to Vyncke (1970). The results are expressed as mg malondialdehyde kg<sup>-1</sup> fish sample. The free fatty acid (FFA) content was determined using the Lowry and Tinsley method, based on complex formation with cupric acetate-pyridine (Lowry & Tinsley, 1976). The results are expressed as g FFA kg<sup>-1</sup> lipids.

**Statistical analyses**

A multivariate analysis was performed to study the effect of each refrigeration system on the microbiological and chemical parameters. One-way analysis of variance (ANOVA) was also used to explore significance of differences among microbiological and chemical parameters throughout storage for each refrigeration system. Multiple comparisons between parameters were carried out with the DMS test. All tests were carried out using the SPSS software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). In all cases, a confidence interval at the 95% level (*P* < 0.05) was considered.

**Results and discussion**

**Sensory analyses**

The results of the sensory analyses are shown in Table 1. It may be observed that the trout specimens processed in the combined system of FI and ozone retained a good quality (E or A categories) up to day 13, except for the gill aspect. However, when FI was used alone, good quality was only retained up to day 6 (Table 1). With respect to the investigation of colour, this was included as a part of the 'skin' attribute, and this parameter afforded better scores for the OFI batch on days 6, 9 and 13 of refrigerated storage as compared to the FI batch.

It is remarkable that the limiting factor of sensory acceptability in the FI batch was the external odour, which led to rejection of the FI batch on day 16. Previous work carried out at our laboratory has indicated that continental trout specimens of similar sizes to those studied here have an average shelf life of 13 days, this being in agreement with the results obtained for the FI batch. Thus, according to the sensory evaluation the combined use of FI and ozone may increase the shelf life of continental trout slightly from 13 to 16 days.

**Table 1** Comparative sensory evaluation of trout stored in batches

	Storage time (days)											
	1		3		6		9		13		16	
	FI	OFI	FI	OFI	FI	OFI	FI	OFI	FI	OFI	FI	OFI
Skin	E	E	E	E	A	E	B	A	B	A	B	B
Eyes	E	E	E	E	E	E	A	A	B	A	B	B
External odour	E	E	E	E	E	E	A	A	B	A	C	B
Gills	E	E	E	E	A	A	B	B	B	B	B	B
Consistency	E	E	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B
Flesh odour	E	E	E	E	E	E	A	A	A	A	A	A

FI, flow ice; OFI, ozonised flow ice; E, highest quality; A, good quality; B, fair quality; C, unacceptable quality.

Previous studies have reported that the application of ozone extends the shelf life of rockfish (*Sebastes* spp.) (Kötters *et al.*, 1997), and catfish (*Ictalurus punctatus*) fillets (Kim *et al.*, 2000). Other authors have also reported reductions in the discoloration rate of minced horse mackerel as a benefit of washing with ozonised water (Chen *et al.*, 1997), and a better maintenance of the sensory quality of scad (*Trachurus trachurus*) treated on-board with gaseous ozone (Da Silva *et al.*, 1998). Likewise, a previous study performed at our laboratory reported for the first time the monitored application of ozone in the liquid phase of a subzero biphasic ice–water mixture for the storage of a marine fish species; namely, turbot (*Psetta maxima*) (Rodríguez *et al.*, 2006). The present study provides evidence for the first time of the usefulness of the combination of ozone and FI for the extension of shelf life of a continental fish species, in this case trout.

#### Microbiological analyses

Microbial development in trout muscle among chilled storage is shown in Table 2. The use of FI alone (FI batch) proved to be an accurate processing strategy for the slaughter, chilling and refrigerated storage of trout. Thus, the results depicted in Table 2 for that batch clearly indicate a slow microbial growth in trout muscle according to the three microbial parameters tested. It is remarkable that microbial numbers remained below 3 log CFU g<sup>-1</sup> even up to day 9 of storage, a result that is correlated well with the sensory quality investigated in parallel (Table 1). Significant ( $P < 0.05$ ) increases in microbial numbers were observed during advanced periods of storage (day 13 and onwards, Table 2). However, even after 16 days of storage, the microbial counts in the FI batch did not reach concentrations of 6 log CFU g<sup>-1</sup>, this value being below those considered necessary to induce fish spoilage (Gram & Huss, 1996). These results clearly indicate that the rapid chilling conditions provided by the FI mixture, together with its hygienic aspect, provided a good microbial control of refrigerated trout.

Regarding the assessment of the whole processing of trout in OFI, this system led to lower mean counts for

aerobic mesophiles and psychrotrophic and proteolytic bacteria in trout muscle, when compared with the FI batch (Table 2). Thus, statistical analyses revealed significant ( $P < 0.05$ ) differences between the FI and OFI batches for aerobic mesophiles (storage days 3, 9 and 13), psychrotrophs (storage days 3, 6, 9 and 13) and proteolytic bacteria (storage days 6, 9 and 13) (Table 2). Moreover, microbial growth was slower in the OFI batch than in the FI counterpart, the numbers being below 4 log CFU g<sup>-1</sup> even after 13 days of storage. Considering the whole storage period of 16 days, the mean differences between batches were 0.42 log CFU g<sup>-1</sup>, 0.44 log CFU g<sup>-1</sup> and 0.46 log CFU g<sup>-1</sup> units for the aerobes, psychrotrophs, and proteolytic bacteria respectively.

The assessment of microbial growth on trout skin along chilled storage is shown in Table 3. Two microbial groups were investigated in this phase: mesophilic and psychrotrophic bacteria. The microbial populations increased with storage time in both batches but the counts remained below 4 log CFU cm<sup>-2</sup> even after 16 days of storage. This indicates a very limited microbial growth at surface level. The surface washing of trout skin caused by the FI could account for the low surface numbers determined in this continental fish species, as has been described for marine fish species (Campos *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2005, 2006). However, the combined use of ozone and FI (OFI batch) exerted an additional reducing effect on microbial numbers after 3 days of storage (Table 3). Considering the whole storage period of 16 days, the mean differences between batches were 0.20 log CFU cm<sup>-2</sup> and 0.26 log CFU cm<sup>-2</sup> for the aerobes and psychrotrophs respectively. Remarkably, statistically significant ( $P < 0.05$ ) differences were observed between the batches for at least one of the microbial groups investigated on days 6, 9 and 13 of refrigerated storage (Table 3).

The ability of ozone to inactivate food surfaces has been a matter of debate. Some authors have reported that ozone decreases the surface microbial load of fish during its chilled storage (Dondo *et al.*, 1992; Da Silva *et al.*, 1998). In contrast, other authors have suggested

**Table 2** Comparative microbial growth in trout muscle stored in flow ice (FI) or ozonised flow ice (OFI)

Storage time (days)	Aerobic mesophiles (log CFU g <sup>-1</sup> )		Psychrotrophs (log CFU g <sup>-1</sup> )		Proteolytic bacteria (log CFU g <sup>-1</sup> )	
	FI	OFI	FI	OFI	FI	OFI
1	1.62 a (0.33)	1.61 a (0.37)	1.10 a (0.15)	1.00 a (0.00)	2.32 a (0.47)	1.99 a (0.00)
3	2.45 b (0.13)	2.08 a (0.17)	2.19 b (0.37)	1.33 a (0.30)	2.83 a (0.65)	2.64 a (0.66)
6	1.94 a (0.34)	1.83 a (0.04)	2.54 b (0.35)	1.79 a (0.29)	2.48 b (0.32)	1.98 a (0.00)
9	2.67 b (0.26)	1.78 a (0.25)	1.67 b (0.14)	1.10 a (0.15)	2.67 b (0.25)	2.15 a (0.15)
13	4.42 b (0.27)	3.48 a (0.35)	4.24 b (0.15)	3.82 a (0.11)	4.21 b (0.35)	3.25 a (0.32)
16	5.91 a (0.80)	5.76 a (0.60)	5.64 a (0.80)	5.74 a (0.50)	5.87 a (0.13)	5.65 a (0.56)

Results are average values and standard deviations (between brackets). Results followed by different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ).

**Table 3** Comparative microbial growth in trout surface stored in flow ice (FI) or ozonised flow ice (OFI)

Storage time (days)	Aerobic mesophiles (log CFU cm <sup>-2</sup> )		Psychrotrophes (log CFU cm <sup>-2</sup> )	
	FI	OFI	FI	OFI
1	0.10 a (0.01)	0.64 a (0.05)	0.10 a (0.05)	0.55 a (0.10)
3	1.49 a (0.23)	1.44 a (0.16)	0.10 a (0.02)	0.10 a (0.05)
6	1.71 b (0.24)	0.74 a (0.08)	0.30 a (0.20)	0.26 a (0.12)
9	0.71 a (0.16)	0.59 a (0.15)	1.74 b (0.25)	0.23 a (0.10)
13	2.53 b (0.18)	2.15 a (0.14)	3.13 b (0.30)	2.59 a (0.12)
16	3.56 a (0.30)	3.32 a (0.15)	3.87 a (0.40)	3.97 a (0.35)

Results are average values and standard deviations (between brackets). Results followed by different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ).

that ozone inactivates bacteria less effectively when they are attached to solid surfaces when compared with low ozone-demand liquid media (Kim *et al.*, 1999). The results obtained by us here indicated a slight reduction in the microbial populations present on the surface of trout due to ozone, supporting the former statement. The results of microbial analyses of trout stored in OFI were also well correlated with those of the sensory analyses, the latter indicating a slightly better quality maintenance in the OFI batch when compared with the FI batch (Table 1). According to our results, the combined use of FI and ozone for the slaughter, chilling and storage of continental trout provides an additional advantage at microbial level, as determined by the microbial numbers present in the fish skin and flesh along 16 days of storage. Although microbial growth was significantly slowed down in certain storage periods in the OFI batch, none of the microbial groups investigated reached counts higher than 10<sup>6</sup> CFU g<sup>-1</sup>, also indicating that microbial spoilage is not the limiting factor of acceptability of continental trout.

**Chemical analyses**

The chemical parameters investigated in trout muscle along storage are shown in Table 4. With respect to the

autolytic nucleotide degradation rate, the *K* value increased to values above 80 after 9 days of storage in both batches. No significant ( $P > 0.05$ ) difference was observed between the ozonised and the non-ozonised FI batches except for day 13, on which a lower *K* value was determined in the OFI batch.

The formation of TVB-N was assessed in both batches, no significant ( $P > 0.05$ ) difference being observed between either storage systems. Moreover, the evolution of TVB-N concentrations along storage in either of the storage systems tested did not show any significant variations, in all cases such concentrations being below 250 mg kg<sup>-1</sup> muscle even after 16 days of storage (Table 4). These results suggest that TVB-N, which is a widely used parameter to assess the quality evolution of marine fish species, is not useful as a quality indicator of trout quality. Thus, even when sensory analysis indicated an unacceptable quality, the levels of TVB-N were not significantly ( $P > 0.05$ ) different from the initial ones (Table 4).

Unlike TVB-N, the evolution of TMA-N contents in both batches provided significant ( $P < 0.05$ ) differences between batches (Table 4). Thus, on day 9 and onwards statistically significant ( $P < 0.05$ ) differences in TMA-N contents were observed between the FI and OFI batches. Remarkably, on day 13 the TMA-N content of the FI batch was almost double that determined in the OFI batch. These results suggest that the incorporation of ozone in the OFI batch significantly reduces the growth of TMA-producing bacteria, this representing a practical advantage with respect to the use of FI alone. It is also remarkable that the evolution of TMA-N in both batches was well correlated with the results of the sensory analyses. Nevertheless, it should be stressed that the TMA-N levels in both trout batches were in all cases much lower than those described for other small and medium-sized marine fish species, in which sharp increases in TMA-N contents have been noted after 9–12 days of storage in flake ice (Fernández-Salguero & Mackie, 1987; Pérez-Villarreal & Pozo, 1990; Ruiz-Capillas & Moral, 2001; Baixas-Nogueras *et al.*, 2002). This different kind of behaviour was expected, as our

**Table 4** Comparative evolution of biochemical quality in trout muscle stored in flow ice (FI) or ozonised flow ice (OFI)

Time (days)	<i>K</i> value		TVB-N		TMA-N		FFA		TBA-i	
	FI	OFI	FI	OFI	FI	OFI	FI	OFI	FI	OFI
1	16.76 b (2.81)	24.99 a (6.69)	236.8 a (6.1)	244.3 a (9.5)	0.20 a (0.05)	0.31 a (0.15)	1.8 a (0.4)	1.9 a (0.7)	0.15 a (0.05)	0.24 a (0.06)
3	45.37 a (7.62)	43.96 a (7.06)	230.5 a (18.3)	219.2 a (13.2)	0.36 a (0.03)	0.36 a (0.07)	5.6 a (1.6)	5.9 a (1.6)	0.23 b (0.05)	0.37 a (0.05)
6	70.61 a (3.47)	64.58 a (8.41)	236.1 a (2.2)	238.3 a (6.8)	0.74 a (0.37)	0.51 a (0.13)	5.5 a (1.5)	5.7 a (2.4)	0.34 a (0.14)	0.34 a (0.03)
9	84.08 a (5.37)	81.16 a (1.30)	229.1 a (14.8)	219.5 a (7.0)	0.73 b (0.06)	0.47 a (0.14)	5.5 a (0.1)	6.4 a (0.11)	0.23 a (0.08)	0.15 a (0.05)
13	87.94 b (1.43)	74.91 a (3.19)	232.8 a (26.2)	236.0 a (14.2)	1.42 b (0.36)	0.72 a (0.27)	5.4 a (1.9)	7.1 a (1.2)	0.18 a (0.04)	0.24 a (0.08)
16	87.03 a (3.15)	90.34 a (2.71)	233.3 a (15.3)	221.6 a (9.4)	2.22 b (0.30)	1.69 a (0.29)	6.1 a (0.8)	7.0 a (0.9)	0.20 a (0.02)	0.24 a (0.05)

TVB-N, total volatile base nitrogen; TMA-N, trimethylamine-nitrogen; FFA, free fatty acid; TBA-i, thiobarbituric acid-index. Results are average values and standard deviations (between brackets). Results followed by different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ).

study was focused on a continental fish species (trout) whose TMAO content is necessarily much lower than those normally found in marine fish species.

Lipid hydrolysis was determined by FFA assessment. Significant ( $P < 0.05$ ) increases in the formation of FFA along the storage time were observed in both batches during the first 3 days (Table 4). After that time, only slight increases in this parameter were observed, indicating that lipid hydrolysis events are of reduced importance in continental trout. Accordingly, no significant ( $P > 0.05$ ) effect of ozone on lipid hydrolysis can be inferred, this indicating a similar protection of trout muscle against lipid hydrolysis in both batches. Although the release of FFA themselves does not imply any significant loss of nutritional quality, their accumulation has been linked to an enhancement of lipid oxidation (Miyashita & Takagi, 1986; Yoshida *et al.*, 1992) and textural deterioration due to interactions between FFA and proteins (Mackie, 1993; Sikorski & Kolakowska, 1994). Interestingly, according to the results obtained in our study the combination of ozone and FI did not involve any significant enhancement of lipid damage in trout muscle.

Lipid oxidation was followed with the TBA-i in order to evaluate whether the presence of ozone might imply any drawback at this level. As in the case of FFA, statistically significant ( $P < 0.05$ ) increases in this index were observed along storage time in both batches up to day 3 (Table 4). After that time, TBA-i levels only increased slightly, reaching final values below  $0.25 \text{ mg kg}^{-1}$  in both batches. Remarkably, the presence of ozone in the OFI batch did not significantly increase ( $P < 0.05$ ) the formation of TBA-reactive substances, this underscoring the notion that this antimicrobial agent may provide added value in the control of microbial spoilage in continental trout without causing any significant ( $P < 0.05$ ) enhancement of lipid oxidation mechanisms.

## Conclusions

The application of OFI for the slaughter, cooling and refrigerated storage of farmed trout is advisable. The combined system evaluated in this study provided an additional control of microbial – aerobic mesophiles, psychrotrophs, proteolytic bacteria, TMA-N – and autolytic –  $K$  value – mechanisms commonly used as spoilage indicators when compared with FI alone. Sensory analyses also confirmed a slight extension of the shelf life in this batch. As this work reports the first evaluation of a FI-based system for the integral processing of a refrigerated continental fish species, the results of this study open the way to the industrial application of this combined preservation system to farmed trout and to other continental farmed fish species.

## Acknowledgments

This work was supported by a project granted by the Dirección Xeral de I + D from the Galician Government (Xunta de Galicia, Project PGIDT05TAL00701CT). The authors also wish to thank KINARCA S.A.U. (Vigo, Spain) for providing the flow ice equipment, and CoseMar Ozono (Madrid, Spain) for providing the ozone generator.

## References

- Arvanitoyannis, I.S., Tsitsika, E.V. & Panagiotaki, P. (2005). Implementation of quality control methods (physicochemical, microbiological and sensory) in conjunction with multivariate analysis towards fish authenticity. *International Journal of Food Science and Technology*, **40**, 237–263.
- Aubourg, S., Sotelo, C. & Gallardo, J. (1997). Quality assessment of sardines during storage by measurement of fluorescent compounds. *Journal of Food Science*, **62**, 295–299.
- Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. & Vidal-Carou, M.C. (2002). Chemical and sensory changes in Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) under refrigeration (6–8 °C) and stored in ice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 6504–6510.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J.M., Villa, T.G. & Barros-Velázquez, J. (1998). Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *Journal of Food Protection*, **61**, 608–615.
- Bligh, E. & Dyer, W. (1959). A rapid method of total extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**, 911–917.
- Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., Dincer, T. & Tolasa, S. (2006). Effects of gutting and ungutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **46**, 519–527.
- Campos, C., Rodríguez, Ó., Losada, V., Aubourg, S. & Barros-Velázquez, J. (2005). Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*Sardina pilchardus*). *International Journal of Food Microbiology*, **103**, 121–130.
- Chapman, L. (1990). *Making the Grade. Ice Shurries get top Marks for Quality Products*. Australian Fisheries, July, 16–19.
- Chen, H.H., Chiu, E.M. & Huang, J.R. (1997). Color and gel forming properties of horse mackerel (*Trachurus japonicus*) as related to washing conditions. *Journal of Food Science*, **62**, 985–991.
- Council Regulation. (1989). Baremo de clasificación de frescura. In: *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, **L5/21**, Pp. 5–6. Brussels: European Commission.
- Da Silva, M.V., Gibbs, P.A. & Kirby, R.M. (1998). Sensorial and microbial effects of gaseous ozone on fresh scad (*Trachurus trachurus*). *Journal of Applied Microbiology*, **84**, 802–810.
- Dondo, A.C., Nachtman, C., Doglione, L., Rosso, A. & Genetti, A. (1992). Foods: their preservation by combined use of refrigeration and ozone. *Ingeniería Alimentaria y Conserve Animale*, **8**, 16–25.
- Fernández-Salguero, J. & Mackie, I. (1987). Comparative rates of spoilage of fillets and whole fish during storage of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and herring (*Clupea harengus*) as determined by the formation of non-volatile and volatile amines. *International Journal of Food Science and Technology*, **22**, 385–390.
- Gram, L. & Huss, H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, **33**, 121–137.
- Kim, J., Yousef, A. & Dave, S. (1999). Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. *Journal of Food Protection*, **62**, 1071–1087.

- Kim, T.J., Silva, J.L., Chamul, R.S. & Chen, T.C. (2000). Influence of ozone, hydrogen peroxide or salt on microbial profile, TBARS and color of channel catfish filets. *Journal of Food Science*, **65**, 1210–1213.
- Kötters, J., Pradur, A., Skura, B., Rosenthal, H., Black, E.A. & Rodrigues-Lopez, J. (1997). Observations and experiments on extending shelf life of rockfish (*Sebastes* spp) products with ozone. *Journal of Applied Ichthyology*, **13**, 1–8.
- Losada, V., Barros-Velázquez, J., Gallardo, J. & Aubourg, S. (2004). Effect of advanced chilling methods on lipid damage during sardine (*Sardina pilchardus*) storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **106**, 844–850.
- Lowry, R. & Tinsley, I. (1976). Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **53**, 470–472.
- Mackie, I. (1993). The effects of freezing on flesh proteins. *Food Reviews International*, **9**, 575–610.
- Miyashita, K. & Takagi, T. (1986). Study on the oxidative rate and prooxidant activity of free fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **63**, 1380–1384.
- Özden, O., Inugur, M. & Erkan, N. (2007). Effect of different dose gamma radiation and refrigeration on the chemical and sensory properties and microbiological status of aqua cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Radiation Physics and Chemistry*, **76**, 1169–1178.
- Pérez-Villarreal, B. & Pozo, R. (1990). Chemical composition and ice spoilage of albacore (*Thunnus alalunga*). *Journal of Food Science*, **55**, 678–682.
- Phaff, H.J., Starmer, W.T., Lachance, M.A. & Ganter, P.F. (1994). *Candida caseinolytica* sp. nov., a new species of yeast occurring in necrotic tissues of *Opuntia* and *Stenocereus* species in the Southwestern United States and Baja California, Mexico. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **44**, 641–645.
- Piñeiro, C., Barros-Velázquez, J. & Aubourg, S.P. (2004). Effects of newer slurry ice systems on the quality of aquatic food products: a comparative review versus flake ice chilling methods. *Trends in Food Science and Technology*, **15**, 575–582.
- Price, R., Melvin, E. & Bell, J. (1991). Postmortem changes in chilled round, bled and dressed albacore. *Journal of Food Science*, **56**, 318–321.
- Rodríguez, O., Losada, V., Aubourg, S. & Barros-Velázquez, J. (2004). Enhanced shelf-life of chilled European hake (*Merluccius merluccius*) stored in slurry ice as determined by sensory analysis and assessment of microbiological activity. *Food Research International*, **37**, 749–757.
- Rodríguez, Ó., Losada, V., Aubourg, S. & Barros-Velázquez, J. (2005). Sensory, microbial and chemical effects of a slurry ice system on horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85**, 235–242.
- Rodríguez, Ó., Barros-Velázquez, J., Piñeiro, C., Gallardo, J. & Aubourg, S. (2006). Effects of storage in slurry ice on the microbial, chemical and sensory quality and on the shelf life of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Food Chemistry*, **95**, 270–278.
- Roth, B., Schelvis-Smit, R., Stien, L.H., Foss, A., Nortvedt, R. & Imstrand, A. (2007). Exsanguination of turbot and the effect on fillet quality measured mechanically, by sensory evaluation, and with computer vision. *Journal of Food Science*, **72**, E525–E531.
- Ruiz-Capillas, C. & Moral, A. (2001). Correlation between biochemical and sensory quality indices in hake stored in ice. *Food Research International*, **34**, 441–447.
- Ryder, J. (1985). Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **33**, 678–680.
- Sikorski, Z. & Kolakowska, A. (1994). Changes in protein in frozen stored fish. In: *Seafood Proteins* (edited by Z. Sikorski, Z.B. Sun Pan & F. Shahidi). Pp. 99–112. New York, USA: Chapman and Hall.
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Nielsen, T., Appel, K.F. & Gram, L. (2000). The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture*, **182**, 1–15.
- Tozawa, H., Erokibara, K. & Amano, K. (1971). Proposed modification of Dyer's method for trimethylamine determination in codfish. In: *Fish Inspection and Quality Control* (edited by R. Kreuzer). Pp. 187–190. London, UK: Fishing News Books Ltd.
- Vyncke, W. (1970). Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette Seifen Anstrichm.*, **72**, 1084–1087.
- Yoshida, H., Kondo, I. & Kajimoto, G. (1992). Participation of free fatty acids in the oxidation of purified soybean oil during microwave heating. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **69**, 1136–1140.



## **CAPÍTULO 1: Mejora de la calidad y de la vida útil de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) mediante conservación en un sistema combinado de hielo líquido y ozono.**

El objetivo de este estudio, como se comentó anteriormente, fue evaluar el sistema de refrigeración de hielo líquido ozonizado para el sacrificio, enfriamiento y almacenamiento en refrigeración de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), considerando parámetros sensoriales, microbiológicos y bioquímicos que fueron comparados con los obtenidos para el sistema de almacenamiento en refrigeración en hielo líquido.

### **Análisis sensorial**

Comenzando con el análisis sensorial, se pudo observar que la buena calidad de la trucha procesada en hielo líquido ozonizado (HLO) se mantuvo hasta el día 13 (categorías A y E), con excepción del aspecto de las branquias. Sin embargo, mediante la aplicación de hielo líquido (HL), se consiguió mantener este tipo de calidad únicamente hasta el día 6.

La investigación del color, parámetro incluido dentro de los atributos de calidad de la piel, presentó mejores resultados en los días 6, 9 y 13 en los lotes tratados con HLO comparados con los lotes de HL. Por otra parte, el olor externo en el lote HLO resultó ser el factor limitante de aceptabilidad sensorial, lo que llevó a su rechazo a día 16.

Estudios previos han descrito que la aplicación de ozono aumenta la vida útil de especies como la gallineta nórdica (*Sebastes spp.*) (Kötters y col., 1997) y pez gato americano (*Ictalurus punctatus*) (Kim y col., 2000). Asimismo, otros autores

han descrito la reducción en el nivel de decoloración del jurel picado, como resultado de su lavado con agua ozonizada (Chen y col., 1997) y una mejora en la calidad sensorial del jurel fresco (*Trachurus trachurus*) tratado con ozono gaseoso (Da Silva y col., 1998).

#### **Análisis microbiológico**

En relación a los resultados microbiológicos obtenidos del análisis del músculo de la trucha, se observó un lento crecimiento de población bacteriana para los lotes almacenados en HL. Es destacable cómo el recuento de microorganismos se mantuvo por debajo de 3 log UFC/g, incluso hasta el día 9 de almacenamiento. Este resultado se correlacionó con el análisis sensorial que se realizó en paralelo. Se observó un aumento significativo ( $P < 0,05$ ) en los recuentos microbianos totales, a medida que el tiempo de almacenamiento progresó (día 13). Sin embargo, incluso después del día 16 de almacenamiento, los recuentos microbiológicos en el lote HL no llegaron a alcanzar la concentración de 6 log UFC/g, resultando este valor por debajo del considerado necesario para inducir el deterioro del pescado (Gram & Huss, 1996). Los valores obtenidos indican que las condiciones rápidas de enfriamiento proporcionadas por el hielo líquido, unido a sus propiedades higienizantes, proporcionaron un buen control de la microbiota en la trucha refrigerada.

Respecto a la evaluación del sistema HLO en músculo de trucha, se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) con respecto a los lotes almacenados en HL, siendo los recuentos medios en aerobios mesófilos (días de almacenamiento 3, 9 y 13), psicrófilos (días de almacenamiento 3, 6, 9 y 13) y bacterias proteolíticas (días de almacenamiento 6, 9 y 13), menores para los

individuos correspondientes al sistema HLO. Por otro lado, el crecimiento de microorganismos en el lote HLO fue más lento que en el lote HL, siendo los recuentos inferiores a 4 log UFC/g, incluso después del día 13. Considerando los 16 días de almacenamiento, las diferencias medias entre lotes fueron 0,42 log UFC/g, 0,44 log UFC/g y 0,46 log UFC/g para aerobios, psicrófilos y bacterias proteolíticas, respectivamente.

La evaluación del recuento superficial de microorganismos en piel, muestra que en ambos lotes las bacterias mesófilas y psicrófilas aumentan con los días de almacenamiento, pero los recuentos se mantienen por debajo de 4 log UFC/cm<sup>2</sup>, incluso después de 16 días de almacenamiento, lo que indica un crecimiento limitado a nivel superficial. El lavado superficial de la piel de trucha causada por el hielo líquido puede explicar el bajo recuento de la microbiota superficial, tal y como ya fue descrito para otras especies marinas (Rodríguez y col., 2005; Campos y col., 2005; Rodríguez y col., 2006). El uso combinado de hielo líquido y ozono, ejerció un efecto beneficioso adicional en la reducción de la microbiota después del tercer día de almacenamiento. Considerando los 16 días de almacenamiento, las diferencias entre lotes fueron 0,20 log UFC/ cm<sup>2</sup>, y 0,26 log UFC/ cm<sup>2</sup>, para aerobios y psicrófilos, respectivamente.

La habilidad del ozono para inactivar bacterias en la superficie de los alimentos es una cuestión de debate. Algunos autores, sugieren que el ozono reduce la carga microbiana superficial del pescado durante su almacenamiento en refrigeración (Dondo y col., 1992; Da Silva y col., 1998). Por otro lado, otros autores apuntan que el ozono inactiva los microorganismos de manera menos efectiva cuando están en superficies sólidas, que cuando están en medios líquidos con baja demanda de ozono (Kim y col., 1999). Los resultados obtenidos,

indican una leve reducción de la microbiota superficial de trucha, lo que respalda la declaración anterior. Los resultados del análisis microbiológico de trucha almacenada en HLO se correlacionaron con los análisis sensoriales; este último indicó una mejora de la calidad en el lote HLO en comparación con el lote HL. De acuerdo con estos resultados, el uso combinado de ozono para el sacrificio, enfriamiento y almacenamiento de la trucha continental, proporciona una ventaja adicional a nivel microbiológico, determinado por los recuentos microbiológicos presentes en la piel y el músculo durante los 16 días de almacenamiento. Aunque el crecimiento microbiano en el lote HLO se ralentizó en ciertos periodos de almacenamiento, ninguno de los grupos bacterianos estudiados alcanzaron valores superiores a 6 log UFC/g, lo que indica que la degradación microbiana no es el factor limitante de aceptabilidad de la trucha continental.

#### **Análisis químico**

En lo que respecta al nivel de degradación autolítica de las nucleótidos, el valor K (%) aumentó por encima de 80 después de 9 días de almacenamiento en ambos lotes. No se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre lotes, excepto a día 13, en el que se determinó un valor K menor en el lote HLO.

La formación de N-BVT evaluada en ambos lotes, no mostró diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en ninguno de los dos sistemas. Por otra parte, la evolución en la concentración de N-BVT durante el periodo de almacenamiento en cada uno de los sistemas analizados no mostró ninguna variación; en todos los casos la concentración se situó por debajo de 250 mg/kg en músculo, incluso después de los 16 días de almacenamiento. Estos resultados sugieren, que a pesar de que el parámetro de N-BVT es usado ampliamente como indicador de la calidad de los

productos marinos, para este estudio en concreto, no resulta ser un buen indicador de la calidad de trucha. Incluso cuando los análisis sensoriales indicaron una calidad inaceptable, los niveles de N-BVT no fueron significativamente ( $P>0,05$ ) distintos de los iniciales.

A diferencia de los resultados obtenidos en este estudio para el parámetro N-BVT, la evolución del contenido en N-TMA, mostró diferencias significativas ( $P<0,05$ ) entre lotes. Así, desde el día 6 en adelante, se observaron diferencias significativas ( $P<0,05$ ) en el contenido de N-TMA entre los lotes HL y HLO. Destacó el día 13, donde el contenido de N-TMA en el lote HL es el doble que el determinado en el lote HLO. Este resultado sugiere que la incorporación de ozono en el lote HLO reduce significativamente el crecimiento de bacterias productoras de N-TMA, lo que representa una ventaja con respecto al uso de HL sin ozono.

También fue notable la buena correlación entre la evolución del contenido en N-TMA en ambos lotes y los resultados obtenidos para el análisis sensorial. Sin embargo, hay que destacar que los niveles de N-TMA en ambos lotes fueron menores que los descritos para otras especies de pequeño y mediano tamaño, en donde se observó un fuerte aumento del contenido en N-TMA después de los días 9-12 de almacenamiento en hielo tradicional (Pérez-Villareal y col., 1990; Fernández-Salguero y col., 1987; Ruíz-Capillas y col., 2001; Baixas-Nogueras y col., 2002). Este tipo de comportamiento fue lo esperado, ya que este estudio se centró en una especie de pescado continental cuyo contenido en OTMA es mucho más bajo que el encontrado normalmente en especies marinas.

La investigación de la hidrólisis lipídica en músculo de trucha reveló un incremento significativo ( $P<0,05$ ) en la formación de ácidos grasos libres (AGL) para ambos lotes durante los tres primeros días de almacenamiento. Los valores

#### IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

iniciales en contenido lipídico para los lotes HL y HLO fueron 1,8 g/kg y 1,9 g/kg lípido, respectivamente. Se observó a día 3, un incremento de estos valores, alcanzándose los valores de 5,6 g/kg y 5,9 g/kg en ambos lotes. Después de este periodo, el parámetro AGL aumentó ligeramente, lo que indicó la importancia reducida que la hidrólisis lipídica tiene en trucha continental. En consecuencia, no se puede deducir que exista un efecto significativo del ozono en la hidrólisis lipídica, lo que indica una protección similar del músculo de trucha en contra de esta hidrólisis en ambos lotes. Aunque la liberación de AGL no significa estrictamente pérdida de calidad nutricional, su acumulación puede estar unida a un aumento de la oxidación lipídica, (Miyashita & Takagi, 1986; Yoshida y col., 1992) y al deterioro en la textura debido a la interacción entre AGL y las proteínas (Mackie, 1993; Sikorski & Kolakowska, 1994).

Los resultados obtenidos en este estudio, indican que la combinación de ozono con hielo líquido no hizo aumentar el daño lipídico en el músculo de trucha.

Con el objetivo de evaluar si la presencia de ozono implicaba alguna desventaja en cuanto a oxidación lipídica, se investigó el parámetro i-TBA. Igual que en el caso de AGL, se encontraron aumentos significativos ( $P < 0,05$ ) en los tres primeros días de almacenamiento para ambos lotes. Después de este periodo, los niveles de i-TBA aumentan ligeramente alcanzando un valor final por debajo de 0,25 mg/kg en ambos lotes.

La presencia de ozono en el lote HLO no hizo aumentar de manera significativa la formación de sustancias reactivas al TBA, lo que pone de manifiesto que, el empleo de este agente antimicrobiano, proporciona un valor adicional en el control de deterioro microbiológico de la trucha continental, sin causar ningún aumento en los mecanismos de oxidación lipídica.

**CAPÍTULO 2:**

**Improved microbial and sensory quality of clams (*Venerupis rhomboideus*), oysters (*Ostrea edulis*) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by refrigeration in a slurry ice packaging system.**

**Mejora de la calidad microbiológica y sensorial de almeja (*Venerupis rhomboideus*), ostra (*Ostrea edulis*) y mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) mediante refrigeración en un sistema de hielo líquido envasado.**



Original article

## Improved microbial and sensory quality of clams (*Venerupis rhomboideus*), oysters (*Ostrea edulis*) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by refrigeration in a slurry ice packaging system

Minia S. Rey,<sup>1</sup> José M. Miranda,<sup>2</sup> Santiago Aubourg<sup>2</sup> & Jorge Barros-Velázquez<sup>1\*</sup><sup>1</sup> Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences, University of Santiago de Compostela, E-27002 Lugo, Spain<sup>2</sup> Department of Seafood Science and Technology, Institute for Marine Research (IIM-CSIC), C/Eduardo Cabello 6, E-36208 Vigo, Spain

(Received 13 May 2011; Accepted in revised form 11 November 2011)

**Summary** The aim of this work was to evaluate a slurry ice (SI) packaging system on three bivalve species: clams (*Venerupis rhomboideus*), oysters (*Ostrea edulis*) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Comparative analyses were performed on specimens caught in autumn and spring and compared to batches stored in conventional flake ice. Microbiological analysis of autumn specimens stored in SI showed significantly ( $P < 0.05$ ) reduced numbers of mesophiles and psychrotrophs in all three species, as well as fewer *Enterobacteriaceae* in clams and oysters. Spring specimens also exhibited significantly ( $P < 0.05$ ) lower microbial loads, with SI storage significantly ( $P < 0.05$ ) improving the control of mesophiles, psychrotrophs and proteolytic bacteria in clams and oysters. Sensory analysis correlated well with microbial analyses, with a significantly ( $P < 0.05$ ) better quality in terms of odour, taste, juiciness, appearance and shelf life. The SI packaging system evaluated in this work proved to be a valuable method for maintaining quality of these bivalve species.

**Keywords** Bivalves, clams, cooking, mussels, oysters, quality, refrigeration, shelf life, slurry ice.

### Introduction

Marine products constitute a perishable food group whose deterioration of sensory quality and freshness is because of a variety of microbial and biochemical degradation mechanisms (Piggot & Tucker, 1990; Whitte *et al.*, 1990; Olafsdóttir *et al.*, 1997). Among marine products, bivalves are shellfish species highly appreciated globally because they are an excellent source of protein, vitamins and minerals (Cabello *et al.*, 2004; Caglak *et al.*, 2008). These organisms feed by filtration of phytoplankton and organic particles found in seawater. Bivalves, similar to other marine species, are widely varied in composition because of endogenous and exogenous effects (Pearson *et al.*, 1977). The harvesting season plays a key role regarding temperature, feeding availability and other external factors in different types of marine species (Saito *et al.*, 1997; Bandarra *et al.*, 2001). However, studies on the effect of harvesting season on the loss of quality during refrigerated storage

(Grigorakis *et al.*, 2003; Roth *et al.*, 2005) and other technological treatments in seafood are scarce (Kolakowska *et al.*, 1992; Aubourg *et al.*, 2005).

In seawater, bivalves may be exposed to microorganisms that lead to spoilage or are pathogenic in nature. The microorganisms can accumulate inside the body of the animal and can be transmitted to humans through the food chain (Lees, 2000). Moreover, the fact that some bivalve species are often consumed raw or slightly cooked (Romalde *et al.*, 1994; Lees, 2000; Murchie *et al.*, 2005) increases the microbial risks associated with their consumption (Freire-Santos *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2011).

Because of the importance of bivalves in gastronomy and economics, the improvement of their preservation and the extension of their commercialisation period are of major interest. Conventional preservation methods are based on the use of flake ice (FI) (Nunes *et al.*, 1992) or chilled seawater (Kraus, 1992). In the last two decades, refrigeration systems based on ice slurries, pumpable microscopic mixtures of ice and water containing salts, have been successfully used to preserve the quality and extend the shelf life of fish products.

\*Correspondent: Fax: +34 981 825474;  
e-mail: jorge.barros@usc.es

The salts in the water lower the freezing point, and the water remains in liquid phase at temperatures slightly below 0 °C. This system has previously been evaluated for the preservation of fish species such as hake (Rodríguez *et al.*, 2004), horse mackerel (Losada *et al.*, 2005) and turbot (Rodríguez *et al.*, 2005), among others, and for crustacean species such as lobster (Aubourg *et al.*, 2007). In all cases, a significant ( $P < 0.05$ ) slowing down of microbial and biochemical degradation was observed. The slurry ice (SI) method was also successfully used to retard spoilage mechanisms and to extend the shelf life of farmed trout (Aubourg *et al.*, 2009), megrim (Aubourg *et al.*, 2006) and blackspot seabream (Alvarez *et al.*, 2009). Such studies reported significant decreases in the K index (a widely used indicator of autolytic degradation based on the levels of ATP metabolites), lipid damage indicators and microbial growth in the SI batches as compared to the FI batches.

However, despite the reported advantages of SI for the preservation of fish species, to the best of our knowledge, the use of this system for the preservation of bivalves has received little attention to date in the scientific literature. In this case, it was decided that SI would be packaged to: (i) avoid the superchilling of specimens, because bivalve species should remain alive during commercialisation; and (ii) allow that SI could be available at the end of storage for rehydration and cooking purposes, thus avoiding the use of home-made salty water. Thus, the aim of the present work was to evaluate the advantages of SI prepared from seawater and packaged under vacuum as compared to conventional FI packaged in the same way, for the preservation of three commercially relevant bivalve species: mussel (*Mytilus galloprovincialis*), European oyster (*Ostrea edulis*) and clam (*Venerupis rhomboides*). The effect of seasonal variability on bivalve quality during refrigerated storage in both chilling systems was also evaluated.

## Materials and methods

### Refrigeration systems

Slurry ice (SI) was prepared from filtered seawater by means of a FLO-ICE prototype (Kinarca S.A.U., Vigo, Spain). The composition of the slurry ice was 40% ice and 60% seawater (salinity: 3.3%). The temperature of the slurry ice mixture was -1.5 °C, measured by a calibrated thermometer (Testo, Lenkirch, Germany). The SI was sterilised by ozone injection, which was accomplished with a system provided by Cosemar Ozono (Madrid, Spain) with the redox potential adjusted to 700 mV (0.20 mg ozone L<sup>-1</sup>). Conventional FI was prepared from tap water by means of an Icematic F100 Compact device (Caltelmac, Castelfranco, Italy). The temperature of the conventional FI was +0.5 °C, measured by a calibrated thermometer (Testo). The FI

and the SI were introduced in polyethylene bags, in the latter case directly from the SI generator, vacuum-packaging being performed by means of a INELVI TV Series, model 2000 (INELVI, Sta. Coloma de Cervelló, Barcelona, Spain) device. To guarantee that bivalve specimens remained alive, random checking of the temperature was performed during storage with a view to ensure that this did not reach values below 0 °C. In all cases, the temperatures of bivalve specimens were in the 0 °C / +2 °C range, regardless the refrigeration system used.

### Bivalve specimens, processing and sampling

Live oyster, mussel and clam specimens were obtained from local producers of Cambados (Galicia, NW Spain) after purification according to Spanish Regulation (Real Decreto 571/1999). All bivalve specimens came from the Ria de Arosa (NW Spain), the natural estuary of the Uria River, which is known to be a prolific source of mussels and oysters worldwide. Both oysters and mussels were farmed in hanging ropes from *bateas*, wooden structures placed in the sea surface, while wild clams were collected from the sea bottom in the same area. The environmental parameters for spring specimens were the following: (i) air temperature: 12 °C; (ii) air relative humidity: 76%; (iii) water temperature: 13.5 °C and (iv) salinity: 3.1%, while the environmental parameters for autumn specimens were the following: (i) air temperature: 16 °C; (ii) air relative humidity: 78%; (iii) water temperature: 15.0 °C and (iv) salinity: 3.1%. The length and weight ranges of the bivalve specimens were the following: 3–5 cm and 30–40 g for clams; 6–9 cm and 40–80 g for mussels; and 6–10 cm and 40–60 g for oysters. For each season, two batches were considered for each bivalve species, one was stored in SI and the other in FI. From each batch, three samples were collected at each sampling time. Batches consisted of 40–45 clams, 30–35 mussels and 30–35 oysters, respectively, and were stored in closed and tagged polyspan boxes (80 × 40 × 20 cm) under SI or FI. All boxes were kept in a refrigerated room at +2 °C. Inside each box, the bags containing SI or FI were placed with bivalve specimens in a 1:1 w/w ratio. To determine the effect of seasonal variability on the effectiveness of the preservation methods, sampling was performed in autumn (October) and spring (April). At each sampling time, three specimens from each batch were examined for microbiological, biochemical and sensory analyses.

### Microbiological analyses

Samples of 5 g were aseptically dissected from oysters, clams and mussels, placed in a sterile masticator bag with an appropriate volume (1/9) (w/v) of 0.1% sterile peptone water (Merck, Darmstadt, Germany) and

1 homogenised in a masticator (AES, Combourg, France).  
2 In the case of mussels and oysters, and because of their  
3 size, only one specimen was necessary. In the case of  
4 clams, two/three specimens were normally mixed to get  
5 the required sample size. After homogenisation of the  
6 meat (any liquor present in the shell was discarded),  
7 microbial counts in  $10^{-1}$  to  $10^{-6}$  dilutions of the  
8 homogenates were determined. Total aerobic mesophiles  
9 and psychrotrophs were determined by the pour plate  
10 method, using Plate Count Agar (PCA; Oxoid Ltd.,  
11 London, UK) and incubating at 30 °C for 48 h and at  
12 4 °C for 7 days, respectively. Total *Enterobacteriaceae*  
13 levels were determined by pour plating on Violet Red  
14 Bile Glucose Agar (VRBG; Merck) and incubating at  
15 30 °C for 24–48 h. Proteolytic microorganisms were  
16 investigated by surface plating on casein-agar, as previ-  
17 ously described by Ben-Gigirey *et al.* (2000), and  
18 subsequent incubation at 30 °C for 48 h. In the autumn  
19 and the spring, samples were taken after 1, 2, 4 and  
20 6 days of storage. Each sampling time, three samples  
21 were analysed from the oyster, clam and mussel batches.  
22 The results were expressed as average  $\pm$  standard  
23 deviation (SD).  
24

#### 25 Biochemical analyses

27 Nucleotide degradation products analysis was carried  
28 out using 6% perchloric acid extracts from the edible  
29 part of molluscs according to the method of Ryder  
30 (1985). Analysis was performed by HPLC, using a  
31 Beckman device provided with the programmable  
32 solvent module 126 and the scanning detector module  
33 167 connected to System Gold software, version 8.1  
34 (Beckman Coulter, London, UK). Separations were  
35 achieved on a reverse-phase Spherisorb ODS-2 C18  
36 250  $\times$  4.60 mm column (Waters, Milford, MA, USA)  
37 with an internal particle diameter of 5  $\mu$ m. Standard  
38 curves for adenosine 5'-triphosphate (ATP) and each  
39 compound involved in its degradation pathway [aden-  
40 osine 5'-diphosphate (ADP), adenosine 5'-monophos-  
41 phate (AMP), inosine 5'-monophosphate (IMP),  
42 inosine (INO) and hypoxanthine (Hx)] were con-  
43 structed in the 0–1 mM range. Results for each  
44 degradation compound were calculated as  $\mu$ mol. The  
45 *K* value was calculated according to the following  
46 concentration ratio:

$$47 \quad K \text{ value (\%)} = 100 \times (\text{INO} + \text{Hx}) / (\text{ATP} + \text{ADP} \\ 48 \quad + \text{AMP} + \text{IMP} + \text{INO} + \text{Hx}) \text{ (Ryder, 1985).} \\ 49$$

51 Total volatile base-nitrogen (TVB-N) values were  
52 measured as previously reported by Aubourg *et al.*,  
53 1997.

54 Trimethylamine-nitrogen (TMA-N) values were  
55 determined by the picrate method, as previously  
56 described (Tozawa *et al.*, 1971). This method is based

on the preparation of a 5% trichloroacetic acid extract  
of edible part (10 g/25 mL). Results were expressed as  
mg TMA-N/100 g edible part.

#### Sensory analyses

Sensory analyses were performed using raw and cooked  
bivalves by a trained panel of five experienced judges,  
who have been involved in the sensory analysis of  
different kinds of seafood for 10 years. Bivalve speci-  
mens were cooked at 100 °C for 5 min in SI (SI batch)  
or in fresh water supplemented with 3.3% NaCl (FI  
batch). Raw and cooked bivalve samples (140 g) were  
presented individually to the panellists, with each  
panellist evaluating approximately 20 g of bivalve flesh.  
For it, the edible part was removed from the shell.  
Several specimens were considered to reach at least 20 g  
of edible part. Samples were prepared in a preparation  
room and were analysed in a well-ventilated isolated  
room provided with good lighting. Panellists were asked  
to score the odour and the appearance of the raw  
mussels, oysters or clams using a 0–5 point acceptability  
scale, with five corresponding to the highest quality and  
0 corresponding to the lowest quality (Anonymous,  
1999). In the case of cooked samples, the panellists  
evaluated the taste and juiciness of samples using a 0–5  
point acceptability scale.

#### Statistical analyses

Data from the three different assays were subjected to  
analysis of variance (ANOVA). PASW Statistics 18 (SPSS,  
Chicago, IL, USA) was used to explore the statistical  
significance of the differences between batches. Differ-  
ences were considered significant for a confidence  
interval at the 95% level ( $P < 0.05$ ) in all cases.

## Results and discussion

### Comparative microbial analysis in autumn and spring bivalve specimens

The comparative microbial evolution during the storage  
of clams, oysters and mussels harvested during the  
autumn can be seen in Table 1. Statistically significant  
( $P < 0.05$ ) lower mesophiles numbers were present in  
clams, oysters and mussels stored in SI for 6 days  
compared with FI (Table 1). Likewise, storage for  
6 days under SI provided a significant ( $P < 0.05$ )  
inhibition of psychrotrophs for all three bivalve species  
caught in the autumn (Table 1).

The storage of autumn specimens in SI also provided  
better control of *Enterobacteriaceae*, with significant  
( $P < 0.05$ ) differences being observed (Table 1). No  
beneficial effect of SI in terms of *Enterobacteriaceae*  
counts was observed for mussels caught in the autumn.

**Table 1** Comparative microbial evolution in clams (*Venerupis rhomboideus*), oysters (*Ostrea edulis*) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under ozonised slurry ice (SI) or flake ice (FI) in the autumn. Results are expressed as log of the colony-forming units per gram of tissue

Bivalve	Storage day	Mesophiles		Psychrotrophs		Enterobacteriaceae		Proteolytic bacteria	
		FI	SI	FI	SI	FI	SI	FI	SI
Clams	1	2.60 ± 0.11	2.48 ± 0.06	2.39 ± 0.19	2.46 ± 0.10	0.90 ± 0.00	0.90 ± 0.00	1.90 ± 0.00	1.90 ± 0.00
	2	3.13 ± 0.25	2.8 ± 0.43	2.63 ± 0.38	2.76 ± 0.15	1.63 ± 0.15 (a)	1.00 ± 0.00 (b)	2.33 ± 0.58	2.33 ± 0.58
	4	3.43 ± 0.68	3.15 ± 0.03	3.15 ± 0.01 (a)	2.98 ± 0.06 (b)	2.18 ± 1.28 (a)	0.97 ± 0.06 (b)	2.50 ± 0.50	2.65 ± 0.05
	6	3.92 ± 0.51 (a)	3.20 ± 0.03 (b)	3.59 ± 0.32 (a)	3.14 ± 0.08 (b)	2.15 ± 0.55 (a)	1.10 ± 0.20 (b)	3.31 ± 0.53 (a)	2.39 ± 0.09 (b)
Oysters	1	2.92 ± 0.25	2.81 ± 0.14	2.76 ± 0.21	2.72 ± 0.05	1.24 ± 0.24 (b)	1.63 ± 0.15 (a)	2.81 ± 0.03	2.34 ± 0.44
	2	2.91 ± 0.02 (a)	2.51 ± 0.36 (b)	2.84 ± 0.05 (a)	2.54 ± 0.23 (b)	1.19 ± 0.29 (a)	0.90 ± 0.00 (b)	2.24 ± 0.24	2.10 ± 0.20
	4	4.32 ± 0.09 (a)	2.46 ± 0.26 (b)	3.81 ± 0.34 (a)	2.44 ± 0.16 (b)	1.30 ± 0.30 (a)	0.90 ± 0.00 (b)	2.42 ± 0.42	2.00 ± 0.00
	6	4.47 ± 0.25 (a)	3.59 ± 0.32 (b)	4.73 ± 0.25 (a)	3.90 ± 0.85 (b)	2.39 ± 0.19 (a)	0.90 ± 0.00 (b)	3.43 ± 0.68 (a)	2.53 ± 0.50 (b)
Mussels	1	2.12 ± 0.12 (b)	3.10 ± 0.62 (a)	1.52 ± 0.62 (b)	3.09 ± 0.69 (a)	0.90 ± 0.00 (b)	2.38 ± 0.90 (a)	1.90 ± 0.00 (b)	3.33 ± 0.42 (a)
	2	2.79 ± 0.53 (a)	2.18 ± 0.23 (b)	2.82 ± 0.59 (a)	1.97 ± 0.07 (b)	1.54 ± 0.64 (a)	0.90 ± 0.00 (b)	2.54 ± 0.64	1.96 ± 0.06
	4	4.42 ± 0.02 (a)	2.88 ± 0.46 (b)	4.49 ± 0.09 (a)	2.70 ± 0.50 (b)	0.95 ± 0.05	0.95 ± 0.05	2.00 ± 0.00	1.96 ± 0.06
	6	5.40 ± 0.60 (a)	3.93 ± 0.90 (b)	5.93 ± 1.10 (a)	3.96 ± 0.85 (b)	1.19 ± 0.29	1.27 ± 0.35	2.30 ± 0.30	2.06 ± 0.21

The results are expressed as mean ± range. Means followed by different letters (a–b) are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Finally, the autumn specimens of oyster also exhibited significantly ( $P < 0.05$ ) better control of proteolytic bacteria after 6 days of storage in SI (Table 1). The numbers of proteolytic bacteria were also lower in clams and mussels stored in SI at the end of the storage period as compared with FI, although for mussels these differences were not statistically significant (Table 1).

The comparative microbial evolution during the storage of clams, oysters and mussels harvested during the spring is presented in Table 2. Statistically significant ( $P < 0.05$ ) lower mesophiles numbers were present in clams and mussels stored in SI for 6 days as compared with FI (Table 2). Likewise, differences in the mesophiles counts were determined between batches for spring clams, oysters and mussels, respectively,

throughout storage. The results obtained for mesophiles in the spring specimens revealed significantly ( $P < 0.05$ ) lower microbial counts for oysters and mussels as compared to autumn specimens regardless of the icing system. Accordingly, the relative differences in mesophiles numbers were lower for oyster and mussel spring specimens than for autumn specimens, with SI exerting a particularly beneficial preservation effect on the latter.

With respect to psychrotrophs, storage for 6 days under SI provided a significant ( $P < 0.05$ ) inhibition of this bacterial group in clams and mussels caught in the spring (Table 2). Remarkably, SI did not provide any significant advantage with respect to psychrotrophs growth in spring oyster specimens. Thus, as in the case of mesophiles, oyster and mussel specimens caught in the spring harboured a lower bacterial load compared to

**Table 2** Comparative microbial evolution in clams (*Venerupis rhomboideus*), oysters (*Ostrea edulis*) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under ozonised slurry ice (SI) or flake ice (FI) in the spring. Results are expressed as log of the colony-forming units per gram of tissue

Bivalve	Storage day	Mesophiles		Psychrotrophs		Enterobacteriaceae		Proteolytic bacteria	
		FI	SI	FI	SI	FI	SI	FI	SI
Clams	1	3.21 ± 0.57	2.54 ± 0.34	3.00 ± 0.00 (a)	2.77 ± 0.26 (b)	1.30 ± 0.30	1.30 ± 0.30	3.97 ± 0.10 (a)	2.30 ± 0.30 (b)
	2	3.24 ± 0.43 (a)	2.34 ± 0.24 (b)	2.98 ± 0.32	2.82 ± 0.29	1.38 ± 0.12	1.32 ± 0.13	3.23 ± 0.15 (a)	2.30 ± 0.30 (b)
	4	3.11 ± 0.10 (a)	2.50 ± 0.07 (b)	3.01 ± 0.08 (a)	2.64 ± 0.06 (b)	1.34 ± 0.50	0.99 ± 0.00	2.98 ± 0.54 (a)	2.00 ± 0.01 (b)
	6	3.95 ± 0.98 (a)	3.23 ± 0.55 (b)	3.98 ± 0.54 (a)	3.20 ± 0.28 (b)	0.99 ± 0.00	1.24 ± 0.34	3.06 ± 0.08 (a)	2.30 ± 0.43 (b)
Oysters	1	3.33 ± 0.01 (a)	2.87 ± 0.05 (b)	3.05 ± 0.14 (b)	3.74 ± 0.06 (a)	2.54 ± 0.28 (a)	1.59 ± 0.16 (b)	2.90 ± 0.08	2.83 ± 0.18
	2	3.83 ± 0.65 (a)	3.03 ± 0.15 (b)	3.36 ± 0.57	3.96 ± 0.25	3.13 ± 0.32 (a)	1.63 ± 0.25 (b)	3.03 ± 0.15	3.20 ± 0.20
	4	4.21 ± 0.02 (a)	3.49 ± 0.05 (b)	4.21 ± 0.27	5.06 ± 0.14	3.67 ± 0.07 (a)	1.74 ± 0.07 (b)	3.28 ± 0.03	3.27 ± 0.27
	6	4.16 ± 0.22	3.89 ± 1.05	3.68 ± 0.01	3.70 ± 0.70	4.95 ± 0.00 (a)	1.84 ± 1.21 (b)	3.60 ± 0.04	3.11 ± 0.58
Mussels	1	2.88 ± 0.03 (a)	2.68 ± 0.06 (b)	3.82 ± 0.42 (a)	2.87 ± 0.04 (b)	2.16 ± 0.06 (a)	1.15 ± 0.22 (b)	2.39 ± 0.12 (a)	2.00 ± 0.01 (b)
	2	2.83 ± 0.65	2.87 ± 0.25	3.05 ± 0.14	3.74 ± 0.06	2.54 ± 0.28 (a)	1.59 ± 0.16 (b)	2.90 ± 0.08	2.83 ± 0.18
	4	3.12 ± 0.23 (a)	2.45 ± 0.15 (b)	2.98 ± 0.09	2.80 ± 0.07	1.24 ± 0.34	0.99 ± 0.00	2.93 ± 0.04 (a)	1.99 ± 0.00 (b)
	6	3.48 ± 0.12 (a)	2.99 ± 0.13 (b)	3.74 ± 0.22 (a)	2.86 ± 0.11 (b)	1.00 ± 0.01	0.99 ± 0.00	2.50 ± 0.28 (a)	2.00 ± 0.01 (b)

The results are expressed as mean ± range. Means followed by different letters (a–b) are significantly different ( $P < 0.05$ ).

1 autumn specimens, where microbial growth was more  
2 favoured and SI was especially efficient in mesophiles  
3 and psychrotrophs control.

4 The storage of spring specimens in SI provided for  
5 better control of *Enterobacteriaceae* in oysters, with  
6 significant ( $P < 0.05$ ) differences being determined  
7 between batches on the sixth day of storage (Table 2).  
8 No beneficial effects of SI in terms of *Enterobacteriaceae*  
9 counts were observed for clams caught in the spring.  
10 Comparing the seasonal variability of specimens in  
11 terms of the advantages provided by SI, this system  
12 proved to be useful for the control of *Enterobacteriaceae*  
13 in both seasons.

14 Finally, spring specimens of clams and mussels  
15 exhibited significantly ( $P < 0.05$ ) better control of  
16 proteolytic bacteria after storage in SI (Table 2). The  
17 numbers of proteolytic bacteria were also lower in  
18 oysters belonging to the SI batch at the end of the  
19 storage period as compared to FI, although these  
20 differences were not statistically significant (Table 2).  
21 As in the case of mesophiles and psychrotrophs, the use  
22 of SI resulted in a better control of proteolytic bacteria  
23 in clams and mussels caught in the spring.

24 In global terms, oysters were the bivalve species that  
25 exhibited the most seasonal variability. Thus, SI was  
26 especially useful for the preservation of autumn oysters  
27 but not for spring oysters. The facts that oysters usually  
28 spawn by late June and that small increases in water  
29 temperature may favour spawning may be related to the  
30 remarkable microbiological differences observed for this  
31 species between spring and autumn specimens. In  
32 contrast, the SI system worked well for clams and  
33 mussels in both autumn and spring, although the  
34 advantages of such a system were especially remarkable  
35 in spring mussels and autumn clams.

Microbiological studies carried out in a different clam  
species than those used in this study (*Mercenaria  
mercenaria*) showed a greater microbial accumulation  
in autumn and winter months as compared to spring  
and summer months, probably because hardshelled  
clams stop filter feeding at temperatures below 4 °C  
(Burkhardt *et al.*, 1992). Kaspar & Tamplin (1993)  
found that the highest accumulation of microorganisms  
in clams occurred during certain periods in the spring  
season. In our study, bivalve specimens collected in the  
autumn exhibited slightly higher microbial concentra-  
tions than spring batches, probably because the water  
temperatures at April (13.5 °C) were colder than in  
October (15 °C) on the Atlantic coast estuary where  
these specimens were collected. However, the effects of  
SI on the microbial quality of the bivalve species studied  
were notably improved regardless of the season consid-  
ered, especially in the case of clams and mussels.

#### Comparative biochemical quality in autumn and spring specimens

Microbial activity was also assessed by related chemical  
indices, such as TVB-N and TMA-N values (Tables 3  
and 4). The TVB-N content increased in all samples as  
storage progressed, especially in mussels. An inhibitory  
effect on microbial growth ( $P < 0.05$ ) of SI treatment  
was evident in all species corresponding to the spring  
season, especially at advanced storage periods (Table 4),  
while in the case of autumn samples, the differences were  
only significant for clams (Table 3).

An inhibitory effect of SI on TMA-N formation was  
also observed. As in the case of TVB-N, significant  
differences ( $P < 0.05$ ) were mainly observed in the  
spring samples (Table 4). Except for autumn clams, all

37  
38 **Table 3** Comparative evolution of chemical parameters related to quality loss of clams (*Venerupis rhomboideus*), oysters (*Ostrea edulis*) and mussels  
39 (*Mytilus galloprovincialis*) stored under ozonised slurry ice (SI) or flake ice (FI) in the autumn

Bivalve	Storage day	K value		TVB-N		TMA-N	
		FI	SI	FI	SI	FI	SI
Clams	1	41.50 ± 1.24	37.25 ± 4.85	24.24 ± 1.90	23.91 ± 0.48	2.44 ± 0.37	2.27 ± 0.85
	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4	44.07 ± 4.23	39.19 ± 5.18	26.77 ± 1.67	25.08 ± 1.19	2.83 ± 1.13	2.41 ± 0.47
Oysters	6	44.92 ± 0.21	39.34 ± 1.76	25.42 ± 0.24 (a)	23.90 ± 0.10 (b)	4.34 ± 0.13 (a)	3.71 ± 0.07 (b)
	1	10.10 ± 0.48	9.12 ± 0.30	13.64 ± 0.71	12.63 ± 0.24	1.74 ± 0.11 (a)	1.17 ± 0.15 (b)
	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Mussels	4	15.68 ± 1.25	12.44 ± 0.42	15.49 ± 0.55	14.81 ± 0.05	1.62 ± 0.40	1.30 ± 0.41
	6	16.75 ± 0.35	14.92 ± 0.15	17.51 ± 0.95	17.51 ± 0.35	1.64 ± 0.21	1.24 ± 0.77
	1	15.27 ± 1.53	14.29 ± 0.21	18.99 ± 3.38	17.47 ± 6.19	0.60 ± 0.13	0.61 ± 0.14
Mussels	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4	15.84 ± 0.11	14.59 ± 1.89	32.83 ± 4.52	28.62 ± 1.43	1.16 ± 0.04 (a)	0.82 ± 0.14 (b)
	6	18.50 ± 0.96	17.29 ± 1.33	31.31 ± 1.43	28.11 ± 3.57	1.19 ± 0.18	1.00 ± 0.29

51 ND, not determined; TMA-N, trimethylamine-nitrogen; TVB-N, total volatile base-nitrogen.

52 The results are expressed as mean ± range. Means followed by different letters (a–b) are significantly different ( $P < 0.05$ ).

**Table 4** Comparative evolution of chemical parameters related to quality loss of clams (*Venerupis rhomboideus*), oysters (*Ostrea edulis*) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under ozonised slurry ice (SI) or flake ice (FI) in the spring

Bivalve	Storage day	K value		TVB-N		TMA-N	
		FI	SI	FI	SI	FI	SI
Clams	1	12.47 ± 0.44	7.93 ± 1.46	24.24 ± 0.76	24.24 ± 0.95	2.04 ± 0.11	2.19 ± 0.09
	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4	14.64 ± 0.70	14.77 ± 0.13	27.61 ± 0.67	25.27 ± 0.48	3.52 ± 0.19	3.15 ± 0.17
	6	18.55 ± 0.80	16.55 ± 0.21	34.58 ± 0.48 (a)	29.590 ± 1.10 (b)	4.23 ± 0.23 (a)	3.14 ± 0.19 (b)
Oysters	1	0.71 ± 0.17	0.51 ± 0.14	12.12 ± 0.07	11.78 ± 0.48	0.48 ± 0.14	0.48 ± 0.07
	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4	5.90 ± 0.53	3.18 ± 0.19	23.57 ± 0.05	17.85 ± 0.48	0.87 ± 0.03 (a)	0.68 ± 0.13 (b)
	6	6.89 ± 0.38	4.47 ± 1.71	21.89 ± 2.38 (a)	16.16 ± 0.05 (b)	1.16 ± 0.28 (a)	0.85 ± 0.10 (b)
Mussels	1	13.54 ± 1.01	7.71 ± 1.26	19.19 ± 1.43	17.17 ± 1.43	2.29 ± 0.29 (a)	0.60 ± 0.13 (b)
	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4	15.65 ± 2.16	10.75 ± 0.13	35.35 ± 0.48 (a)	27.95 ± 0.48 (b)	3.25 ± 0.15 (a)	1.17 ± 0.21 (b)
	6	17.46 ± 1.62	14.94 ± 6.75	35.69 ± 2.09 (a)	25.93 ± 1.43 (b)	3.14 ± 0.19 (a)	1.26 ± 0.10 (b)

ND, not determined; TMA-N, trimethylamine-nitrogen; TVB-N, total volatile base-nitrogen.

The results are expressed as mean ± range. Means followed by different letters (a–b) are significantly different ( $P < 0.05$ ).

samples showed a progressive increase in this parameter as refrigeration time progressed (Tables 3 and 4).

During post-mortem bivalve muscle storage, muscle nucleotides degrade in a series of stages because of endogenous biochemical changes. The level of major adenine nucleotides and their related compounds has been utilised extensively as an index of freshness ( $K$  value assessment) of fish muscle (Howgate, 2006). In the present research (Tables 3 and 4), specimens corresponding to the three species and to both icing conditions showed a progressive increase in  $K$  value with chilling time. Although no significant differences ( $P > 0.05$ ) were associated with the icing system employed, higher mean values were obtained in all cases for specimens

kept under traditional FI conditions as compared with those kept under SI conditions. In addition, higher  $K$  values were observed for specimens corresponding to the autumn season (Table 3) compared to their counterparts caught in the spring (Table 4). This difference was especially relevant in clams.

#### Comparative sensory quality in autumn and spring specimens

The results of the sensory evaluation in autumn specimens from the three species under the different refrigeration conditions are presented in Table 5. Clams, oysters and mussels presented a fresh and pleasant

**Table 5** Comparative sensory quality of clams (*Venerupis rhomboideus*), oysters (*Ostrea edulis*) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under ozonised slurry ice (SI) or flake ice (FI) in the autumn

Bivalve	Storage day	Odour		Appearance		Taste and juiciness	
		FI	SI	FI	SI	FI	SI
Clams	1	5.00 ± 0.00	4.80 ± 0.40	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00
	2	4.00 ± 0.63	4.20 ± 0.40	3.80 ± 0.45	4.80 ± 0.40	3.20 ± 0.45	3.80 ± 0.45
	4	3.00 ± 0.63	3.80 ± 0.40	1.80 ± 0.45	2.40 ± 0.55	1.40 ± 0.55	3.40 ± 0.49
	6	2.00 ± 0.89	3.20 ± 0.74	1.00 ± 0.00 (b)	2.80 ± 0.40 (a)	1.20 ± 0.45 (b)	2.80 ± 0.40 (a)
Oysters	1	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00
	2	4.60 ± 0.55	4.80 ± 0.55	4.40 ± 0.55	4.40 ± 0.55	4.40 ± 0.55	4.60 ± 0.55
	4	1.80 ± 0.45	3.46 ± 0.71	2.60 ± 0.55	2.80 ± 0.45	2.00 ± 0.71	3.20 ± 0.45
	6	1.00 ± 0.00 (b)	2.40 ± 0.55 (a)	1.20 ± 0.45 (b)	2.40 ± 0.55 (a)	1.00 ± 0.00 (b)	2.20 ± 0.40 (a)
Mussels	1	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00
	2	3.20 ± 0.45	4.41 ± 0.55	4.40 ± 0.55	4.80 ± 0.40	4.40 ± 0.55	4.60 ± 0.55
	4	2.00 ± 0.89	3.20 ± 0.45	2.40 ± 0.55	3.20 ± 0.45	2.40 ± 0.55	3.20 ± 0.45
	6	1.00 ± 0.00 (b)	2.00 ± 0.00 (a)	1.00 ± 0.0 (b)	1.80 ± 0.45 (a)	1.00 ± 0.00	1.40 ± 0.55

The results are expressed as mean ± range. Means followed by different letters (a–b) are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Scored on 1–5 point scale (1: lowest quality; 5: highest quality).

odour and a brilliant appearance on storage day one in both the raw and the cooked specimens. In clams, on day 6, the SI batch exhibited significantly ( $P < 0.05$ ) better quality in terms of juiciness, taste and appearance compared with clams stored in FI (Table 5). On day 6, clams stored in FI presented an unacceptable odour, taste and appearance compared with clams stored in SI, whose quality was acceptable (Table 5). Sensory analysis of oysters and mussels from the autumn season on day 4 also showed a higher loss of juiciness in the FI batch compared to the SI batch. The SI batch retained acceptable quality in terms of odour, taste and appearance (Table 5). On day 6, none of the autumn oyster or mussel batches was acceptable, because the average scores were below 2.0.

The results of the sensory evaluations of the spring specimens are presented in Table 6. Clam specimens stored in SI maintained better ( $P < 0.05$ ) quality on day 6 than their spring counterparts. The differences between the SI and FI batches of spring clams were larger than in the case of autumn batches. Oysters kept in SI also exhibited better quality on day 6 than spring specimens kept in SI, the former exhibiting acceptable quality at that time. As in the case of clams, the differences between SI and FI spring oyster batches were significant ( $P < 0.05$ ) and larger than between autumn batches. No remarkable differences that may be attributed to seasonal variability were observed in mussels, except for taste and juiciness and appearance on day 6.

Seasonal studies carried out on a different species of mussel than those analysed here, *Mytilus edulis* (Kryznowek & Wiggin, 1979), found that mussels harvested in the spring retained sensory acceptability for a longer time than mussels harvested in the fall or winter, a result that is in agreement with our microbial, biochemical and

sensory results from the SI batches. A possible explanation of these findings might be related to, among others, (i) the lower temperature of water in spring (13.5 °C) as compared to autumn (15.0 °C) and to (ii) the weaker physiological state of shellfish from autumn season, once spawning had been completed. These reasons could explain the better microbial and sensory quality determined for the specimens from spring season. Other parameters, such as feeding availability or proximate composition of specimens, were not evaluated in this study.

Finally, we must emphasise that differences observed between batches stored in SI and FI are because of many causes, the most relevant being, among others: (i) the faster chilling rate of SI, which is a consequence of its higher heat-exchange capacity; (ii) the *ca.* 1.5 °C lower storage temperature provided by SI would imply a square root relationship between batches, this predicting a 1.3-fold increase in the shelf lives of the SI batches as compared to the FI batches (Dalgaard, 2009); (iii) the more complete coverage of the bivalve specimens by the packages containing the SI mixture, which also afforded a better protection of the specimens with respect to oxidation and dehydration events; and (iv) the use of the SI mixture as rehydration and cooking media, which allowed a better recovery of sensory parameters as compared to the control batch.

## Conclusions

Refrigerated storage of clams, oysters and mussels in the proposed SI system was associated with a better maintenance of microbial and sensory quality and extended shelf life, which is a result of practical interest for commercialisation strategies. Bivalve specimens

**Table 6** Comparative sensory quality of clams (*Venerupis rhomboideus*), oysters (*Ostrea edulis*) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under ozonised slurry ice (SI) or flake ice (FI) in the spring

Bivalve	Storage day	Odour		Appearance		Taste and juiciness	
		FI	SI	FI	SI	FI	SI
Clams	1	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00
	2	3.20 ± 0.45	4.20 ± 0.40	4.40 ± 0.55	4.60 ± 0.55	3.40 ± 0.71	4.20 ± 0.40
	4	2.20 ± 0.40	3.80 ± 0.40	3.20 ± 0.45	4.20 ± 0.40	2.80 ± 0.45	3.80 ± 0.40
	6	1.40 ± 0.55 (b)	3.80 ± 0.40 (a)	2.80 ± 0.45 (b)	3.20 ± 0.45 (a)	1.60 ± 0.89 (b)	2.80 ± 0.40 (a)
Oysters	1	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00
	2	4.20 ± 0.40	4.40 ± 0.55	4.40 ± 0.55	4.40 ± 0.55	4.40 ± 0.55	4.60 ± 0.55
	4	2.20 ± 0.40	3.40 ± 0.71	2.80 ± 0.40	2.80 ± 0.4	2.80 ± 0.45	3.20 ± 0.45
	6	1.80 ± 0.45 (b)	3.80 ± 0.40 (a)	2.80 ± 0.40 (b)	3.20 ± 0.45 (a)	2.40 ± 0.55 (b)	3.00 ± 0.00 (a)
Mussels	1	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00
	2	3.20 ± 0.45	4.40 ± 0.55	4.60 ± 0.55	4.80 ± 0.40	4.40 ± 0.55	4.60 ± 0.55
	4	2.00 ± 0.00	3.20 ± 0.45	2.80 ± 0.40	3.80 ± 0.40	2.40 ± 0.55	3.20 ± 0.45
	6	1.00 ± 0.00 (b)	2.00 ± 0.70 (a)	2.40 ± 0.55 (b)	3.20 ± 0.45 (a)	1.00 ± 0.00 (b)	2.40 ± 0.55 (a)

The results are expressed as mean ± range. Means followed by different letters (a–b) are significantly different ( $P < 0.05$ ). Scored on 1–5 point scale (1: lowest quality; 5: highest quality).

caught in the spring at a water temperature of 13.5 °C were found to harbour a lower microbial load than their counterparts caught in the autumn at a water temperature of 15.0 °C. The SI also proved to be a useful cooking medium, because of the advantages of using seawater instead of fresh water supplemented with salt, leading to better sensory scores. For these reasons, the use of SI as a refrigeration and cooking medium for bivalves is advisable.

### Acknowledgments

The authors thank Ms. Carmen Carreira for her excellent technical assistance. This work was supported by the Secretaría Xeral de I+D from the Xunta de Galicia (Galicia, Spain) through Research Project PGI-DIT06TAL061E.

### References

- Alvarez, V., Feás, X., Barros-Velázquez, J. & Aubourg, S.P. (2009). Quality changes of farmed blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) subjected to slaughtering and storage under flow ice and ozonised flow ice. *International Journal of Food Science and Technology*, **44**, 1561–1571.
- Anonymous (1999). Codex guidelines for the sensory evaluation of fish and shellfish in laboratories. *CAC-GL*, **31**, 1–33.
- Aubourg, S., Sotelo, C. & Gallardo, J.M. (1997). Quality assessment of sardines during storage by measurement of fluorescent compounds. *Journal of Food Science*, **304**, 295–298.
- Aubourg, S., Rodríguez, A. & Gallardo, J. (2005). Rancidity development during frozen storage of mackerel (*Scomber scombrus*): effect of catching season and commercial presentation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **107**, 316–323.
- Aubourg, S., Losada, V., Gallardo, J.M., Miranda, J.M. & Barros-Velázquez, J. (2006). On-board quality preservation of megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*) by a novel ozonised-slurry ice system. *European Food Research and Technology*, **223**, 232–237.
- Aubourg, S., Losada, V., Prado, M., Miranda, J.M. & Barros-Velázquez, J. (2007). Improvement of the commercial quality of chilled Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) stored in slurry ice: effects of a preliminary treatment with an antimelanic agent on enzymatic browning. *Food Chemistry*, **103**, 741–748.
- Aubourg, S.P., Testi, S., Sanxuás, M., Gil, C. & Barros-Velázquez, J. (2009). Improved quality and shelf life of farmed trout (*Oncorhynchus mykiss*) by whole processing in a combined ozonised flow ice refrigeration system. *International Journal of Food Science and Technology*, **44**, 1595–1601.
- Bandarra, N., Batista, I., Nunes, M. & Empis, J. (2001). Seasonal variations in the chemical composition of horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *European Food Research and Technology*, **212**, 535–539.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J., Villa, T. & Barros-Velázquez, J. (2000). Characterization of biogenic amine-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from white muscle of fresh and frozen albacore tuna. *International Journal of Food Microbiology*, **57**, 19–31.
- Burkhardt, W., Watkins, W.D. & Rippey, S.R. (1992). Seasonal effects on accumulation of microbial indicator organisms by *Mercenaria mercenaria*. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**, 826–831.
- Cabello, A.M., Lezama, R.D.V., Garcia, B.E.F., Marcano, M.C.R., Figueroa, Y.D.M. & Gonzalez, O.M.V. (2004). Freshness parameters of mollusks. *Revista Científica-Facultad de Ciencias Veterinarias*, **14**, 457–466.
- Caglak, E., Cakli, S. & Berna, K. (2008). Microbial, chemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. *European Food Research and Technology*, **226**, 1293–1299.
- Dalgaard, P. (2009). *Seafood Spoilage and Safety Predictor (SSSP) Predictive Microbiology Version 3.1*. Lyngby, Denmark: National Institute of Aquatic Resources (DTU Aqua), Technical University of Denmark.
- Freire-Santos, F., Oteiza-López, A.M., Vergara-Castiblanco, C.A., Ares-Mazás, E., Alvarez-Suárez, E. & Garcia Martin, O. (2000). Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption. *Journal of Parasitology*, **86**, 853–854.
- Grigorakis, K., Taylor, K.D.A. & Alexis, M.N. (2003). Seasonal patterns of spoilage of ice-stored cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chemistry*, **81**, 263–268.
- Howgate, P. (2006). A review of the kinetics of degradation of inosine monophosphate in some species of fish during chilled storage. *International Journal of Food Science & Technology*, **41**, 341–353.
- Kaspar, C.W. & Tamplin, M.L. (1993). Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 2425–2429.
- Kolakowska, A., Kwiatkowska, L., Lachowicz, K., Gajowiecki, L. & Bortnowska, G. (1992). Effect of fishing season on frozen-storage quality of Baltic herring. In: *Seafood Science and Technology* (edited by E.G. Bligh). Pp. 269–277. Oxford, UK: Fishing News Books, Canadian Institute of Fisheries Technology.
- Kraus, L. (1992). Refrigerated sea water treatment of herring and mackerel for human consumption. In: *Pelagic Fish. The Resource and Its Exploitation* (edited by J. Burt, R. Hardy & K. Whittle). Pp. 73–81. Aberdeen, Scotland, UK: Fishing News Books.
- Krzyznówek, J. & Wiggin, K. (1979). Seasonal variation and frozen storage stability of blue mussels (*Mytilus edulis*). *Journal of Food Science*, **44**, 1644–1645.
- Lees, D. (2000). Viruses and bivalve shellfish. *International Journal of Food Microbiology*, **59**, 81–116.
- Losada, V., Pineiro, C., Barros-Velázquez, J. & Aubourg, S.P. (2005). Inhibition of chemical changes related to freshness loss during storage of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in slurry ice. *Food Chemistry*, **93**, 619–625.
- Murchie, L.W., Cruz-Romero, M., Kerry, J.P. et al. (2005). High pressure processing of shellfish: a review of microbiological and other quality aspects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **6**, 257–270.
- Nunes, M.L., Batista, I. & De Campos, R.M. (1992). Physical, chemical and sensory analysis of sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *Journal of the Science of Food Agriculture*, **59**, 37–43.
- Olafsdóttir, G., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, J. et al. (1997). Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science & Technology*, **8**, 258–265.
- Oliveira, J., Cunha, A., Castilho, F., Romalde, J.L. & Pereira, M.J. (2011). Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: crucial aspects in monitoring and future perspectives. A mini-review. *Food Control*, **22**, 805–816.
- Pearson, A., Love, J. & Shorland, F. (1977). “Warmed-over” flavor in meat, poultry and fish. *Advances in Food Research*, **23**, 1–74.
- Piggot, G. & Tucker, B. (1990). Science opens new horizons for marine lipids in human nutrition. *Food Reviews International*, **3**, 105–138.
- Real Decreto (571/1999), el 9 de abril, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria que fija las normas aplicables a la producción y comercialización de moluscos bivalvos vivos. *Boletín Oficial del Estado*, **86**, 13522–13531.
- Rodríguez, O., Losada, V., Aubourg, S.P. & Barros-Velázquez, J. (2004). Enhanced shelf-life of chilled European hake (*Merluccius merluccius*) stored in slurry ice as determined by sensory analysis and assessment of microbiological activity. *Food Research International*, **37**, 749–757.

- 1 Rodríguez, O., Barros- Velázquez, J., Piñeiro, C., Gallardo, J.M. &  
2 Aubourg, S.P. (2005). Effects of storage in slurry ice on the  
3 microbial, chemical and sensory quality and on the shelf life of  
4 farmed turbot (*Psetta maxima*). *Food Chemistry*, **95**, 270–278.
- 5 Romalde, J.L., Estes, M.K., Szucs, G., Atmar, R.L., Woodley, C.M. &  
6 Metcalf, T.G. (1994). In situ detection of hepatitis A virus in cell  
7 cultures and shellfish tissues. *Applied and Environmental Microbiol-*  
8 *ogy*, **60**, 1921–1926.
- 9 Roth, B., Johansen, S., Suontama, J. *et al.* (2005). Seasonal variation  
10 in flesh quality, comparison between large and small Atlantic  
11 salmon (*Salmo salar*) transferred into seawater as 0+ or 1+ smolts.  
12 *Aquaculture*, **250**, 830–840.
- 13 Ryder, J. (1985). Determination of adenosine triphosphate and its  
14 breakdown products in fish muscle by high performance liquid  
15 chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **33**,  
16 678–680.
- 17 Saito, H., Ishihara, K. & Murase, T. (1997). The fatty acid compo-  
18 sition in tuna (bonito, *Euthynnus pelamis*) caught at three different  
19 localities from tropics to temperate. *Journal of Science of Food*  
20 *Agriculture*, **73**, 53–59.
- 21 Tozawa, H., Erokibara, K. & Amano, K. (1971). Proposed modifica-  
22 tion of Dyer's method for trimethylamine determination in codfish.  
23 In: *Fish Inspection and Quality Control* (edited by R. Kreuzer). Pp.  
24 187–190. London, UK: Fishing News Books Ltd.
- 25 Whittle, K., Hardy, R. & Hoobs, G. (1990). Chilled fish and fishery  
26 products. In: *Chilled Foods. The State of the Art* (edited by T.  
27 Gormeley). Pp. 87–116. New York, NY: Elsevier Applied Science.
- 28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56



## **CAPÍTULO 2: Mejora de la calidad microbiológica y sensorial de almeja (*Venerupis rhomboideus*), ostra (*Ostrea edulis*) y mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) mediante refrigeración en un sistema de hielo líquido envasado.**

Continuando con el primer objetivo de este trabajo de investigación, en este capítulo se procedió a la evaluación de un sistema de embalaje mediante hielo líquido ozonizado en tres especies de bivalvos: almeja (*Venerupis romboides*), ostra (*Ostrea edulis*) y mejillón (*Mytilus galloprovincialis*). Los parámetros microbiológicos, sensoriales y bioquímicos fueron analizados para los especímenes capturados en otoño y en primavera, y se compararon con sus homólogos almacenados en hielo en escamas convencional.

### **Análisis microbiológico**

La evolución microbiológica en los bivalvos capturados en otoño y almacenados en el sistema de hielo líquido con ozono (HLO) presentó recuentos microbiológicos bajos, observándose diferencias significativas para aerobios mesófilos en comparación con el sistema de hielo en escamas (HT). Asimismo, se observó una inhibición del crecimiento de la microbiota psicrófila durante los 6 días de almacenamiento para las tres especies de bivalvos capturados en otoño y almacenados en el sistema HLO. Además el almacenamiento de las muestras de almeja y ostra en otoño bajo el sistema HLO proporcionó un buen control en el desarrollo de *Enterobacteriaceae*, observándose diferencias significativas con respecto al sistema de almacenamiento en HT. Sin embargo, en términos de recuentos de *Enterobacteriaceae*, no se observaron efectos beneficiosos

mediante el empleo de HLO para el mejillón capturado en otoño. Por último, las muestras de ostra capturadas en otoño exhibieron un control significativamente ( $P < 0,05$ ) mejor en cuanto a la microbiota proteolítica después de 6 días de almacenamiento en HLO. Los recuentos de la microbiota proteolítica en almejas y mejillones almacenados en HLO resultaron ser menores al final del periodo de almacenamiento comparados con los almacenados en HT; sin embargo, en el caso del mejillón no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto a la evolución microbiológica comparativa durante los 6 días de almacenamiento para almeja y ostra capturadas en primavera, se hallaron recuentos microbiológicos bajos para aerobios mesófilos, siendo los resultados significativamente ( $P < 0,05$ ) menores para el sistema HLO en comparación con HT.

Con respecto a los organismos psicrófilos, el almacenamiento durante 6 días en HLO, proporcionó una inhibición de este grupo de bacterias para almeja y mejillón capturados en primavera. Sin embargo, el sistema de HLO no proporcionó ninguna ventaja con respecto al crecimiento de psicrófilos en las muestras de ostra capturadas en primavera.

El almacenamiento de las muestra de ostra en primavera proporcionó un mayor control de *Enterobacteriaceae*, con diferencias ( $P < 0,05$ ) significativas entre ambos lotes en el sexto día de almacenamiento. Para las almejas capturadas en primavera, no se observaron efectos beneficiosos de HLO en términos de recuentos de *Enterobacteriaceae*.

Comparando la variabilidad estacional de las muestras en términos de ventajas proporcionadas por HLO, este sistema resultó ser útil para el control de enterobacterias en ambas estaciones.

Finalmente, las muestras de almeja y mejillón en primavera exhibieron un control significativamente ( $P < 0,05$ ) mejor para bacterias proteolíticas después del almacenamiento en HLO. El número de bacterias proteolíticas también fue menor en las ostras procedentes del lote HLO; sin embargo, estas diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas. Al igual que en los casos de mesófilos y psicrófilos, el empleo de HLO resultó un buen control de la microbiota proteolítica en almejas y mejillones capturados en primavera.

En términos generales, la ostra fue de las tres especies de bivalvos la que mostró una mayor variabilidad estacional. Así, el sistema de HLO resultó ser especialmente útil para la conservación de ostra en otoño pero no en primavera.

### **Análisis bioquímicos**

Además de los análisis microbiológicos en las muestras de bivalvos para otoño y primavera, también se realizaron análisis comparativos de su calidad bioquímica en ambas estaciones. Así, la actividad microbiana fue determinada también químicamente mediante los valores indicados por los parámetros N-BVT y N-TMA.

El contenido en N-BVT aumentó en todas las muestras a medida que avanzó el periodo de almacenamiento, especialmente en el caso de mejillón. Se hizo patente el efecto inhibitor del crecimiento microbiano ( $P < 0,05$ ) para las tres especies de bivalvos capturadas en primavera. Concretamente en los periodos avanzados del almacenamiento, mientras en el caso de las muestras capturadas

en otoño, únicamente resultaron ser significativamente diferentes en el caso de la almeja.

Se observó un efecto inhibitor del HLO en la formación de N-TMA. Así como en el caso de N-BVT, las diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) fueron observadas principalmente en las muestras de primavera.

Durante el almacenamiento post-mortem, el músculo de bivalvo se degrada en una serie de etapas debidas a cambios bioquímicos endógenos. El nivel de nucleótidos y sus compuestos relacionados han sido utilizados como índice de frescura (evaluación del *valor K*) en músculo de pescado (Howgate, 2006). En el presente estudio, las muestras correspondientes a las tres especies de bivalvos y en ambos sistemas de refrigeración, mostraron un aumento progresivo en el valor *K* con el tiempo de conservación. Sin embargo, no se encontraron diferencias ( $P > 0,05$ ) relacionadas con el sistema de enfriamiento empleado, aunque se observaron valores *K* medios altos para todas las muestras almacenadas bajo las condiciones de HT en comparación con las muestras almacenadas bajo las condiciones HLO. Además, se observaron valores *K* altos en las muestras correspondientes a la estación de otoño al ser comparadas con las muestras capturadas en primavera. Esta diferencia fue especialmente destacable en almeja.

#### **Análisis sensorial**

Paralelamente a los análisis microbiológicos y bioquímicos, se realizaron análisis comparativos de la calidad sensorial para las tres especies de bivalvos en otoño y en primavera.

Los resultados obtenidos de la evaluación sensorial en las muestras de bivalvos en otoño, mostraron un aroma fresco y agradable y un aspecto brillante en el primer día de almacenamiento tanto en las muestras crudas como en las cocinadas. Para la almeja, a día 6, el lote HLO mostró una calidad significativamente ( $P < 0,05$ ) mejor en términos de jugosidad, sabor y apariencia comparado con la almeja almacenada en HT. A día 6, la almeja almacenada en HT presentó aroma, sabor y apariencia desagradables en comparación con la almacenada en HLO, cuya calidad resultó ser aceptable. Los análisis sensoriales de ostra y mejillón en la estación de otoño, solamente mostraron a día 4 una mayor pérdida de jugosidad en el lote HT en comparación con el lote HLO. Este último lote mantuvo una calidad aceptable en términos de aroma, sabor y apariencia. A día 6, ninguno de los lotes de las muestras de ostra y mejillón resultó ser aceptable, ya que la puntuación media estuvo por debajo de 2,0.

Los resultados obtenidos en la evaluación sensorial en primavera para la almeja, mostraron que para el lote HLO la calidad fue mejor que para su homóloga de otoño. Las diferencias entre los lotes HLO y HT de la almeja en primavera, resultaron ser mayores que en el caso de los lotes de otoño. La ostra almacenada en HLO mostró también mejor calidad a día 6 que las muestras almacenadas en HT, resultando tener las anteriores una calidad aceptable.

Al igual que en el caso de la almeja, las diferencias entre los lotes de ostra correspondientes a los sistemas HLO y HT fueron significativas ( $P < 0,05$ ) y superiores que entre los lotes de otoño. No se pudieron atribuir diferencias notables debido a la variabilidad estacional en el caso del mejillón, excepto para sabor, jugosidad y apariencia a día 6.

Estudios sensoriales previos llevados a cabo en *Mytilus edulis* (Krzyzy-Nowek & Wiggin, 1979) encontraron que el mejillón capturado en primavera retiene la aceptabilidad sensorial durante más tiempo que el capturado en otoño o invierno. Este resultado está de acuerdo con nuestros resultados microbiológicos, bioquímicos y sensoriales obtenidos para los lotes HLO. Una posible explicación de estas conclusiones puede estar relacionada, entre otras, con la menor temperatura del agua en primavera (13,5° C) comparada con la del otoño (15,0° C), así como con el débil estado fisiológico de estas especies desde el otoño hasta que el periodo de desove se haya completado. Estas razones pueden explicar la mejor calidad microbiológica y sensorial observada en las muestras correspondientes a primavera. Otros parámetros, como la disponibilidad de alimento o la proximidad en composición de las muestras, no se han evaluado en este estudio.

Finalmente, se debe enfatizar que las diferencias observadas entre los lotes HLO y HT fueron debidas a varias razones, siendo las más relevantes entre otras: (i) la rápida velocidad de enfriamiento de HL, que es una consecuencia de su gran coeficiente de transferencia de calor, (ii) la diferencia de temperatura proporcionada por el lote HLO (1,5° C menor que el lote HT), lo que confiere una diferencia cuadrática en sus vidas útiles, de manera que el lote HLO tendrá una vida útil 1,3 veces mayor que el lote HT (Dalgaard, 2009); (iii) la mayor cobertura proporcionada por los embalajes de la mezcla de HLO a las muestra de bivalvos, alcanzándose una mayor protección de las muestras con respecto a los fenómenos de oxidación y deshidratación, y (iv) el uso de la mezcla HLO como medio de rehidratación y cocinado, lo que proporciona una mayor recuperación de los parámetros sensoriales, en comparación con el lote control.

**CAPÍTULO 3:**

**Effect of a natural organic acid-icing system on the microbiological quality of commercially relevant chilled fish species.**

**Efecto de un sistema de hielo conteniendo ácidos orgánicos naturales sobre la calidad microbiológica de especies marinas refrigeradas y de relevancia comercial.**





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/lwt](http://www.elsevier.com/locate/lwt)

## Effect of a natural organic acid-icing system on the microbiological quality of commercially relevant chilled fish species

Minia Sanjuás Rey<sup>a</sup>, Bibiana García-Soto<sup>c</sup>, José R. Fuertes-Gamundi<sup>c</sup>, Santiago Aubourg<sup>b</sup>, Jorge Barros-Velázquez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences, University of Santiago de Compostela, E-27002 Lugo, Spain

<sup>b</sup> Department of Seafood Science and Technology, Institute for Marine Research (IIM-CSIC), C/Eduardo Cabello 6, E-36208 Vigo, Spain

<sup>c</sup> Cooperativa de Armadores del Puerto de Vigo (ARVI), Muelle del Berbés, Vigo, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 February 2011

Received in revised form

19 July 2011

Accepted 5 October 2011

#### Keywords:

Fish  
Storage  
Organic acids  
Icing systems  
Microbial quality  
Sensory quality

### ABSTRACT

Natural preservative organic acids (ascorbic, citric and lactic acids) were used to prepare a novel organic acid-flake icing system for the chilled preservation of hake (*Merluccius merluccius*), megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*) and angler (*Lophius piscatorius*). The icing system was prepared with two different concentrations of a commercial acid mixture-formula containing the three organic acids at 800 mg/kg and 400 mg/kg (C-800 and C-400 batches, respectively). Aerobic mesophiles, psychrotrophs, proteolytic bacteria, trimethylamine and pH were evaluated and the results compared with sensory analyses. Significantly ( $P < 0.05$ ) lower counts of mesophiles were found for hake and megrim in the C-800 and C-400 batches compared with the control batch. In the case of angler, significantly ( $P < 0.05$ ) lower counts of mesophiles, psychrotrophs and proteolytic microorganisms ( $P < 0.05$ ) were found for fish stored in the C-800 icing conditions. Both C-400 and C-800 megrim batches exhibited significantly ( $P < 0.05$ ) lower pH values than the control batch, and this result was also observed in the C-800 angler batch. Sensory analysis confirmed that the shelf lives of the three fish species in the C-800 batch were extended. According to the parameters assessed, storage of hake, megrim and angler in the proposed ice system better protects their microbial and sensory qualities.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The quality and freshness of marine species rapidly decline post-mortem due to a variety of microbial and biochemical degradation mechanisms (Pigott & Tucker, 1990; Whittle, Hardy, & Hoobs, 1990). Thus, the sensory quality and nutritional value of chilled fish deteriorate as a result of different degradative pathways, such as endogenous enzymatic activity, microbial development and lipid oxidation mechanisms (Olafsdóttir et al., 1997; Whittle et al., 1990).

To slow the mechanisms involved in quality loss, the fish specimens should be refrigerated immediately after capture. Therefore, fish have traditionally been cooled and stored in either flake ice (Nunes, Batista, & Morão de Campos, 1992), refrigerated sea water (Kraus, 1992), or ice slurries (Barros-Velázquez, Gallardo, Calo, & Aubourg, 2008; Rodríguez, Barros-Velázquez, Piñeiro, Gallardo, & Aubourg, 2006; Rodríguez, Losada, Aubourg, & Barros-Velázquez, 2004), or they have been preserved by exposure to chemical

agents (Hwang & Regenstien, 1995). However, the seafood industry is always searching for new preservation strategies to extend the shelf life of fish and provide the consumers with fish material with the best quality, both at the sensory and nutritional levels.

Natural organic acids are preservatives that have been receiving increasing attention as minimal processing strategies because they are easily attained, have a low commercial cost and can be used in food at a wide range of permitted concentrations, these having to be declared in the food labels. These organic acids are soluble in lipids in their undissociated forms, which allows them to cross the microbial membrane into the microbial cytoplasm, where the acids tend to dissociate and deliver hydrogen ions and a particular anion (Booth, 1985; Booth & Kroll, 1989). As a result, microorganisms are forced to export the excess hydrogen ion to maintain a physiological pH inside the cell, which is an energy-depleting process that limits bacterial growth. Otherwise, the excess hydrogen ions in the cytoplasm may cause the pH to decrease to levels that are incompatible with bacterial growth (Gould, 1996).

Among the natural organic acids, ascorbic acid and citric acid and their salts are well-known chelators and acidulants in biological systems, which are especially beneficial for fish oil and

\* Corresponding author. Tel.: +34 600 942264; fax: +34 981 825474.  
E-mail address: [jorge.barros@usc.es](mailto:jorge.barros@usc.es) (J. Barros-Velázquez).

emulsions (Kelleher, Silva, Hultin, & Wilhelm, 1992; Osborn-Barnes & Akoh, 2003), minced fish (Hwang & Regenstein, 1995; Stodolnik, Blasiak, & Broszedzka, 1992), fish fillets (Badii & Howell, 2002; Pourashouri, Shabanpour, Aubourg, Rohi, & Shabani, 2009) and whole fish (Aubourg, Pérez-Alonso, & Gallardo, 2004). Treatment with lactic acid has also been reported to be effective for extending the shelf lives of fish fillets (Kim, Hearnberger, & Eun, 1995; Metin, Erkan, Varlik, & Aran, 2001) and coated fish (Gogus, Bozoglu, & Yurdugul, 2006). Interestingly, the effectiveness of inhibiting the growth of Gram-negative bacteria, which are responsible of fish spoilage, has also been reported (Alakomi et al., 2000). However, when employed above certain concentrations or for relatively long exposure times, evidence of fish digestion by the organic acids has been observed, which may produce unfavourable sensory and physical properties of the fish (Kim et al., 1995; Metin et al., 2001).

This study provides a novel strategy that employs aqueous solutions of natural organic acids as biopreservatives to prepare flake ice for chilling fish specimens. We have previously demonstrated the biochemical benefits of employing an organic acid-icing system, including ascorbic acid, citric acid and lactic acid, on commercially relevant fish species in terms of lipid oxidation and hydrolysis (García-Soto, Sanxuás, Barros-Velázquez, Fuertes-Gamundi, & Aubourg, 2011). However, the microbial effects of this system have not been evaluated to date. Accordingly, this work focused on studying the effects of an organic acid-icing system on the microbial development and shelf lives of three commercially relevant fish species (hake, *Merluccius merluccius*; megrim, *Lepidorhombus whiffiagonis*; and angler, *Lophius piscatorius*) from the Grand Sole North Atlantic fishing bank during refrigerated storage.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparation of icing systems including organic acids

A commercial formula (BPS2) including an organic acid mixture was provided by the company Atlantic One S.L. (Vigo, Spain) for use in the present work. This product consisted of a water-soluble viscous liquid of ascorbic acid, citric acid and lactic acid (1 meq of each acid/120 mg product) in glycerol, which is regarded as safe (GRAS) for use in foods according to the European and American regulatory agencies (Giese, 1996; Madrid, Madrid, & Madrid, 1994).

Preliminary trials were performed to optimise the most convenient product concentrations for the icing system in terms of sensory quality. Thus, the effects of a wide range (70–2000 mg/kg) of aqueous concentrations of the organic acid mixture on the sensory qualities of fish specimens were initially tested. From this analysis, it was concluded that 800 mg/kg and 400 mg/kg provided the most convenient results (data not shown). Therefore, both concentrations were selected and employed in this study as the C-800 and C-400 batches, respectively. The organic acid-icing

mixture was prepared as flake ice with water containing the desired concentrations of organic acids in an Icematic F100 Compact device (Castelmac Spa, Castelfranco, Italy). Both batches were compared to fish kept in traditional ice prepared from water (C-0 batch). The pH values of the flake ice systems considered were 7.22, 3.96 and 3.62 for the C-0, C-400 and C-800 batches, respectively.

### 2.2. Fish material, processing and sampling

Specimens of hake (*Merluccius merluccius*; 96 individuals), megrim (*L. whiffiagonis*; 78 individuals) and angler (*L. piscatorius*; 78 individuals) were caught near the Galician Atlantic coast (North-Western Spain) in autumn of 2009 and kept in ice on-board. Upon arrival to the laboratory, the specimens of each species were analysed by triplicate on day one. The remaining specimens were divided into three batches and stored in different types of ice (C-800, C-400 and C-0 conditions) at a 1:1 fish-to-ice ratio. All batches were placed in a refrigerated room (4 °C). The storage boxes employed allowed draining, and ice was renewed when required. Fish samples from different batches were collected for analysis on days one, five, eight and 12; day 15 only was considered for hake. On day zero, six individuals of each fish species were analysed as initial samples (three groups of two individuals). For each fish species and icing condition, three different groups were analysed separately to achieve statistically significant results ( $n = 3$ ).

### 2.3. Microbiological analyses

Samples of 10 g of fish muscle were dissected aseptically from chilled fish specimens, mixed with 90 ml of peptone water (0.1 g/100 g in water) (Merck, Darmstadt, Germany), and homogenised in a stomacher (AES, Combourg, France) as previously described (Ben-Gigirey, Vieites Baptista de Sousa, Villa, & Barros-Velázquez, 1998; Ben-Gigirey, Vieites Baptista de Sousa, Villa, & Barros-Velázquez, 1999). In all cases, serial dilutions from the microbial extracts were prepared in peptone water. Total aerobes were investigated by surface inoculation into plate count agar (PCA, Oxoid Ltd., London, UK) after incubation at 30 °C for 48 h. Psychrotrophs were also investigated in PCA, but incubation was carried out at 7–8 °C for seven days. Microorganisms exhibiting a proteolytic phenotype were investigated in casein-agar medium after incubation at 30 °C for 48 h, as previously described (Ben-Gigirey, Vieites Baptista de Sousa, Villa, & Barros-Velázquez, 2000).

### 2.4. TMA-N analysis

Trimethylamine-nitrogen (TMA-N) values were determined by the picrate method as previously described (Tozawa, Erokibara, & Amano, 1971). This technique involves the preparation of a 5 g/

**Table 1**  
Scale employed for evaluating the sensory quality of fish batches.

Attribute	Highest quality (E)	Good quality (A)	Fair quality (B)	Unacceptable quality (C)
Skin	Very intense pigmentation; transparent mucus	Milky mucus; insignificant pigmentation losses	Slightly greyish mucus; pigmentation without shine	Widely opaque mucus; important pigmentation losses
External odour	Sharply seaweedy and shellfish	Weakly seaweedy and shellfish	Incipiently sour and rancid	Sour and rancid
Gills	Brightly red; without odour; lamina perfectly separated	Rose coloured; without odour; lamina adhered in groups	Slightly pale; incipient fishy odour; lamina adhered in groups	Grey-yellowish colour; intense ammonia odour; lamina totally adhered
Consistency	Presence or partial disappearance of rigor mortis symptoms	Firm and elastic; pressure signs disappear immediately and completely	Presence of mechanical signs; elasticity notably reduced	Important shape changes due to mechanical factors
Flesh odour	Sharply seaweedy and shellfish	Weakly seaweedy and shellfish	Incipiently sour and rancid	Sour and rancid

100 g trichloroacetic acid extract of fish muscle (10 g/25 ml). The results were expressed as mg TMA-N/100 g muscle.

### 2.5. Assessment of pH value

The evolution of pH in hake, megrim and angler during the storage time was determined by means of a pH-meter fitted with a 6-mm diameter insertion electrode (Crison, Barcelona, Spain). The pH level was measured through penetration of the electrode into the fish samples.

### 2.6. Sensory analysis

The sensory analysis was conducted by a sensory panel of five experienced judges, three male and two female with an age in the 25–50 yr range, according to the guidelines concerning fresh and refrigerated fish compiled in Table 1 (Council Regulation, 1990). The panellists had been involved in sensory analysis of different kinds of fish and seafood products for the last ten years. Before the present experiment, a special training was administered on chilled hake, megrim and angler. Such training consisted in the evaluation of refrigerated specimens belonging to the three species and exhibiting different initial qualities. Special attention was paid to the evolution of the different sensory parameters for each species from the initial state until the sensory attributes were not acceptable.

Four categories were used to rank the samples: highest quality (E), good quality (A), fair quality (B) and unacceptable quality (C). Sensory assessment of the fish included the following parameters: gills (odour, colour and mucus development), eyes, external odour (development of putrid and other off-odour), muscle odour (raw and cooked fish; development of putrid and other off-odour) and taste (cooked fish; development of putrid and other off-taste). At each sampling time, whole fish specimens were presented to the panellists in individual trays, which were scored individually.

### 2.7. Statistical analyses

Bacterial counts were transformed into log CFU/g before undergoing statistical analysis. Data corresponding to the three icing batches were subjected to one-way analysis of variance to assess significant ( $P < 0.05$ ) differences between batches. The PASW Statistics 18 software for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used to explore the statistical significance of the results, including multivariate contrasts and multiple comparisons by Tukey test. A confidence interval at the 95% level was used in all cases.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Microbiological analyses

The comparative evolution of aerobic mesophiles during storage for the three fish species can be seen in Figs. 1–3. Statistically significantly ( $P < 0.05$ ) lower mesophile counts were found for hake (Fig. 1) and megrim (Fig. 2) stored in the C-800 and C-400 systems compared with the C-0 control batches. On the other hand, the angler (Fig. 3A) C-800 batch exhibited statistically significantly ( $P < 0.05$ ) lower mesophiles counts than the C-400 and C-0 batches, and there were no statistically significant differences between two latter batches. The aerobic mesophile numbers for hake and megrim C-800 and C-400 batches were below 7 log CFU/g and for angler was below 6 log CFU/g at the end of storage. These values obtained for the fish specimens stored in the proposed organic icing system were below those generally considered necessary to

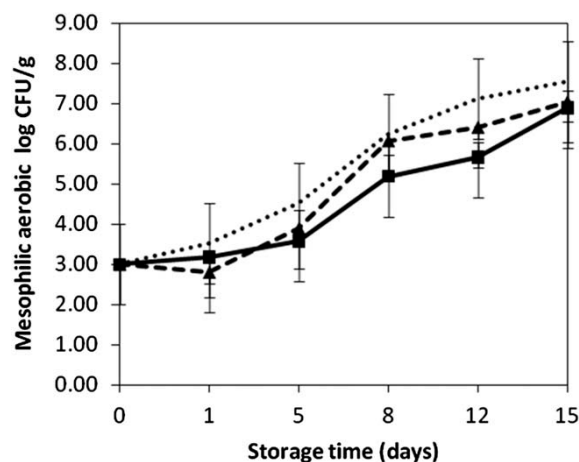


Fig. 1. Evolution of mesophilic aerobes in hake muscle (*Merluccius merluccius*) for chilled fish specimens stored under C-0 (.....: control), C-400 (▲: 400 mg/kg organic acids) and C-800 (■: 800 mg/kg of organic acids) conditions. All analyses were done by triplicate.

induce fish spoilage (Gram & Huss, 1996). In contrast, the mesophile counts were as high as 7.15 log CFU/g and 7.26 log CFU/g for the hake and megrim C-0 batches, respectively.

Our results agreed well with other authors that reported the effectiveness of organic acids for inhibition of aerobic bacteria evolution in spiny dogfish (*Squalus acanthias*) (Sengoer, Mol, & Uecok, 2007). In addition, other authors found that fish products treated with ellagic acid in combination with ascorbic acid and sodium ascorbate exhibited a significant delay in the proliferation of aerobic mesophiles (Zambuchini, Fiorini, Verdenelli, Orpianesi, & Ballini, 2008).

With respect to the psychrotrophs, statistically significantly ( $P < 0.05$ ) lower counts were determined for angler (Fig. 3B) stored in the C-800 system compared with the C-400 and C-0 batches. Nevertheless, the psychrotroph counts on the last day of storage (12 days) were lower than 7 log CFU/g for any of the batches tested. These results also agree with a previous study in which other fish

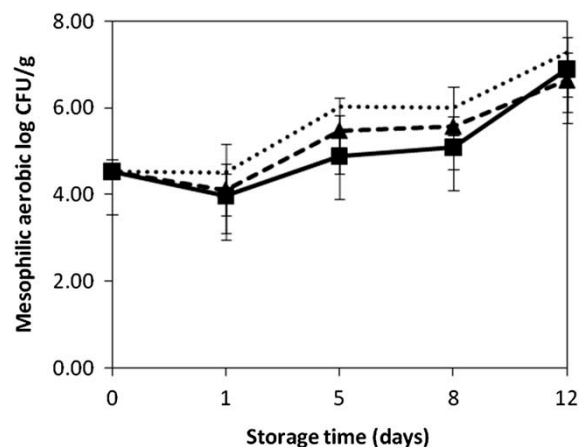
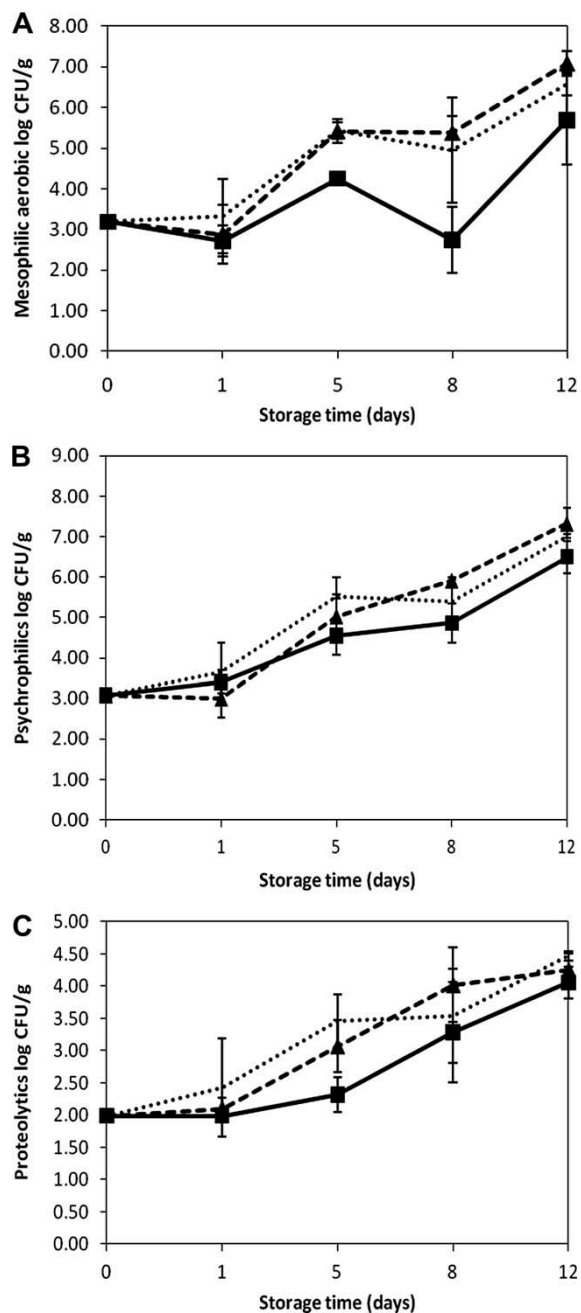


Fig. 2. Evolution of mesophilic aerobes in the muscle of chilled megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*) specimens stored under C-0 (.....: control), C-400 (▲: 400 mg/kg organic acids) and C-800 (■: 800 mg/kg of organic acids) conditions. All analyses were done by triplicate.



**Fig. 3.** Evolution of mesophilic aerobes (A), psychrotrophs (B) and proteolytic bacteria (C) in the muscle of chilled angler (*Lophius piscatorius*) specimens stored under C-0 (·····: control), C-400 (▲: 400 mg/kg organic acids) and C-800 (■: 800 mg/kg of organic acids) conditions. All analyses were done by triplicate.

species, such as spiny dogfish, were treated with salts, ascorbic acid and citrate (Sengoer et al., 2007; Yang, Jhaveri, & Constantinides, 1981). No significant differences for psychrotrophs were found for megrim or hake.

Finally, the counts of proteolytic microorganisms were also significantly ( $P < 0.05$ ) lower in the angler C-800 batch than in the other two batches (Fig. 3C). The role of proteolytic microorganisms in the degradation of fish muscle has been highlighted (Rodríguez,

Barros-Velázquez, Ojea, Pineiro, & Aubourg, 2003). Accordingly, the partial inhibition of this microbial group by the organic acids tested in this study is another remarkable result in terms of fish quality. As in the case of the psychrotrophs, no significant differences for proteolytic microorganisms were found in megrim or hake.

According to the results of the microbial analysis, the presence of organic acids in the icing system significantly slowed down the growth of certain microbes in fish muscles; this result was especially relevant for angler, and to a lesser extent, for hake and megrim. Other studies of flow ice systems prepared from marine water indicated that when the ice melts, the salt solution may exert a washing effect of the fish surface, which reduces the surface microbial load and thus limits microbial diffusion into the muscle through the skin (Campos, Rodríguez, Losada, Aubourg, & Barros-Velázquez, 2005; Rodríguez, Barros-Velázquez, Piñeiro, Gallardo & Aubourg, 2006; Rodríguez et al., 2004). Likewise, in this study, melting of the ice flakes prepared with organic acids may exert a similar washing effect, which also prevents the formation of surface microbial biofilms that may induce fish spoilage. No significant inhibitory effect of glycerol, the solvent of the organic acid mixture evaluated, on microbial growth can be argued, since the glycerol concentration in the ice mixture was 0.22 g/100 g, this being quite below the concentration of 5 g/100 g considered as necessary for exerting significant microbial inhibition (Roger, Fonty, Andre, & Gouet, 1992).

### 3.2. TMA-N evolution

The evolution of TMA-N in fish muscles during refrigerated storage is presented in Table 2. In the case of hake, the C-800 batch exhibited lower levels of TMA-N formation throughout storage compared with the other two batches, which indicates that the combination of organic acids at this proportion is beneficial for decreasing the production of these amines by microbes. In the case of megrim, the inclusion of organic acids in the icing system did not produce any significant improvement in terms of TMA-N formation. Finally, for the angler, the incorporation of citric acid, ascorbic acid and lactic acid in the C-800 batch provided significant protection against TMA-N formation compared with the C-0 batch at all sampling times. Moreover, the effect of the C-400 batch, which included intermediate concentrations of the natural organic acids, was also favourable compared with the C-0 batch.

### 3.3. pH analyses

Increases in the pH of the fish muscle indicate the accumulation of alkaline compounds, such as ammonia compounds and TMA, which are principally derived from microbes (Hebard, Flick, & Martin, 1982). In this sense, it has been suggested that pH values above 7 may limit the shelf lives of certain fish species (Moral, 1987; Ruíz Capillas & Moral, 2001).

In our study, no significant effects of the organic acids on pH evolution of hake muscle were observed. With respect to the muscles of megrim stored in the C-800 and C-400 systems, the pH values were significantly ( $P < 0.05$ ) lower compared with the C-0 control batch (Fig. 4A). Thus, the pH differences at the end of the storage period were more than 0.50 pH units, which indicates that the incorporation of natural preservatives to the icing system, at either of the two concentrations tested, significantly reduced the microbial and endogenous alkalising mechanisms that may limit fish shelf life. Likewise, in the case of angler stored in the C-800 icing system, the pH value of the muscle was significantly ( $P < 0.05$ ) lower compared with the C-400 and C-0 control batches (Fig. 3D).

These results agree with other studies that reported better pH value maintenance in catfish fillets treated with lactic acid (Kim

**Table 2**  
Trimethylamine (TMA) assessment (mg TMA-N/100 g muscle)<sup>a</sup> in fish kept in different kinds of ice.<sup>b</sup>

Chilling time (days)	Hake			Megrim			Angler		
	C-0	C-400	C-800	C-0	C-400	C-800	C-0	C-400	C-800
1	0.17 (0.05)	0.10 (0.03)	0.15 (0.03)	2.60 (0.35)	2.16 (0.20)	1.62 (0.77)	2.62 b (1.48)	1.08 b (0.57)	0.22 a (0.18)
5	1.00 b (0.49)	0.81 ab (0.19)	0.29 a (0.06)	5.89 (0.21)	5.98 (2.97)	7.48 (2.51)	4.80 (1.57)	6.15 (2.18)	2.72 (2.43)
8	6.18 b (2.46)	3.76 ab (1.17)	1.99 a (0.36)	12.07 (3.85)	10.42 (3.97)	13.70 (0.93)	9.83 c (1.37)	7.25 b (0.91)	5.24 a (1.84)
12	11.12 b (1.50)	11.98 b (1.30)	8.26 a (1.09)	15.66 ab (4.19)	12.04 a (3.79)	18.19 b (1.61)	11.76 b (1.95)	8.48 ab (1.27)	7.58 a (1.73)
15	17.12 b (2.18)	16.79 b (1.56)	12.84 a (1.04)						

Initial TMA values: 0.11 ± 0.02 (hake), 1.43 ± 0.61 (megrim) and 1.87 ± 1.56 (angler).

All analyses were done by triplicate.

<sup>a</sup> Mean values (n = 3) are indicated; standard deviations are expressed in parentheses.

<sup>b</sup> Ice conditions: C-0, C-400 and C-800 represent the control and the batches containing 400 mg/kg and 800 mg/kg of organic acids, respectively.

et al., 1995) and in sole specimens treated with ellagic acid, ascorbic acid and sodium ascorbate (Zambuchini et al., 2008). However, and similar to previous analyses, our study includes a novel mixture of organic acids that has not been tested before for fish preservation purposes.

### 3.4. Sensory analyses

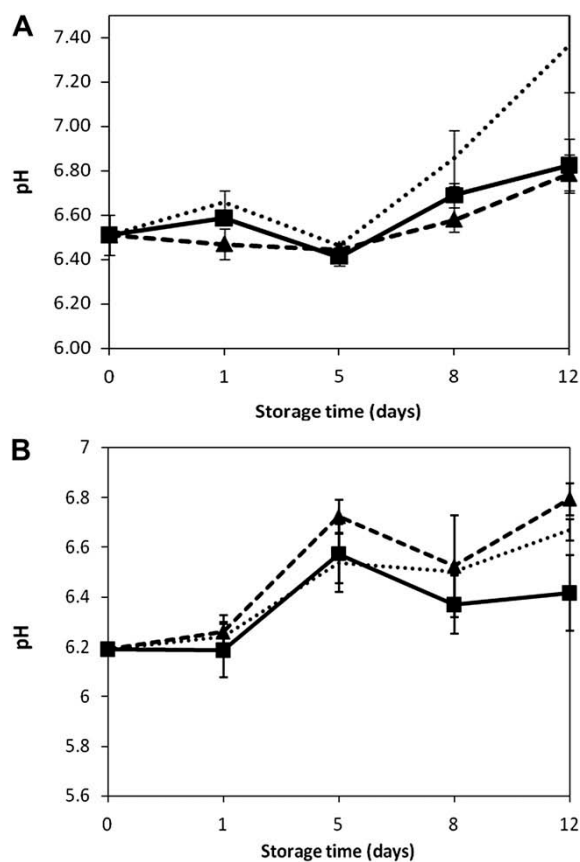
The results of the sensory evaluation of the three species tested with the different icing systems are presented in Table 3. Initial specimens of hake exhibited the highest quality (E) while angler and megrim specimens were one degree under, exhibiting A

quality, according to the examination of gills and external odour. These differences found inland are frequent since not all species are caught at the same time by the ships operating in the Grand Sole fishing bank during 15 days. In the case of hake, the C-800 batch, which incorporated the highest concentration of organic acids, showed the best behaviour and retained an acceptable quality even after 12 days of storage; however, this result was not observed for the other two batches. For hake, storage in the C-800 organic acid-icing system provided better preservation of all sensory quality parameters, especially muscle odour and taste.

In the case of megrim, similar results were obtained. Thus, only the C-800 batch retained acceptable quality after eight days of storage, as compared with the other two icing batches. As was the case for hake, muscle odour and taste was the sensory parameters for which the C-800 organic acids-icing system provided the best results.

Finally, angler specimens exhibited a better behaviour in all batches compared with hake and megrim. However, the C-800 batch maintained very good sensory quality up until day eight, and the other batches were also considered to be acceptable at that time. Moreover, the angler specimens stored in the C-800 organic acid-icing system were acceptable on day 12, which was not observed for the other two batches.

The shelf lives of angler specimens in the icing systems considered in this work were longer as compared with hake and megrim. This result correlates well with TMA-N formation, which



**Fig. 4.** Changes in the muscle pH of chilled megrim (A) and angler (B) specimens stored under C-0 (control), C-400 (400 mg/kg organic acids) and C-800 (800 mg/kg of organic acids) conditions. All analyses were done by triplicate.

**Table 3**  
Sensory acceptance<sup>a</sup> of hake stored under different icing conditions.<sup>b</sup>

Attribute	Icing system	Chilling time (days)												
		Hake				Megrim				Angler				
		5	8	12	15	1	5	8	12	1	5	8	12	
Gills	C-0	B	B	C	C	A	B	C	C	A	B	B	B	B
	C-400	A	B	B	C	A	A	B	C	A	A	B	B	B
	C-800	A	B	B	C	A	A	B	C	A	A	A	B	B
Eyes	C-0	A	B	C	C	A	A	B	B	A	A	A	B	B
	C-400	A	B	B	C	A	A	B	B	A	A	A	B	B
	C-800	A	B	B	C	A	A	B	B	A	A	A	B	B
External odour	C-0	A	B	C	C	A	B	B	C	A	A	B	C	C
	C-400	A	B	B	C	A	B	B	C	A	A	B	C	C
	C-800	A	B	B	C	A	B	B	C	A	A	A	B	C
Muscle odour and taste	C-0	A	B	C	C	A	B	C	C	A	B	B	C	C
	C-400	A	B	C	C	A	A	C	C	A	B	B	C	C
	C-800	A	A	B	C	A	A	B	C	A	A	A	B	C

All analyses were done by triplicate.

<sup>a</sup> Initial specimens were category E for all attributes considered. Fish on day one were category A for all attributes considered. E: excellent quality; A: good quality; B: fair quality and C: unacceptable quality.

<sup>b</sup> Ice conditions: C-0, C-400 and C-800 represent the control and the batches containing 400 mg/kg and 800 mg/kg of organic acids, respectively.

was more limited in angler as compared to hake and megrim, and with the more limited pH increase determined in angler muscle. These results clearly indicate a more limited impact of alkalising mechanisms in angler, this leading to a more limited formation of ammonia compounds that negatively affect the sensory quality and shelf life of fish (Rodríguez, Barros-Velázquez, Ojea, Pineiro, & Aubourg, 2003). These results are also in agreement with previous studies which highlighted the considerable resistance of angler specimens to microbiological and biochemical breakdown during refrigerated storage under flake ice or slurry ice (Barros-Velázquez et al., 2008). Moreover, the bigger size of angler specimens as compared with hake and megrim, may be argued as another reason for this comparative shelf life extension, as it has been previously reported (Losada, Piñeiro, Barros-Velázquez, & Aubourg, 2004).

In general and according to these results, no significant beneficial effect of the C-400 organic acids-icing system was found on fish quality and shelf life compared to the control fish. In contrast, the incorporation of ascorbic acid, citric acid and lactic acid at the concentrations in the C-800 batch resulted in better maintenance of the quality and extension of the shelf life compared with the other two batches. This result agrees with the microbiological numbers determined in this study, which showed a significant slowing of microbial growth for hake, megrim and especially angler with the combination of the organic acids in the C-800 batch.

In our study, the fish specimens stored in flake ice were placed in an isothermal room at 4 °C. The combined effect of refrigeration and organic acids resulted to have beneficial effects in terms of microbiological and sensory quality in all three species tested. Moreover, the advantages of slurry ice as a rapid pre-treatment to reduce the fish temperature to temperatures slightly below 0 °C prior to its storage in flake ice have been previously reported (Piñeiro et al., 2005). In this sense, the flake ice system including organic acids proposed in this study might provide additional advantages if combined with a previous slurry ice treatment to chill fish specimens to temperatures slightly below 0 °C.

#### 4. Conclusions

The proposed C-800 organic acid-icing system evaluated in this work, which contained ascorbic acid, citric acid and lactic acid, proved to be an effective mixture for fish preservation due to its antimicrobial effect. The microbial and sensory results obtained in this study allowed us to conclude that this novel icing system slowed microbial growth in hake, megrim and especially angler; these results agree with a significant extension of the fish shelf life. These results may be of practical interest for improving the preservation of fish quality not only on land but also for on-board strategies. Based on the results presented in this work, a strategy for the on-board application of the C-800 organic acid-icing system is currently being applied to these and other commercially relevant fish species from the Grand Sole Bank. Moreover, this study provides a way to optimise the concentrations of ascorbic acid, citric acid and lactic acid for fish preservation purposes. This process is currently under development in our laboratories, and the potential synergistic effects among the organic acids and the diffusion of organic acids from the icing medium to the fish muscle after melting are being considered.

#### Acknowledgements

The authors thank the owner and crew of the CACHACHO and CHANS ships for their participation in the present study, and the Vigo harbour fishing fleet in general for kindly providing us with the three fish species. The authors also thank Mr. Rodrigo García

Castro for his technical assistance and Atlantic One S.L. (Vigo, Spain) for providing the commercial organic acid mixture BPS2. Mrs. Gabriela Medina is widely acknowledged for her valuable preliminary studies of applying the BPS2 product to fish. This work was supported by the Secretaría Xeral de I+D from the Xunta de Galicia (Galicia, Spain) through the Research Project PGIDIT 08TAL038E.

#### References

- Alakomi, H. L., Skytta, E., Saarela, M., Mattilda-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2001–2005.
- Aubourg, S., Pérez-Alonso, F., & Gallardo, J. (2004). Studies on rancidity inhibition in frozen horse mackerel (*Trachurus trachurus*) by citric and ascorbic acids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106, 232–240.
- Badii, F., & Howell, N. (2002). Effect of antioxidants, citrate, and cryoprotectants on protein denaturation and texture of frozen cod (*Gadus morhua*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2053–2061.
- Barros-Velázquez, J., Gallardo, J. M., Calo, P., & Aubourg, S. P. (2008). Enhanced quality and safety during on-board chilled storage of fish species captured in the Grand Sole North Atlantic fishing bank. *Food Chemistry*, 106, 493–500.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J., Villa, T., & Barros-Velázquez, J. (1998). Changes in biogenic amines and microbiological analyses in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *Journal of Food Protection*, 61, 608–615.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J., Villa, T., & Barros-Velázquez, J. (1999). Histamine and cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen Albacore (*Thunnus alalunga*). *Journal of Food Protection*, 62, 933–939.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J., Villa, T., & Barros-Velázquez, J. (2000). Characterization of biogenic amine-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from white muscle of fresh and frozen albacore tuna. *International Journal of Food Microbiology*, 57, 19–31.
- Booth, I. R. (1985). Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological Reviews*, 49, 359–378.
- Booth, I. R., & Kroll, R. G. (1989). The preservation of foods by low pH. In G. W. Gould (Ed.), *Mechanism of action of food preservation procedures* (pp. 119–160). London: Elsevier Applied Science.
- Campos, C., Rodríguez, O., Losada, V., Aubourg, S., & Barros-Velázquez, J. (2005). Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*Sardina pilchardus*). *International Journal of Food Microbiology*, 103, 121–130.
- Council Regulation: Off. J. Eur. Comm. (19 February) 1990, No C84, p. 69.
- García-Soto, B., Sanxuás, M., Barros-Velázquez, J., Fuertes-Gamundi, J., & Aubourg, S. (2011). Preservative effect of an organic acid-icing system on chilled fish lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113, 487–496.
- Giese, J. (1996). Antioxidants: tools for preventing lipid oxidation. *Food Technology*, 50, 73–80.
- Gogus, U., Bozoglu, F., & Yurdugul, S. (2006). Comparative effects of lactic acid, nisin, coating combined and alone applications on some postmortem quality criteria of refrigerated *Sardina pilchardus*. *Journal of Food Quality*, 29, 658–671.
- Gould, G. W. (1996). Methods for preservation and extension of shelf life. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 51–64.
- Gram, L., & Huss, H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 121–137.
- Hebard, C. E., Flick, G. J., & Martin, R. E. (1982). Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shellfish. In R. E. Martin, G. J. Flick, C. E. Hebard, & D. R. Ward (Eds.), *Chemistry and biochemistry of marine food products* (pp. 149–304). Westport CT: Avi Publishing.
- Hwang, K., & Regenstein, J. (1995). Hydrolysis and oxidation of mackerel (*Scomber scombrus*) mince lipids with NaOCl and NaF treatments. *Journal of Aquatic Food Production and Technology*, 4, 19–30.
- Kelleher, S., Silva, L., Hultin, H., & Wilhelm, K. (1992). Inhibition of lipid oxidation during processing of washed, minced Atlantic mackerel. *Journal of Food Science*, 57, 1103–1108.
- Kim, C., Hearnberger, J., & Eun, J. (1995). Gram-negative bacteria in refrigerated catfish fillets treated with lactic culture and lactic acid. *Journal of Food Protection*, 58, 639–643.
- Kraus, L. (1992). Refrigerated sea water treatment of herring and mackerel for human consumption. In J. Burt, R. Hardy, & K. Whittle (Eds.), *Pelagic fish. The resource and its exploitation* (pp. 73–81). Aberdeen, Scotland, UK: Fishing News Books.
- Losada, V., Piñeiro, C., Barros-Velázquez, J., & Aubourg, S. (2004). Effect of slurry ice on chemical changes related to quality loss during European hake (*Merluccius merluccius*) chilled storage. *European Food Research and Technology*, 219, 27–31.
- Madrid, A., Madrid, J., & Madrid, R. (1994). Chilling, freezing and ultra-freezing of fish and derivatives. Madrid, Spain: A. Madrid Vicente, Ediciones y Tecnología of fish and its derivatives (pp. 273–276). Mundi-Prensa Libros, S. A.
- Metin, S., Erkan, N., Varlik, C., & Aran, N. (2001). Extension of shelf life of chub mackerel (*Scomber japonicus* Houttuyn 1780) treated with lactic acid. *European Food Research and Technology*, 213, 174–177.
- Moral, A. (1987). Métodos físico-químicos de control de calidad de pescados. *Alimentación, Equipos Y Tecnología*, 5–6, 115–122.

- Nunes, M., Batista, I., & Morão de Campos, R. (1992). Physical, chemical and sensory analysis of sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59, 37–43.
- Olafsdóttir, G., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., et al. (1997). Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science & Technology*, 8, 258–265.
- Osborn-Barnes, H., & Akoh, C. (2003). Copper-catalyzed oxidation of a structured lipid-based emulsion containing  $\alpha$ -tocopherol and citric acid: influence of pH and NaCl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6851–6855.
- Pigott, G., & Tucker, B. (1990). Science opens new horizons for marine lipids in human nutrition. *Food Reviews International*, 3, 105–138.
- Piñeiro, C., Bautista, R., Rodríguez, O., Losada, V., Barros-Velázquez, J., & Aubourg, S. P. (2005). Quality retention during the chilled distribution of farmed turbot (*Psetta maxima*): effect of a primary slurry ice treatment. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 817–824.
- Pourashouri, P., Shabanpour, B., Aubourg, S., Rohi, J., & Shabani, A. (2009). An investigation of rancidity inhibition during frozen storage of Wels catfish (*Silurus glanis*) fillets by previous ascorbic and citric acid treatment. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1503–1509.
- Rodríguez, O., Barros-Velázquez, J., Ojea, A., Piñeiro, C., & Aubourg, S. P. (2003). Evaluation of sensory and microbiological changes and identification of proteolytic bacteria during the iced storage of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Journal of Food Science*, 68, 2764–2771.
- Rodríguez, O., Losada, V., Aubourg, S. P., & Barros-Velázquez, J. (2004). Enhanced shelf-life of chilled European hake (*Merluccius merluccius*) stored in slurry ice as determined by sensory analysis and assessment of microbiological activity. *Food Research International*, 37, 749–757.
- Rodríguez, O., Barros-Velázquez, J., Piñeiro, C., Gallardo, J. M., & Aubourg, S. P. (2006). Effects of storage in slurry ice on the microbial, chemical and sensory quality and on the shelf life of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Food Chemistry*, 95, 270–278.
- Roger, V., Fonty, G., Andre, C., & Gouet, P. (1992). Effects of glycerol on the growth, adhesion, and cellulolytic activity of rumen cellulolytic bacteria and anaerobic fungi. *Current Microbiology*, 25, 197–201.
- Ruiz Capillas, C., & Moral, A. (2001). Correlation between biochemical and sensory quality indices in hake stored in ice. *Food Research International*, 34, 441–447.
- Sengoer, G. F., Mol, S., & Uecok, D. (2007). The effect of ascorbic acid, citric acid and salt on the quality of spiny dogfish (*squalus acanthias*) fillet. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 16, 103–113.
- Stodolnik, L., Blasiak, E., & Broszedzka, H. (1992). Effect of Tween 80, citric acid and acetylsalicylic acids on changes in muscle tissue lipids of Baltic herrings during storage. *Chłodnictwo*, 27, 29–35.
- Tozawa, H., Erokibara, K., & Amano, K. (1971). Proposed modification of Dyer's method for trimethylamine determination in codfish. In R. Kreuzer (Ed.), *Fish inspection and quality control* (pp. 187–190). London: Fishing News Books Ltd.
- Whittle, K., Hardy, R., & Hoobs, G. (1990). Chilled fish and fishery products. In T. Gormeley (Ed.), *Chilled foods. The state of the art* (pp. 87–116). New York (USA): Elsevier Applied Science.
- Yang, C. T., Jhaveri, S. N., & Constantinides, S. M. (1981). Preservation of grayfish (*squalus-acanthias*) by salting. *Journal of Food Science*, 46, 1646–1649.
- Zambuchini, B., Fiorini, D., Verdenelli, M. C., Orpianesi, C., & Ballini, R. (2008). Inhibition of microbiological activity during sole (*solea solea L.*) chilled storage by applying ellagic and ascorbic acids. *LWT - Food Science and Technology*, 41(9), 1733–1738.



### **CAPÍTULO 3: Efecto de un sistema de hielo conteniendo ácidos orgánicos naturales sobre la calidad microbiológica de especies marinas refrigeradas y de relevancia comercial.**

El objetivo principal de esta fase del trabajo consistió en el estudio de la aplicación de un nuevo sistema de enfriamiento consistente en hielo en escamas preparado a partir de una disolución de ácidos orgánicos naturales. En este capítulo se investigó la influencia de una solución comercial, BPS2, elaborada a base de ácido ascórbico (AA), ácido láctico (AL) y ácido cítrico (AC) y se definieron las concentraciones adecuadas de este producto con el objeto de inhibir las distintas vías de alteración que afectan a la calidad del pescado fresco procedente del Caladero del Gran Sol. En este caso las especies escogidas fueron: merluza (*Merluccius merluccius*), gallo (*Lepidorhombus whiffiagonis*) y rape (*Lophius piscatorius*).

#### **Análisis microbiológico**

En lo que respecta al deterioro microbiológico, se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para la microbiota aerobia mesófila durante el periodo de almacenamiento en las tres especies estudiadas. Los recuentos encontrados para merluza y gallo almacenados en los sistemas con concentraciones 800mg/kg (lote C- 800) y 400 mg/kg (lote C-400) fueron menores que los encontrados en el lote control C-0. Por otro lado, el lote C-800 de rape, exhibió recuentos de aerobios mesófilos significativamente menores ( $P < 0,05$ ) que para los lotes C-400 y C-0, sin diferencias significativas entre los dos últimos lotes.

Al final de almacenamiento, los lotes C-800 y C-400 de merluza y gallo, exhibieron recuentos de microbiota aerobia mesófila menores a 7 log UFC/g y en el caso de rape, los recuentos fueron menores de 6 log UFC/g.

Los resultados obtenidos para estas especies en el sistema de hielo propuesto son menores que las consideradas necesarias para producir el deterioro del pescado (Gram & Huss, 1996). En contraste, los recuentos de aerobios mesófilos en los lotes control de merluza y gallo fueron 7,15 log UFC/g y 7,26 log UFC/g, respectivamente.

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores acerca de la actividad inhibidora de los ácidos orgánicos sobre la evolución de bacterias aerobias en mielga (*Squalus acanthias*) (Sengoer y col., 2007). Además, otros autores han encontrado que productos marinos tratados con ácido elálgico en combinación con ácido ascórbico y ascorbato de sodio, mostraron una ralentización en la proliferación de aerobios mesófilos (Zambuchini y col., 2008).

Respecto a los microorganismos psicrófilos, se han determinado recuentos significativamente menores ( $P < 0,05$ ) en el rape almacenado en el sistema C-800 en comparación con los lotes C-400 y C-0. No obstante, los recuentos de psicrófilos en el último día de almacenamiento estuvieron por debajo de 7 log UFC/g en todos los lotes analizados. Este resultado concuerda con estudios previos para otras especies marinas, como mielga, tratada con ácido ascórbico y sales como citrato (Sengoer y col., 2007; Yang y col., 1981).

En el caso de merluza y gallo, no se encontraron diferencias significativas en el recuento de microorganismos psicrófilos.

Para finalizar, los recuentos de microorganismos proteolíticos en el rape fueron significativamente menores ( $P < 0,05$ ) para el lote C-800 en comparación con los otros dos lotes. Se ha destacado el papel que desempeñan los organismos proteolíticos en la degradación del músculo de pescado (Rodríguez y col., 2003). En consecuencia, la inhibición parcial de este grupo microbiano, debida a la presencia de ácidos orgánicos, es un resultado notable en términos de la calidad del pescado. En el caso de merluza y gallo, no se han encontrado diferencias significativas en la evolución de microorganismos proteolíticos.

Según los resultados obtenidos de los análisis microbiológicos, la presencia de ácidos en el sistema de hielo, retardó el crecimiento de ciertos microorganismos en el músculo del pescado. Estos resultados fueron especialmente relevantes en el caso de rape, y en menor medida en el caso de merluza y gallo. Estudios previos que aplicaron el sistema de hielo líquido preparado con agua de mar indican que cuando el hielo se funde, el agua de fusión ejerce un efecto de lavado superficial, lo que reduce la carga microbiana superficial y por tanto se limita la difusión de microorganismos hacia el músculo a través de la piel (Campos, y col., 2005; Rodríguez, y col., 2006; Rodríguez y col., 2004).

En este estudio, la fusión del hielo en escamas, preparado con ácidos orgánicos, pudo ejercer un efecto de lavado similar, lo que previno de la formación de biopelículas microbianas causantes de la degradación del pescado

No se puede discutir el efecto inhibitor del glicerol, solvente de la mezcla de ácidos orgánicos, ya que la concentración en el hielo fue de 0,22 g/100 g. Esta concentración resultó mucho más baja en comparación con los 5 g/100 g, que es

la considerada necesaria para ejercer una inhibición microbiológica significativa (Roger y col., 1992).

#### **Análisis bioquímico**

La formación de N-TMA en músculo de merluza refrigerada en el lote C-800, mostró valores menores a lo largo del almacenamiento en comparación con los otros dos lotes. Esto indica que la combinación de ácidos en esta proporción es beneficiosa en la ralentización de la microbiota productora de aminas volátiles. En el caso del gallo, el hecho de incluir ácidos orgánicos en el sistema de hielo no produjo ningún aumento significativo en términos de formación de N-TMA. Por último, en el caso del rape, la incorporación de ácidos cítrico, ascórbico y láctico en el lote C-800, ejerció un efecto protector frente a la formación de N-TMA en comparación con el lote C-0 para todos los tiempos de muestreo. Por otra parte, el efecto del lote C-400, que incluyó concentraciones intermedias de los ácidos orgánicos naturales, también fue favorable en comparación con el lote C-0.

El incremento de pH en el músculo de pescado indica la acumulación de compuestos alcalinos, principalmente amoníaco y TMA, que son los derivados principales de la actividad microbiana (Hebard, y col., 1982). En este sentido, se ha sugerido que valores superiores a 7 pueden limitar la vida útil de ciertas especies de pescado (Moral, 1987; Ruiz Capillas & Moral, 2001). En nuestro estudio, la evolución del pH en el músculo de merluza no resultó ser significativo por la presencia de ácidos.

Con respecto a gallo almacenado en los sistemas C-800 y C-400, los valores de pH en el músculo resultaron ser significativamente ( $P < 0,05$ ) menores en comparación con el lote control. Así, al final del periodo de almacenamiento, las

diferencias en los valores de pH fueron mayores de 0,50 unidades, lo que indica que la incorporación de los ácidos en el sistema de hielo, en cualquiera de las dos concentraciones probadas, redujo significativamente los mecanismos microbianos y endógenos de alcalinización, mecanismos que pueden limitar la vida útil del pescado.

De la misma manera, en el caso del rape almacenado en el sistema de hielo C-800, el valor de pH resultó ser significativamente ( $P < 0,05$ ) menor en comparación con los lotes C-400 y control.

Estos resultados están en consonancia con otros estudios, donde se consiguió mantener buenos valores de pH en filetes de siluro (*Silurus glanis*) tratados con ácido láctico (Kim y col., 1995) y muestras de lenguado tratadas con ácido elágico, ácido ascórbico y ascorbato de sodio (Zambuchini y col., 2008).

### **Análisis sensorial**

En relación al análisis sensorial, los individuos de merluza iniciales presentaron la mayor calidad (E), mientras que los de rape y gallo reflejaron un grado de calidad menor (A), según el examen de las branquias y olor externo. Estas diferencias son frecuentes, ya que no todas las especies son capturadas al mismo tiempo por los buques que operan en el caladero de Gran Sol.

En el caso de merluza, el lote C-800, que posee la concentración mayor de ácidos, presenta el mejor comportamiento y mantiene una calidad aceptable incluso después de 12 días de almacenamiento. Sin embargo, este resultado no se observó para los otros dos lotes. Por lo que el almacenamiento de merluza en el sistema de hielo ácido C-800 proporcionó una mejor conservación en términos de calidad sensorial, especialmente olor y sabor.

En el caso de gallo, se obtuvieron resultados similares. Así, solamente el lote C-800 mantuvo una calidad aceptable, en lo que respecta a los parámetros sensoriales de olor y sabor, después de 8 días de almacenamiento en comparación con los otros dos lotes.

Para finalizar, los ejemplares de rape experimentaron un comportamiento mejor en todos los lotes, en comparación con merluza y gallo. Además, el rape almacenado en el sistema hielo C-800 llegó a ser aceptable a día 12, resultado que no fue observado en los otros dos lotes.

La vida útil de los individuos de rape considerados en el presente trabajo fue mayor que en el caso de merluza y gallo. Estos resultados se correlacionan bien con la formación de N-TMA, que resultó ser menor en el caso del rape en comparación con la merluza y el gallo, así como con el pH, cuyos valores aumentaron levemente en el caso del rape.

Estos resultados indican claramente un impacto más limitado de los mecanismos alcalinizantes en rape, lo que implica una limitada formación de compuestos nitrogenados, que afectan negativamente a la calidad sensorial y a la vida útil del pescado (Rodríguez, y col., 2003). Estos resultados están de acuerdo con estudios previos donde se puso de manifiesto la resistencia de rape refrigerado en hielo tradicional y en hielo líquido frente a la degradación química y microbiana (Barros-Velázquez, y col., 2008).

En general y conforme a estos resultados, no se encontraron beneficios significativos en el uso del sistema de hielo ácido C-400 comparado con el sistema control. Por el contrario, la incorporación de ácidos ascórbico, láctico y cítrico a la concentración utilizada en el lote C-800 dio como resultado una mejora

de la calidad y extensión de vida útil en comparación con los otros dos lotes. Estos resultados, concuerdan con los recuentos microbiológicos determinados en este estudio, que mostraron un lento crecimiento microbiano para la merluza, el rape y el gallo como resultado de la combinación de ácidos en el lote C-800.

En este estudio, las piezas de pescado almacenadas en hielo en escamas fueron almacenadas en una habitación isoterma a 4° C. El efecto combinado de la refrigeración y los ácidos orgánicos resultaron tener efectos beneficiosos en términos de calidad microbiológica y sensorial para las tres especies analizadas. Más aún, las ventajas del hielo líquido como sistema de pre-tratamiento para reducir la temperatura del pescado, ligeramente por debajo de 0° C previo almacenamiento en hielo en escamas, han sido estudiadas anteriormente (Piñeiro y col., 2005). En este sentido, el sistema de hielo en escamas, incluyendo los ácidos orgánicos propuestos en este estudio, proporcionaría ventajas adicionales si fuese combinado con un tratamiento previo de enfriamiento con hielo líquido.



**CAPÍTULO 4:**

**Effect of a two-step natural organic acid treatment on microbial activity and lipid damage during blue whiting (*Micromesistius poutassou*) chilling.**

**Efecto de un sistema de hielo conteniendo ácidos orgánicos naturales sobre la actividad microbológica y alteración lipídica de la bacaladilla (*Micromesistius poutassou*) durante su almacenamiento en refrigeración.**



Original article

## Effect of a two-step natural organic acid treatment on microbial activity and lipid damage during blue whiting (*Micromesistius poutassou*) chilling

Minia Sanjuás-Rey,<sup>1</sup> Bibiana García-Soto,<sup>2</sup> Jorge Barros-Velázquez,<sup>1</sup> José R. Fuertes-Gamundi<sup>2</sup> & Santiago P. Aubourg<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, Escuela de Ciencias Veterinarias, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Spain

<sup>2</sup> Cooperativa de Armadores de Pesca del Puerto de Vigo (ARVI), Vigo, Spain

<sup>3</sup> Department of Food Technology, Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), Vigo, Spain

(Received 9 July 2010; Accepted in revised form 11 January 2011)

**Summary** Quality loss inhibition in chilled blue whiting (*Micromesistius poutassou*) was investigated. For it, a natural organic acid-mixture including ascorbic, citric and lactic acids was applied in a two-step processing strategy: (i) as an aqueous dipping medium previous to chilling storage and, (ii) included in the flake ice employed as chilling system. As a result of the acid-mixture addition, a partial inhibition of microbial and biochemical mechanisms involved in the quality loss was obtained. Thus, aerobe and psychrotrophe counts in treated fish showed lower ranges (2.07–4.15 and 2.43–4.39 log CFU g<sup>-1</sup>, respectively) than control fish (2.64–5.83 and 2.30–5.30 log CFU g<sup>-1</sup>, respectively). Sensory analysis revealed that treated fish was still acceptable at the end of the experiment (day 9), while control fish was rejected at this time. Lipid hydrolysis (free fatty acid formation) proved to be more limiting of fish quality than lipid oxidation (peroxide and thiobarbituric acid-reactive substance formation).

**Keywords** Ascorbic, citric, dipping, icing, lactic, lipid damage, microbial activity, *Micromesistius poutassou*.

### Introduction

The deterioration of marine species begins immediately upon capture or harvest, and the degree to which it continues depends directly on storage conditions. Flake ice has been the most employed method to cool and store fish products and partially inhibit detrimental effects on the commercial value. However, significant deterioration of sensory quality and nutritional value has been detected in chilled fish as a result of different damage pathways (Whittle *et al.*, 1990; Olafsdóttir *et al.*, 1997). To retard fish damage as long as possible, and accordingly extend shelf life, a wide number of preservative strategies to be combined to flake ice chilling have been tested satisfactorily such as previous chemical and physical treatments (Toledo-Flores & Zall, 1992; Ashie *et al.*, 1996) and employment of preservative packaging (Ozen & Floros, 2001; Sivertsvik *et al.*, 2002).

Among previous chemical treatments to chilling storage, natural low molecular weight organic acids and their sodium salts have shown to represent a relevant choice because of their easy availability, low commercial cost and wide range of permitted concentrations for their use. Thus, ascorbic and citric acids (AA and CA, respectively) are widely known for their role as chelators, acidulants in biological systems and synergists of primary antioxidants, so that a profitable effect on minced fish (Hwang & Regenstein, 1988; Stodolnik *et al.*, 1992), fish fillets (Badii & Howell, 2002; Kilinc *et al.*, 2009; Pourashouri *et al.*, 2009) and whole fish (Aubourg *et al.*, 2004) has been observed. Further, lactic acid (LA) has been reported to be effective in suppressing Gram-negative bacteria, which are known to be the most important fish spoiler group; thus, LA pre-treatment has shown to be effective in preserving and extending shelf-life in fish fillets (Kim *et al.*, 1995; Metin *et al.*, 2001; Erkan, 2003; Erkan & Mol, 2004), coated fish (Gogus *et al.*, 2006) and fish slices (Sallam, 2007). However, when employed above certain concentrations or for relatively long exposure times, some

\*Correspondent: E-mail: saubourg@iim.csic.es

evidence of fish digestion by such organic acids could be observed, which lead to detrimental sensory and physical properties of the fish (Kim *et al.*, 1995; Metin *et al.*, 2001).

Blue whiting (*Micromesistius poutassou*) species belongs to the *Gadidae* family and has been found an abundant fish in the northeast Atlantic leading to great capture values in several countries such as Norway, Russian Federation, Iceland and Estonia (FAO, 2007). Previous research has shown its profitable nutritional support to human diet (Dagbjartson, 1975; Martínez-Valverde *et al.*, 2000), being most efforts focused to its employment in the manufacture of restructured products (Montero *et al.*, 1998; Pérez-Mateos *et al.*, 2002). However, since it is also directly consumed, blue whiting suitability to freezing (Huidobro & Tejada, 1995; Aubourg *et al.*, 2007), cold-smoking (Gómez-Guillén *et al.*, 2009) and canning (Oehlenschläger *et al.*, 2008) processes has also been tested. Concerning its chilled storage, previous research accounts for the nucleotide degradation and volatile amine formation (Smith *et al.*, 1980), lipid oxidation development (Aubourg *et al.*, 1998) and trimethylamine oxide breakdown into formaldehyde and dimethylamine (Rey-Mansilla *et al.*, 1999).

In the present research, a novel approach is carried out to inhibit quality loss in chilled blue whiting. For it, a natural organic acid-mixture including AA, CA and LA was applied in a two-step processing. First, as an aqueous dipping medium previously to chilling storage; then, present in the ice employed as chilling system. Microbial activity and lipid damage development were evaluated throughout the storage time and compared to control fish.

## Materials and methods

### The natural organic acid-mixture and preliminary trials

A commercial formula (BPS2) including a natural organic acid-mixture was supplied by *Atlantic one*, S. L. (Vigo, Spain) for employment in the present research. Such a product consists of a water-soluble viscous liquid including AA, CA and LA (1 mequiv. acid/120 mg product) in glycerol, being regarded as safe (GRAS) for use in foods according to European and American administrations (Madrid *et al.*, 1994; Giese, 1996).

Preliminary trials were carried out in order to assess the most convenient product concentration to be employed both in the dipping medium as well as in the icing system. For it, the effect on sensory acceptance (appearance, texture, gills, odour and colour) of a wide concentration range (70–2000 ppm) of the organic acid-mixture was checked. Thus, concentration values included in the 70–500 ppm range did not provide an effective quality enhancement

of the fish, while values above 1000 ppm led to some deterioration of the sensory and physical properties of the fish. As a result, 800 ppm concentration showed to provide the most convenient results when employed in both processing steps. Accordingly, this concentration was chosen for being employed in the present research.

### Raw fish, processing and sampling

Fresh blue whiting (seventy-two individuals) were caught near the Galician Atlantic coast (northwestern Spain) in Winter 2010 and transported on ice to the laboratory. The length and weight of the fish specimens were included in the following ranges: 22–25 cm and 70–120 g, respectively.

Upon arrival in the laboratory, eight individual fishes were separated and considered as starting raw fish (day 0); for it, two different groups (four individuals per group) were considered and analysed independently. The remaining fish were divided into two batches (thirty-two individuals in each batch). The first batch (preserved fish; P batch) was dipped in an 800 ppm aqueous solution of the organic acid-mixture during 2 min (ca. 290 g fish L<sup>-1</sup> solution); after that, the fish were placed in boxes and directly surrounded by ice prepared with a 800 ppm aqueous solution of the organic acid-mixture.

Fish corresponding to the second batch (control fish; C batch) was dipped in water during 2 min (ca. 290 g fish L<sup>-1</sup> solution) and then placed in boxes surrounded by traditional ice prepared with water.

In both batches, the fish individuals were surrounded by ice (with or without organic acid-mixture, respectively) at a 1:1 fish-to-ice ratio. Both batches were placed in a refrigerated room (4 °C). Boxes employed allowed draining and ice was renewed when required. Fish samples from the two different batches were taken for analysis on days 2, 5, 7 and 9. At each sampling point, eight individuals of each batch were taken for analysis, being considered into two groups (four individuals in each group) that were studied independently.

### Microbial counting

Samples of 10 g of fish muscle were dissected aseptically from chilled fish specimens, mixed with 90 mL of 0.1% peptone water (Merck, Darmstadt, Germany), and homogenised in a stomacher (AES, Combourg, France) as previously described (Ben-Gigirey *et al.*, 1998, 1999).

In all cases, serial dilutions from the microbial extracts were prepared in 0.1% peptone water. Total aerobes were investigated by surface inoculation in plate count agar (PCA, Oxoid Ltd, London, UK), after incubation at 30 °C for 48 h. Psychrophiles were also investigated in PCA but incubation was carried out at

7–8 °C for 7 days. *Enterobacteriaceae* were investigated by pour plating on Violet Red Bile Agar (VRBA) (Merck, Darmstadt, Germany) after incubation at 37 °C for 24 h. Microorganisms exhibiting a proteolytic or lipolytic phenotype were investigated in casein-agar medium or tributyrin-agar, respectively, after incubation at 30 °C for 48 h, as previously described (Ben-Gigirey *et al.*, 2000).

In all cases, bacterial counts were transformed into log CFU g<sup>-1</sup> muscle before undergoing statistical analysis.

#### Proximate composition and pH assessment

Moisture content was determined by the difference between the weight of fresh homogenised white muscle (1–2 g) and the weight recorded after 4 h at 105 °C. Results were calculated as g water kg<sup>-1</sup> muscle.

Lipids were extracted from the fish white muscle by the Bligh & Dyer (1959) method, by employing a single-phase solubilisation of the lipids using a chloroform-methanol (1:1) mixture. Quantification results were calculated as g lipid kg<sup>-1</sup> muscle.

The evolution of pH values in fish muscle along storage time was determined by means of a 6-mm diameter insertion electrode (Crison, Barcelona, Spain).

#### Lipid damage assessment

The peroxide value (PV) was determined spectrophotometrically (Beckman Coulter, DU 640, London, UK) in the lipid extract by previous peroxide reduction with ferric thiocyanate, according to the Chapman & McKay (1949) method. Results were expressed as mequiv. active oxygen kg<sup>-1</sup> lipids.

The thiobarbituric acid (TBA) index was determined according to Vyncke (1970). This method is based on the reaction between a trichloroacetic acid extract of the fish muscle and TBA. Content on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was spectrophotometrically measured at 532 nm and results were expressed as mg malondialdehyde kg<sup>-1</sup> muscle.

Formation of fluorescent compounds (Fluorimeter LS 45; Perkin Elmer España, Tres Cantos, Madrid, Spain) was determined by measurements at 393/463 nm and 327/415 nm as described by Aubourg *et al.* (1998). The relative fluorescence (RF) was calculated as follows:  $RF = F/F_{st}$ , where  $F$  is the fluorescence measured at each excitation/emission maximum, and  $F_{st}$  is the fluorescence intensity of a quinine sulphate solution (1 µg mL<sup>-1</sup> in 0.05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) at the corresponding wavelength. The fluorescence ratio (FR) was calculated as the ratio between the two RF values:  $FR = RF_{393/463\text{ nm}}/RF_{327/415\text{ nm}}$ . The FR value was determined in the aqueous phase resulting from the lipid extraction of the fish muscle (Bligh & Dyer, 1959).

Free fatty acid (FFA) content was determined in the lipid extract of the fish muscle by the Lowry & Tinsley (1976) method based on complex formation with cupric acetate-pyridine followed by spectrophotometric (715 nm) assessment. Results were expressed as g FFA kg<sup>-1</sup> lipids.

#### Sensory analysis

Sensory analysis was conducted by a sensory panel consisting of five experienced judges, according to guidelines concerning fresh and refrigerated fish (DOCE, 1989). Panellists had been involved in sensory analysis of different kinds of fish foods during the last 10 years. Previously to the present experiment, a special training was carried out on chilled blue whiting.

Four categories were ranked (Table 1): highest quality (E), good quality (A), fair quality (B) and unacceptable quality (C). Sensory assessment of the fish included the following parameters: skin and mucus development, external odour, gills and gill cavity, eyes and flesh odour (raw and cooked fish) and taste (cooked fish). Fish samples were cooked individually in covered casserole dishes and immediately presented in these dishes to the panellists. At each sampling time, the fish muscle portions were presented to panellists in individual trays and were scored individually. The panel members shared samples tested.

#### Statistical analysis

Data obtained from the different microbial and chemical analyses were subjected to the ANOVA method ( $P < 0.05$ ) to explore differences by two different ways: processing conditions effect and chilling time effect (Statsoft, Statistica, version 6.0, 2001); comparison of means was performed using a least-squares difference (LSD) method. Correlation analysis among parameters (chilling time, microbial indices, lipid damage indices and sensory acceptance) was also carried out; for sensory values, the Spearman test was employed. Linear fittings are expressed; otherwise, the kind of fitting (quadratic or logarithmic) is mentioned.

### Results and discussion

#### Microbial activity assessment

The comparative evolution of total aerobes for each batch during storage time can be seen in Fig. 1. In general terms, the control batch exhibited higher microbial numbers than the counterpart batch stored in the natural-organic acid system. Thus, the most remarkable differences were observed on days 2, 5 and 9, the mean differences between batches being 0.57, 3.17 and 0.48 log CFU g<sup>-1</sup> muscle, respectively. Nevertheless,

Table 1 Scale employed for evaluating the sensory quality of chilled blue whiting

Attribute	Highest quality (E)	Good quality (A)	Fair quality (B)	Unacceptable (C)
<b>Skin and mucus development</b>	Very intense pigmentation; transparent mucus	Milky mucus; insignificant pigmentation losses	Slightly greyish mucus; pigmentation without shine	Widely opaque mucus; important pigmentation losses
<b>External odour</b>	Sharply seaweed and shellfish smell	Weakly seaweed and shellfish smell	Incipiently putrid or ammonia odour	Putrid or ammonia odour
<b>Gills and gill cavity</b>	Brightly red; lamina perfectly separated; without odour	Rose coloured; lamina adhered in groups; without odour	Slightly pale; lamina adhered in groups; incipient fishy odour	Grey-yellowish colour; lamina totally adhered; intense ammonia odour
<b>Eyes</b>	Convex; transparent cornea; bright and black pupil	Convex and slightly sunken; slightly opalescent cornea; black and cloudy pupil	Flat; opalescent cornea; opaque pupil	Concave and milky cornea; internal organs blurred
<b>Flesh odour (raw fish)</b>	Sharply seaweed and shellfish	Weakly seaweed and shellfish	Incipiently putrid or ammonia odour	Putrid or ammonia odour
<b>Flesh odour and taste (cooked fish)</b>	Sharply fresh and agreeable	Weakly fresh and agreeable	Incipiently putrid or ammonia odour	Putrid or ammonia odour

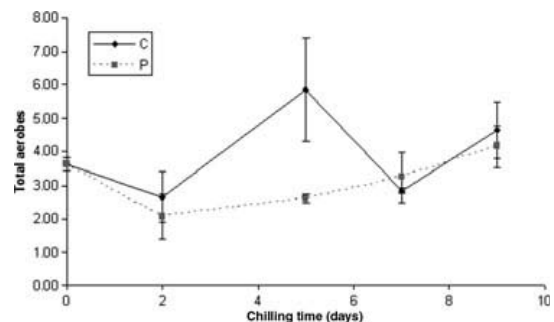


Figure 1 Comparative aerobic count (log CFU g<sup>-1</sup> muscle) assessment\* in chilled blue whiting processed under different conditions\*\*. \*Mean values; standard deviations are denoted by bars. \*\*Processing conditions: C (control fish; fish dipped in water and then kept in traditional ice) and P (preserved fish; fish dipped in aqueous solution including 800 ppm of the organic acid-mixture and then kept in ice prepared from an aqueous 800 ppm solution of the acid mixture).

in the course of the nine days of chilled storage, significant differences ( $P < 0.05$ ) for aerobic assessment were only observed at day 5. Concerning its evolution during the chilling storage, aerobic counts did not provide a good correlation value with chilling time.

The comparative evolution of psychrophilic bacteria can be seen in Fig. 2. The counts in the fish batch processed under the natural-organic acid condition were lower than in the control batch from day 5 until day 9. Thus, the average differences in the counts of psychrophiles at day 5 were 1.44 log CFU g<sup>-1</sup> muscle and for the following days differences of 0.46 and 0.91 log CFU g<sup>-1</sup> muscle were determined. However, and although the natural-organic acid system exhibited a better control of bacterial growth, significant differences ( $P < 0.05$ ) were only obtained at day 5, as for aerobic assessment.

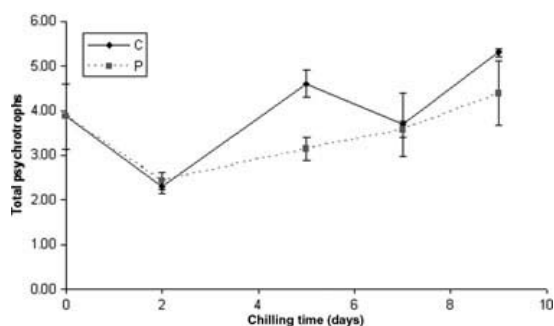


Figure 2 Comparative psychrotroph count (log CFU g<sup>-1</sup> muscle) assessment\* in chilled blue whiting processed under different conditions\*\*. \*Mean values are expressed; standard deviations are denoted by bars. \*\* Processing conditions (C and P) as expressed in Fig. 1.

Concerning its evolution during the chilling storage, psychrophilic counts did not provide a good correlation value with chilling time; compared to aerobic formation, good correlation was only obtained for the preserved batch ( $r^2 = 0.94$ ), being bad in the case of control fish ( $r^2 = 0.77$ ).

*Enterobacteriaceae* and proteolytic bacteria counts did not provide a clear tendency with chilling time (Table 2); thus, all values were included in the ranges 1.0–2.0 and 2.0–4.0 log CFU g<sup>-1</sup> muscle, respectively. With respect to proteolytic bacteria, the natural-organic acid batch exhibited counts that were 0.37, 0.20 and 0.63 log CFU g<sup>-1</sup> muscle lower than the control batch at days 2, 5 and 9, respectively. Likewise, the average counts for *Enterobacteriaceae* in the batch processed in the organic acid-mixture were 0.24, 0.35 and 0.30 log CFU g<sup>-1</sup> muscle lower than the control batch at days 2, 5 and 9, respectively; however, no significant ( $P > 0.05$ ) differences were obtained between both batches for both microbiological assessments.

Lipolytic bacteria provided a constant value (2 log CFU g<sup>-1</sup> muscle) for both batches during the 0- to 7-day period. At the end of the experiment, lipolytic counts were included in the 2.75–2.90 range, and no significant differences ( $P > 0.05$ ) were found between both batches.

The microbial preservative effects observed in this study were quite in accordance with the results reported by Kilinc *et al.* (2009), who studied the microbiology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets dipped in solutions including organic salts (acetate, lactate and citrate). Thus, these authors reported that the immersion of fillets in such solutions slowed down the proliferation of total aerobic and psychrophilic bacteria. Likewise, Marshall & Kim (1996) investigated the microbiology of catfish (*Silurus glanis*) fillets treated by dipping in acetic acid and lactic acid solutions, and found a partial inhibition of bacterial growth under these conditions. An inhibitory effect of microbial activity was also found

in chilled catfish (*S. glanis*) fillets that were previously dipped in a lactic acid solution (Kim *et al.*, 1995); as a result, an extension of the shelf life time was produced. Microbial activity was also partially inhibited by previous lactic acid treatment in chilled chub mackerel (*Scomber japonicus*) (Metin *et al.*, 2001) and Mediterranean mackerel (*Scomber colias*) and mullet (*Mugil cephalus*) (Erkan, 2003) fillets according to a lower microbial count and total volatile-base nitrogen (TVB-N) content assessment throughout a 12-day and 9-day storage period, respectively.

In a previous experiment (Quitral *et al.*, 2009), ice prepared from an aqueous solution from rosemary and oregano extracts was applied to a fatty fish species (Chilean jack mackerel; *Trachurus murphyi*). As in the present study, the employment of ice including a preservative compound as chilling medium led to a partial inhibition of microbial activity, according to the TVB-N content assessment.

In the present study, values obtained in all samples for all kinds of microbial parameters can be considered below the limit of acceptance. This conclusion agrees to previous research on microbial activity development during blue whiting chilling, where trimethylamine formation did not provide a great increase throughout a 8-day period (Smith *et al.*, 1980; Rey-Mansilla *et al.*, 1999) and a strong content of TVB-N content was only obtained after a 10- to 13-day chilled period (Aubourg *et al.*, 2008).

#### Proximate analysis and pH assessment

Moisture and lipid contents were included in the ranges 797–831 and 3.8–4.4 g kg<sup>-1</sup> muscle, respectively. Such values agreed to previous results concerning this fish species (Dagbjartson, 1975; Aubourg *et al.*, 1998, 2007). No differences ( $P > 0.05$ ) in both constituents could be assessed as a result of the preservative treatment. However, a slight increasing moisture

**Table 2** Evolution\* of *Enterobacteriaceae* and proteolytic counts (log CFU g<sup>-1</sup> muscle) and pH values in chilled blue whiting processed under different conditions†

Chilling time (days)	<i>Enterobacteriaceae</i>		Proteolytics		pH	
	C	P	C	P	C	P
0	1.70 (0.01)		3.00 (0.06)		6.80 (0.12)	
2	1.24 (0.35)	1.00 (0.01)	3.22 (1.04)	2.85 (0.21)	6.92 (0.01)	6.85 (0.13)
5	1.50 (0.28)	1.15 (0.21)	2.50 (0.71)	2.30 (0.43)	7.00 (0.08)	6.97 (0.02)
7	0.99 (0.01)	1.73 (1.06)	1.99 (0.01)	2.80 (1.14)	6.98 (0.07)	6.96 (0.01)
9	1.93 (0.11)	1.63 (0.21)	3.58 (0.71)	2.95 (0.35)	6.96 (0.01)	6.96 (0.01)

\* Mean values; standard deviations are indicated in brackets. For each parameter and for each chilling time, no significant ( $P > 0.05$ ) differences were obtained as a result of processing.

† Processing conditions: C (control fish; fish dipped in water and then kept in traditional ice) and P (preserved fish; fish dipped in aqueous solution including 800 ppm of the organic acid-mixture and then kept in ice prepared from an aqueous 800 ppm solution of the acid mixture).

content ( $P < 0.05$ ) could be observed with chilling time for both preserved and control fish batches that could be explained as a result of contact with ice during the chilled storage.

Concerning the pH analysis, values were included in the range 6.90–7.00 for both kinds of fish samples throughout the whole experiment (Table 2). No significant differences ( $P > 0.05$ ) could be observed as a result of the preservative treatment, although lower mean values were observed in the 2- to 7-day period for the preserved batch, this in agreement to previously mentioned results on microbiological counts. Additionally, a slight increase in both batches could be observed in the 0- to 5-day period, so that a fair correlation value ( $r^2 = 0.86$ – $0.89$ ; logarithmic fitting) with chilling time could be depicted for the complete experiment.

Results obtained in the present study concerning pH assessment agree to previous research. Thus, a pH decrease was also obtained in chub mackerel (*S. japonicus*) (Metin *et al.*, 2001) and catfish (*S. glanis*) (Kim *et al.*, 1995) chilled fillets as a result of a previous lactic acid treatment. Additionally, pH value was studied in Chilean jack mackerel (*T. murphyi*) that was kept under ice prepared from a water solution of rosemary and oregano extracts (Quitral *et al.*, 2009); as a result, a lower pH increase could be observed when compared to control mackerel that was attributed to the presence in ice of preservative compounds from both plant extracts.

### Lipid oxidation development

Lipid oxidation was studied by means of different quality indices corresponding to different steps included in the fish lipid oxidation development.

Primary oxidation provided very low scores that remained in all cases under the 4.50 value (Table 3). The preservative treatment did not provide a clear effect ( $P > 0.05$ ) on peroxide formation; additionally, a clear tendency of peroxide formation could not be obtained as a result of the chilling time for both kinds of samples.

Concerning the secondary lipid oxidation development, again relatively low values were obtained, since lower scores than 0.60 were obtained in all cases (Table 3). When compared to control fish, the preservative treatment provided a lower ( $P < 0.05$ ) TBARS formation in chilled fish in the 7- to 9-day period. For both kinds of samples, a progressive increase ( $P < 0.05$ ) could be depicted during the chilled storage, so that good correlation values with chilling time ( $r^2 = 0.89$ – $0.93$ ; quadratic fitting) were obtained.

The fluorescent compound analysis provided a higher formation in control fish, this being significant ( $P < 0.05$ ) at days 2, 7 and 9 (Table 3); such results agree with the TBARS content, so that an inhibitory effect on lipid oxidation development was concluded for the preservative treatment. Starting fish showed a lower ( $P < 0.05$ ) FR value than the remaining samples for both batches; then (2- to 9-day period), a significant increase with chilling time increase was not observed ( $P > 0.05$ ) in any of the batches under study.

Lipid oxidation development has been recognised as a complex process where different kinds of molecules are produced, most of them unstable, susceptible to breakdown and originate lower weight compounds (Aubourg, 1993; Howell, 1995), or react with other molecules (nucleophilic-type, mostly) present in the fish muscle; consequently, the determination of each kind of compound cannot always provide an accurate method for the quality assessment. In the present research, no reliability for the primary lipid oxidation compound assessment (PV) was concluded, while a very short interaction compound formation (FR assessment) was produced. However, secondary (TBARS assessment) lipid oxidation compound measurement showed to be helpful in order to assess the lipid oxidation development throughout the whole chilled storage period.

The partial inhibition of oxidation development found in the present research for chilled blue whiting as a result of the organic acid-mixture treatment in two steps agrees to previous research where AA and CA have shown a profitable antioxidant effect when applied as a

**Table 3** Evolution of lipid oxidation\* in chilled blue whiting processed under different conditions<sup>†</sup>

Chilling time (days)	PV (mequiv. active oxygen kg <sup>-1</sup> lipids)		TBA value (mg malondialdehyde kg <sup>-1</sup> muscle)		FR	
	C	P	C	P	C	P
0	1.53 (0.51)		0.06 (0.03)		0.73 (0.06)	
2	0.71 a (0.28)	1.58 b (0.43)	0.02 (0.01)	0.03 (0.01)	1.23 b (0.14)	0.83 a (0.02)
5	3.39 (1.11)	1.99 (1.18)	0.27 (0.15)	0.24 (0.03)	1.38 (0.26)	1.04 (0.26)
7	0.57 (0.44)	1.25 (0.46)	0.38 b (0.04)	0.21 a (0.05)	1.09 b (0.02)	0.86 a (0.15)
9	4.27 (0.44)	3.89 (1.38)	0.57 b (0.04)	0.39 a (0.11)	1.32 b (0.12)	0.97 a (0.17)

\* Mean values; standard deviations are indicated in brackets. For each quality index and for each chilling time, mean values followed by different letters (a, b) denote significant differences as a result of processing. No letters are indicated when significant differences are not found ( $P > 0.05$ ).

<sup>†</sup> Processing conditions (C and P) as expressed in Table 2.

preliminary treatment to further storage. Thus, CA and its salts have shown to play a synergist role with primary antioxidants and oxygen scavengers during the refrigerated (Stodolnik *et al.*, 1992; Khalil & Mansour, 1998) and frozen (Aubourg *et al.*, 2004; Pourashouri *et al.*, 2009) storage of marine species. In the same way, AA and its salts have been reported to act as antioxidants in minced fish (Hwang & Regenstein, 1988), fish fillets (Badii & Howell, 2002) and whole fish (Aubourg *et al.*, 2004) because of their oxygen scavenger and reducing roles.

Related to the second preservative step tested in the present research, ice prepared from a water solution from rosemary and oregano extracts was applied as chilling system to Chilean jack mackerel (*T. murphyi*); as a result, a lower oxidation development (PV and TBARS assessments) in jack mackerel muscle could be observed during the chilled storage, being this inhibition attributed to polyphenolic compound presence in the icing system.

#### Lipid hydrolysis analysis

Lipid hydrolysis development was measured by the FFA content evolution (Fig. 3). A lower FFA formation ( $P < 0.05$ ) could be concluded for the P-batch in the 7- to 9-day period when compared to control fish, so that an inhibitory effect of the preservative treatment could be concluded. For both batches, a marked FFA formation increase ( $P < 0.05$ ) could be outlined during chilling storage according to previous research (Aubourg *et al.*, 1998; Quitral *et al.*, 2009), so that a good correlation value with chilling time ( $r^2 = 0.91$ ; logarithmic fitting) was obtained.

FFA formation during chilling storage has been reported to be produced as a result of endogenous enzyme activity and microbial activity (Whittle *et al.*, 1990; Madrid *et al.*, 1994). Before the end of the

microbial lag phase (up to 5–8 days, depending on several factors), FFA formation has been reported to be produced mostly as a result of endogenous enzyme (namely, lipases and phospholipases) activity. Later on, microbial activity should gain importance, so that FFA formation is then mostly produced as a result of bacterial catabolic processes. According to this profile, present results on FFA formation in chilled blue whiting would show a first stage of FFA formation (0- to 5-day period) corresponding mostly to the endogenous enzymatic activity; in this period, no significant differences ( $P > 0.05$ ) between batches are found. Then (7- to 9-day period), when microbial activity should gain importance, fish corresponding to the P-batch remains at a relatively constant FFA level, while its counterpart C-batch fish shows a marked ( $P < 0.05$ ) FFA formation, so that a preservative effect would be accorded to the organic acid treatment.

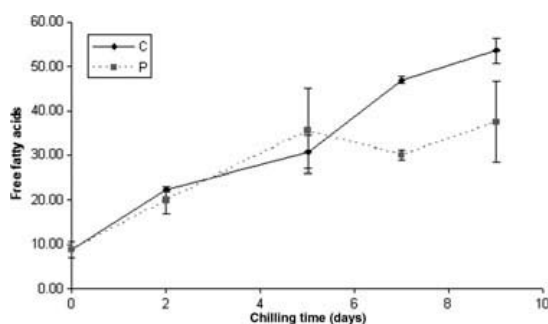
To our knowledge, this inhibitory effect on FFA formation is described for the first time during the chilled storage of a lean fish species. As being molecules supporting acidulant properties, all three acids can be found responsible for this microbial inhibition (Whittle *et al.*, 1990; Ashie *et al.*, 1996). However, this effect has been reported to be specially important in the case of LA, as being recognised as effective in suppressing Gram-negative bacteria activity, which are known to be the most important fish spoiler group (Kim *et al.*, 1995; Metin *et al.*, 2001; Gogus *et al.*, 2006).

Additionally, FFA formation was studied in Chilean jack mackerel (*T. murphyi*) that was kept under ice prepared from a water solution of rosemary and oregano extracts (Quitral *et al.*, 2009); as a result, a lower FFA content could be observed when compared to control mackerel that was attributed to the presence of preservative compounds from both plants present in the icing system.

Relationship between lipid hydrolysis and oxidation has captivated a great attention. FFA are known to have detrimental effects on protein properties and oxidise faster than higher molecular weight lipid classes (namely, triglycerides and phospholipids) by providing a greater accessibility (lower steric hindrance) to oxygen and other pro-oxidant molecules. In the present research, the best correlation value between FFA formation and the different lipid oxidation indices was obtained in the case of the TBARS assessment ( $r^2 = 0.83$ – $0.87$ ).

#### Sensory acceptance

A progressive acceptance decrease could be observed for both fish batches throughout the chilled storage (Table 4), so that a good correlation value was obtained in all cases with chilling time ( $r^2 = 0.90$ – $0.92$ ; quadratic fitting). Preserved fish maintained a good quality till



**Figure 3** Free fatty acid (g kg<sup>-1</sup> lipids) assessment\* in chilled blue whiting processed under different conditions\*\*. \*Mean values are expressed; standard deviations are denoted by bars. \*\*Processing conditions (C and P) as expressed in Fig. 1.

**Table 4** Evolution of sensory quality\* in chilled blue whiting processed under different conditions<sup>†</sup>

Attribute	Storage time (days)							
	2		5		7		9	
	C	P	C	P	C	P	C	P
Skin and mucus development	A	A	A	A	A	A	B	A
External odour	A	A	A	A	A	A	B	B
Gills and gill cavity	A	A	B	A	B	B	C	B
Eyes	A	A	A	A	B	B	B	B
Flesh odour (raw)	A	A	A	A	A	A	B	A
Flesh odour and taste (cooked)	A	A	B	A	B	B	C	B

\*Quality categories: E (highest), A (good), B (fair) and C (unacceptable); starting fish was category E.

<sup>†</sup>Processing conditions (C and P) as expressed in Table 2.

day 5 and were still acceptable at the end of the experiment; however, control fish was only considered as good quality till day 2 and showed a shelf life time of 7 days. Limiting attributes showed to be the flesh odour and taste of cooked fish and the appearance and odour of the gills.

Present research did not provide good correlation values for sensory acceptance and the different chemical lipid oxidation parameters, according to the fact that off-odours detected by the panel were putrid and not rancid. Thus, the best correlations were obtained with the TBA value ( $r^2 = 0.72-0.86$ ). Previous research has shown a strong incidence of FFA accumulation on fish quality loss, being their presence associated in some extent to the lack of sensory acceptability and strongly interrelated with off-odour development (Ingemansson *et al.*, 1995; Refsgaard *et al.*, 2000). In this sense, present research provided a fair correlation value of sensory acceptance with FFA formation ( $r^2 = 0.81-0.90$ ).

Present scores concerning the shelf life increase in chilled blue whiting as a result of the two-step organic acid treatment agree to previous research. Thus, CA and AA have shown to provide shelf life increases when employed as a pre-treatment (namely, aqueous solution dipping) to further frozen storage conditions (Pourashouri *et al.*, 2009). Concerning the chilling storage, pre-treatment by dipping on a lactic acid solution also increased the shelf life in catfish (*S. glanis*) (Kim *et al.*, 1995) and chub mackerel (*S. japonicus*) (Metin *et al.*, 2001) fillets.

### Final remarks

Assurance of both high quality and safety of chilled seafood is an important actual challenge for fish traders and food technologists, so that commercial requirements are always related to the search for valuable and practical technologies that may provide enhancing possibilities. The present study, focused to blue whiting chilling, provides a first approach to the employment of

a novel two-step treatment including a natural organic acid-mixture (AA, CA and LA), such acids providing complementary preservative properties (acidulants, antioxidants and antimicrobians). In a first step, the acid mixture was applied in an aqueous dipping medium previously to the chilling storage; then, the acid mixture was included in the ice employed as chilling system.

According to quality indices related to microbiological activity (microbiological group counts) and lipid damage (hydrolysis and oxidation) development in chilled blue whiting, results obtained showed a profitable role of the organic acid-mixture treatment; thus, a partial inhibition of both damage pathways was attained, this leading to an increased shelf life time when compared to control fish.

According to the results obtained in the present research, lipid hydrolysis showed to be a more relevant event than lipid oxidation in chilled blue whiting. Thus, FFA formation provided a great increase throughout the storage period, while lipid oxidation scores (peroxides and TBARS) remained relatively low. Meantime, counts obtained for the different microbiological groups remained as acceptable values throughout the whole experiment for individual fishes corresponding to both batches.

Further studies focused to the positive role of this two-step strategy are envisaged. A great effort ought to be addressed towards knowledge of the organic acid range where optimal effects could be attained, this including knowledge of the endogenous antioxidant composition corresponding to the fish species to be tested (synergism possibility analysis) and towards research checking the diffusion rate of organic acids from both the dipping and the icing media to the fish muscle.

### Acknowledgments

The authors thank the owner and crew of the CACHA-CHO and CHANS ships for their collaboration in the present study, and the Vigo's harbour fishing fleet in

general for kindly providing the blue whiting fish. The authors also thank Mr. Marcos Trigo for his excellent technical assistance and ATLANTIC ONE, S. L. (Vigo, Spain) for providing the commercial organic acid-mixture BPS2. This work was supported by the Secretaría Xeral de I + D from the Xunta de Galicia (Galicia, Spain) through the Research Project PGIDIT 08 TAL 038E.

## References

- Ashie, I., Smith, J. & Simpson, B. (1996). Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **36**, 87–121.
- Aubourg, S. (1993). Review: Interaction of malondialdehyde with biological molecules: new trends about reactivity and significance. *International Journal of Food Science and Technology*, **28**, 323–335.
- Aubourg, S., Medina, I. & Gallardo, J. (1998). Quality assessment of blue whiting (*Micromesistius poutassou*) during chilled storage by monitoring lipid damages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 3662–3666.
- Aubourg, S., Pérez-Alonso, F. & Gallardo, J. (2004). Studies on rancidity inhibition in frozen horse mackerel (*Trachurus trachurus*) by citric and ascorbic acids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **106**, 232–240.
- Aubourg, S., Lago, H., Sayar, N. & González, R. (2007). Lipid damage during frozen storage of gadiform species captured in different seasons. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **109**, 608–616.
- Badii, F. & Howell, N. (2002). Effect of antioxidants, citrate, and cryoprotectants on protein denaturation and texture of frozen cod (*Gadus morhua*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 2053–2061.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J., Villa, T. & Barros-Velázquez, J. (1998). Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *Journal of Food Protection*, **61**, 608–615.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J., Villa, T. & Barros-Velázquez, J. (1999). Histamine and cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen albacore (*Thunnus alalunga*). *Journal of Food Protection*, **62**, 933–939.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J., Villa, T. & Barros-Velázquez, J. (2000). Characterization of biogenic amine-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from white muscle of fresh and frozen albacore tuna. *International Journal of Food Microbiology*, **57**, 19–31.
- Bligh, E. & Dyer, W. (1959). A rapid method of total extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**, 911–917.
- Chapman, R. & McKay, J. (1949). The estimation of peroxides in fats and oils by the ferric thiocyanate method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **26**, 360–363.
- Dagbjartson, B. (1975). Utilization of blue whiting, *Micromesistius poutassou*, for human consumption. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **32**, 747–751.
- DOCE (1989). Baremo de Clasificación de Frescura. In: *Diario Oficial de las Comunidades Europeas (L5/21, 07.01.1989)*. Pp. 5–6. Brussels, Belgium: European Commission.
- Erkan, N. (2003). Treatment of fillets (*Scomber colias* and *Mugil cephalus*) with sodium lactate and propyl gallate: influence on shelf life and quality. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **54**, 60–63.
- Erkan, N. & Mol, S. (2004). The effect of calcium lactate treatment on the shelf life and quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **55**, 73–96.
- FAO (2007). Fishery statistics. Capture production. In: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Pp. 107–108. Vol. 100/1. Rome, Italy: Yearbook 2007.
- Giese, J. (1996). Antioxidants: tools for preventing lipid oxidation. *Food Technology*, **50**, 73–80.
- Gogus, U., Bozoglu, F. & Yurdugul, S. (2006). Comparative effects of lactic acid, nisin, coating combined and alone applications on some postmortem quality criteria of refrigerated *Sardina pilchardus*. *Journal of Food Quality*, **29**, 658–671.
- Gómez-Guillén, C., Gómez-Estaca, J., Giménez, B. & Montero, P. (2009). Alternative fish species for cold-smoking process. *International Journal of Food Science and Technology*, **44**, 1525–1535.
- Howell, N. (1995). Interaction of proteins with small molecules. In: *Ingredient Interactions – Effects on Food Quality* (edited by A. Gaonkar). Pp. 269–289. New York, USA: Marcel Dekker.
- Huidobro, A. & Tejada, M. (1995). Alteration of the electrophoretic pattern of myofibrillar proteins in fish mince during frozen storage. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **200**, 247–251.
- Hwang, K. & Regenstein, J. (1988). Protection of menhaden mince lipids from rancidity during frozen storage. *Journal of Food Science*, **45**, 1120–1124.
- Ingemansson, T., Kaufmann, P. & Ekstrand, B. (1995). Multivariate evaluation of lipid hydrolysis and oxidation data from light and dark muscle of frozen stored rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 2046–2052.
- Khalil, A. & Mansour, E. (1998). Control of lipid oxidation in cooked and uncooked refrigerated carp fillets by antioxidant and packaging combinations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 1158–1162.
- Kilinc, B., Cakli, S., Dincer, T. & Tolasa, S. (2009). Microbiological, chemical, sensory, color, and textural changes of rainbow trout fillets treated with sodium acetate, sodium lactate, sodium citrate, and stored at 4 °C. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **18**, 3–17.
- Kim, C., Hearnberger, J. & Eun, J. (1995). Gram-negative bacteria in refrigerated catfish fillets treated with lactic culture and lactic acid. *Journal of Food Protection*, **58**, 639–643.
- Lowry, R. & Tinsley, I. (1976). Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **53**, 470–472.
- Madrid, A., Madrid, J. & Madrid, R. (1994). Chilling, freezing and ultra-freezing of fish and derivatives. In: *Technology of Fish and its Derivatives*. Pp. 45–103. Madrid, Spain: AMV Ediciones Mundi-Prensa.
- Marshall, D. & Kim, C. (1996). Microbiological and sensory analyses of refrigerated catfish fillets treated with acetic and lactic acids. *Journal of Food Quality*, **19**, 317–329.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M., Santaella, M. & Ros, G. (2000). The content and nutritional significance of minerals on fish flesh in the presence and absence of bone. *Food Chemistry*, **71**, 503–509.
- Metin, S., Erkan, N., Varlik, C. & Aran, N. (2001). Extension of shelf life of chub mackerel (*Scomber japonicus* Houttuyn 1780) treated with lactic acid. *European Food Research and Technology*, **213**, 174–177.
- Montero, P., Pérez-Mateos, M. & Borderías, J. (1998). Chilled storage of high pressure and heat-treated gels of blue whiting (*Micromesistius poutassou*) muscle. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **207**, 146–153.
- Oehlenschläger, J., Karl, H., Mitchell, M., Fagan, J. & Gormley, R. (2008). Evaluation of quality parameters of canned and frozen blue whiting (*Micromesistius poutassou*). *Journal of Fisheries Sciences*, **2**, 722–732.
- Olafsdóttir, G., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, J. et al. (1997). Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science and Technology*, **8**, 258–265.

- Ozen, B. & Floros, J. (2001). Effects of emerging food processing techniques on the packaging materials. *Trends in Food Science and Technology*, **12**, 60–67.
- Pérez-Mateos, M., Solas, T. & Montero, P. (2002). Carrageenans and alginate effects on properties of combined pressure and temperature in fish mince gels. *Food Hydrocolloids*, **16**, 225–233.
- Pourashouri, P., Shabanpour, B., Aubourg, S., Daghigh Rohi, J. & Shabani, A. (2009). An investigation of rancidity inhibition during storage of Wels catfish (*Silurus glanis*) fillets by previous ascorbic and citric acid treatment. *International Journal of Food Science and Technology*, **44**, 1503–1509.
- Quitral, V., Donoso, M<sup>a</sup>L., Ortiz, J., Herrera, M<sup>a</sup>V., Araya, H. & Aubourg, S. (2009). Chemical changes during the chilled storage of Chilean jack mackerel (*Trachurus murphyi*): effect of a plant extract-icing system. *Food Science and Technology*, **42**, 1450–1454.
- Refsgaard, H., Brockhoff, P. & Jensen, B. (2000). Free polyunsaturated fatty acids cause taste deterioration of salmon during frozen storage. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 3280–3285.
- Rey-Mansilla, M., Sotelo, C. & Gallardo, J. (1999). Decomposition of trimethylamine oxide during iced storage of blue whiting (*Micromesistius poutassou*). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **208**, 267–269.
- Sallam, K. I. (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*, **18**, 566–575.
- Sivertsvik, M., Jeksrud, W. & Rosnes, T. (2002). A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science and Technology*, **37**, 107–127.
- Smith, J., Hardy, R., Thomson, A., Young, K. & Parsons, E. (1980). Some observations on the ambient and chill storage of blue whiting (*Micromesistius poutassou*). In: *Advances in Fish Science and Technology* (edited by J. Connell). Pp. 299–303. Farnham, Surrey, England, UK: Fishing News Books.
- Stodolnik, L., Blasiak, E. & Broszedzka, H. (1992). Effect of Tween 80, citric acid and acetylsalicylic acids on changes in muscle tissue lipids of Baltic herrings during storage. *Chłodnictwo*, **27**, 29–35.
- Toledo-Flores, L. & Zall, R. (1992). Methods for extending the storage life of fresh tropical fish. In: *Advances in Seafood Biochemistry* (edited by G. Flick & R. Martin). Pp. 233–243. Lancaster, PA, USA: Technomic Publishing.
- Vyncke, W. (1970). Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette Seifen Anstrichmittel*, **72**, 1084–1087.
- Whittle, K., Hardy, R. & Hobbs, G. (1990). Chilled fish and fishery products. In: *Chilled Foods: The State of the Art* (edited by T. Gormley). Pp. 87–116. New York, USA: Elsevier Applied Science.

#### **CAPÍTULO 4: Efecto de un sistema de hielo conteniendo ácidos orgánicos naturales sobre la actividad microbiológica y alteración lipídica de la bacaladilla (*Micromesistius poutassou*) durante su almacenamiento en refrigeración.**

Continuando con el objetivo anterior, donde se concluyó que la concentración adecuada para inhibir la alteración del pescado resultó ser 800 ppm de producto comercial BPS2, en este capítulo se investigó la influencia de este conservante en la bacaladilla (*Micromesistius poutassou*). Este conservante fue aplicado en dos etapas, la primera consistió en la inmersión de la especie marina en una disolución acuosa de dicho conservante a esa concentración, para posteriormente ser almacenada en el hielo preparado con ese mismo conservante y en esa misma concentración.

##### **Análisis microbiológico**

Con respecto al estudio microbiológico en la bacaladilla, el lote control (lote-C) presentó mayor concentración de microbiota aerobia mesófila que el lote almacenado en el sistema de ácidos orgánicos naturales (lote-P). Las diferencias más notables se observaron en los días 2, 5 y 9, siendo la diferencia media entre los lotes de 0,57, 3,17 y 0,48 log UFC/ g en músculo de bacaladilla respectivamente. Sin embargo, en el transcurso de los nueve días de almacenamiento en refrigeración, sólo se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en la evolución de microorganismos aerobios mesófilos a día 5. En

relación al aumento en los recuentos de aerobios durante el periodo de refrigeración, no se observó una buena correlación con el tiempo de enfriamiento.

Los recuentos de bacterias psicrófilas fueron menores para el lote-P que para el lote-C, desde el día 5 hasta el día 9. Las diferencias medias en el recuento de psicrófilos a día 5 fueron 1,44 log UFC/g en músculo y en los siguientes días las diferencias medias determinadas fueron de 0,46 log UFC/g y 0,91 log UFC/g, respectivamente

Sin embargo, aunque el sistema de ácidos orgánicos naturales mostró una mejora en el control de crecimiento microbiano, sólo se obtuvieron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en el día 5, al igual que en el caso de la evolución de la microbiota aerobia.

En cuanto a la evolución de los recuentos de organismos psicrófilos durante el almacenamiento en refrigeración, éstos no proporcionaron una buena correlación con el tiempo de enfriamiento. Comparado con la formación de aerobios, sólo se obtuvo buena correlación para el lote P ( $r^2 = 0,94$ ), siendo peor en el caso de la bacaladilla control ( $r^2 = 0,77$ ).

Respecto a las bacterias proteolíticas, el lote P exhibió recuentos de 0,37, 0,20 y 0,63 log UFC/g menores que los lotes control a días 2, 5 y 9, respectivamente. Asimismo, los recuentos medios de *Enterobacteriaceae* en músculo para el lote P fueron 0,24, 0,35 y 0,30 log UFC/g menores que en el lote C a días 2, 5 y 9, respectivamente. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre ambos lotes para las dos evaluaciones microbiológicas.

Las bacterias lipolíticas proporcionaron un valor constante (2 log UFC/g en músculo) para ambos lotes durante los días 0-7. Al final del periodo de estudio, los recuentos de la microbiota lipolítica estuvieron dentro del rango 2,75-2,90 log UFC/g, sin encontrarse diferencias significativas ( $P>0,05$ ) entre lotes.

Los efectos inhibidores del crecimiento microbiano observados en el presente estudio están en concordancia con los resultados descritos por Kilinc y col. (2009), quienes estudiaron la microbiología de filetes de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), sumergidos en soluciones que incluían sales orgánicas (acetato, lactato y citrato). Así, estos autores pusieron de manifiesto que la inmersión de filetes en este tipo de soluciones disminuye la proliferación de bacterias aerobias y psicrófilas. Del mismo modo, Marshall & Kim (1996) investigaron la microbiología de los filetes de siluro (*Silurus glanis*) tratados por inmersión en soluciones de ácido acético y de ácido láctico, encontrando una inhibición parcial de crecimiento bacteriano bajo estas condiciones.

También se observó un efecto inhibidor de actividad microbiana en filetes de siluro refrigerados (*S. glanis*) previamente sumergidos en una solución de ácido láctico (Kim y col, 1995.), dando como resultado una extensión de su vida útil.

La actividad microbiana también fue parcialmente inhibida con tratamiento previo de ácido láctico en estornino (*Scomber japonicus*) refrigerado (Metin y col., 2001), filetes de caballa (*Scomber colias*) y filetes de mújol (*Mugil cephalus*) (Erkan, 2003) acorde con menores recuentos microbianos a los 12 días de almacenamiento y menores contenidos de N-BVT a los 9 días.

En un experimento anterior (Quitral y col., 2009), se aplicó a jurel chileno (*Trachurus murphyi*) hielo preparado a partir de una solución acuosa de extractos

de orégano (*Origanum vulgare*) y romero (*Rosmarinus officinalis*). Al igual que en el presente estudio, el empleo de hielo incluyendo compuestos conservantes en el medio de refrigeración proporcionó una inhibición parcial de la actividad microbiana.

Los valores obtenidos en este estudio para todo tipo de parámetros microbiológicos, y en todas las muestras, se puede considerar que estuvieron por debajo del límite de rechazo. Esta conclusión está en concordancia con investigaciones anteriores acerca del desarrollo de la actividad microbiana en bacaladilla refrigerada donde la formación de TMA no proporcionó un gran aumento a lo largo de un período de 8 días (Smith y col., 1980; Rey-Mansilla y col., 1999), solo observándose altas concentraciones de N-BVT después de un período 10-13 días de refrigeración (Aubourg y col., 1998).

#### **Análisis bioquímico**

En cuanto a los contenidos de humedad y lípidos, éstos estuvieron comprendidos dentro de los rangos 797-831 y 3,8-4,4 g/kg en músculo, respectivamente. Estos valores están en consonancia con resultados previos relacionados con esta especie marina (Dagbjartson, 1975; Aubourg y col., 1998, 2007).

Para ambos constituyentes, no se observaron diferencias ( $P > 0,05$ ) como resultado del tratamiento de conservación. Sin embargo, se pudo observar un ligero aumento del contenido de humedad ( $P < 0,05$ ) con el tiempo de enfriamiento, tanto para el lote P como para el lote C, que podría explicarse como el resultado del contacto con el hielo durante el almacenamiento refrigerado.

En cuanto al análisis de pH, a lo largo de todo el experimento, los valores estuvieron incluidos en el rango de 6,90-7,00 para ambos tipos de muestras. No se observaron diferencias significativas ( $P>0,05$ ) como resultado del tratamiento preservante, aunque se observaron valores medios menores en el período 2-7 días para el lote conservado. Esto concuerda con los resultados de recuentos microbiológicos mencionados anteriormente. Por otra parte, se observó un ligero aumento del pH en el período comprendido entre los días 0-5, para ambos lotes, donde se obtuvo un ajuste de correlación satisfactorio ( $r^2= 0,86-0,89$ ; ajuste logarítmico) entre la evolución del pH y el tiempo de enfriamiento.

Los resultados obtenidos en cuanto a la evolución del pH coinciden con investigaciones anteriores. Así, también se observó una disminución de pH en filetes refrigerados de estornino (*S. japonicus*) (Metin y col., 2001) y siluro (*S. glanis*) (Kim y col., 1995), como resultado de un tratamiento anterior con ácido láctico. Además, el valor de pH se estudió en el jurel chileno (*T. murphyi*), el cual al ser conservado en hielo preparado a partir de una solución acuosa de extractos de romero y orégano (Quitral y col, 2009.) mostró un incremento de pH menor comparado con el jurel control; esto se atribuyó a la presencia de conservantes en el hielo procedentes de los extractos de ambas plantas.

La oxidación lipídica se estudió a través de los diferentes índices de calidad correspondientes a las diferentes etapas del desarrollo de oxidación de lípidos en pescado.

La oxidación primaria presentó puntuaciones muy bajas, que se mantuvieron en todos los casos por debajo del valor 4,50. El tratamiento con ácidos orgánicos no proporcionó un efecto claro ( $P>0,05$ ) en la formación de peróxidos. Además,

no se obtuvo una tendencia clara de formación de peróxidos como resultado del tiempo de refrigeración para ambos tipos de muestra.

En cuanto al desarrollo de la oxidación lipídica secundaria, en el lote conservado, de nuevo se obtuvieron valores relativamente bajos, ya que en todos los casos los valores resultaron ser inferiores a 0,60. Cuando se comparó con el lote control, el tratamiento conservante proporcionó valores de formación de TBARS menores ( $P < 0,05$ ) en el pescado refrigerado para el periodo comprendido entre los días 7-9.

Para ambos lotes se obtuvieron buenos valores de correlación ( $r^2 = 0,89-0,93$ ; ajuste cuadrático) entre el aumento en contenido de TBARS y el tiempo de almacenamiento en refrigeración.

El análisis de compuestos fluorescentes (FR) resultó ser significativamente ( $P < 0,05$ ) superior en los días 2, 7 y 9 para el pescado control frente al preservado. Estos resultados son acordes con el contenido de TBARS, por lo que se deduce que el tratamiento conservante tuvo un efecto inhibitor sobre el desarrollo de la oxidación lipídica.

Las muestras de partida reflejaron un valor FR menor ( $P < 0,05$ ) que para el resto de muestras de ambos lotes, posteriormente, en el periodo 2-9, no se observó un aumento ( $P > 0,05$ ) en ninguno de los lotes con el tiempo en refrigeración.

La oxidación lipídica ha sido reconocido como un proceso complejo, en el que se producen diferentes tipos de moléculas, la mayoría de ellas inestables y de tipo electrófilo, susceptibles de descomposición y de originar compuestos de bajo peso molecular (Aubourg, 1993; Howell, 1995), o reaccionar con otras moléculas

presentes en el músculo del pescado (en su mayoría de tipo nucleófilo); en consecuencia, la determinación de cada tipo de compuesto no siempre resulta un método preciso para la evaluación de la calidad. En este estudio se llegó a la conclusión de la baja utilidad de la medida de compuestos de oxidación lipídica primaria (PV), mientras que se produjo una pequeña formación de los compuestos de interacción, lo que no llevó a diferencias importantes.

Sin embargo, la medición de los compuestos de la oxidación lipídica secundaria (evaluación de TBARS) demostró ser útil para evaluar el desarrollo de la oxidación lipídica durante todo el período de almacenamiento en refrigeración.

En el estudio de bacaladilla refrigerado, se encontró una inhibición parcial en el desarrollo de la oxidación como resultado de la presencia de la mezcla de ácidos orgánicos. El tratamiento en dos pasos coincide con investigaciones anteriores, donde los ácidos ascórbico y cítrico demostraron tener un efecto antioxidante beneficioso cuando se aplica como tratamiento preliminar para su posterior almacenamiento. Así, el ácido cítrico y sus sales han demostrado desempeñar un papel sinérgico con antioxidantes primarios y captadores de oxígeno durante el almacenamiento de especies marinas en refrigeración (Stodolnik y col., 1992; Khalil & Mansour, 1998) y congelación (Aubourg y col., 2004; Pourashouri y col., 2009). De la misma manera, el ácido ascórbico y sus sales han mostrado su actividad como antioxidantes en pescado picado (Hwang & Regenstein, 1988), filetes de pescado (Badii & Howell, 2002) y pescado entero (Aubourg y col., 2004) debido a su papel reductor y absorbedor de oxígeno.

Relacionado con el segundo paso de conservación probado en este estudio, se aplicó una solución acuosa de extractos de romero y orégano a jurel chileno (*T.*

*murphy*). Como resultado, se observó un menor desarrollo en la oxidación del músculo (valores de PV y TBA) durante el almacenamiento en refrigeración, siendo esta inhibición atribuida a la presencia de compuestos polifenólicos presentes en el sistema de hielo.

El desarrollo de la hidrólisis lipídica fue medido por la evolución del contenido en AGL. Se obtuvo una menor formación ( $P < 0,05$ ) de AGL para el lote tratado con conservantes durante el periodo 7-9 días comparado con el lote control, lo que pone de manifiesto el efecto inhibitor del tratamiento con conservantes. En líneas generales, aumentó la formación de AGL ( $P < 0,05$ ) a lo largo del periodo de almacenamiento en refrigeración para ambos lotes, lo que concuerda con lo descrito en investigaciones anteriores (Aubourg y col, 1998; Quiral y col, 2009.). Además se obtuvo, una buena correlación con el tiempo de enfriamiento ( $r^2 = 0,91$ ; ajuste logarítmico).

La formación de AGL durante el almacenamiento en refrigeración ha sido descrita como consecuencia de la actividad enzimática endógena y microbiana (Whittle y col., 1990; Madrid y col., 1994). Antes de finalizar la fase lag microbiana (hasta 5-8 días, dependiendo de varios factores), la formación de ácidos grasos libres se produce principalmente como resultado de la actividad de enzimas endógenas (es decir, lipasas y fosfolipasas). Más tarde, la actividad microbiana cobra importancia, de modo que la formación de AGL se produce principalmente como resultado de procesos catabólicos bacterianos. De acuerdo con este argumento, los resultados obtenidos en este estudio en cuanto a la formación de ácidos grasos libres en bacaladilla refrigerada, mostraron una primera etapa de formación de AGL (período 0-5 días), correspondientes principalmente a la

actividad enzimática endógena. En este período, no hay diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los lotes. Posteriormente (en el período 7-9 días), cuando entra en juego la actividad microbiana, el pescado correspondiente al lote P, mantuvo un nivel relativamente constante de AGL, mientras, que el lote C de pescado manifestó una formación ( $P < 0,05$ ) de ácidos grasos libres considerable, de modo que el tratamiento con ácidos orgánicos confiere un efecto conservante.

En este trabajo se describe por primera vez el efecto inhibitor sobre la formación de AGL en una especie de pescado magro durante el almacenamiento en frío. Siendo moléculas con propiedades acidulantes, los tres ácidos, pudieron ser los responsables de esta inhibición microbiana (Whittle y col., 1990; Ashie y col., 1996). Sin embargo, este efecto inhibitor ha sido descrito para el ácido láctico, especialmente frente a bacterias Gram-negativas, grupo conocido por ser el responsable de la degradación del pescado (Kim y col., 1995.; Metin y col., 2001; Gogus y col., 2006).

Además, el estudio de jurel chileno (*T. murphyi*) conservado en hielo preparado a partir de una solución acuosa de extractos de romero y orégano (Quitral y col., 2009), dio como resultado un menor contenido de ácidos grasos libres en comparación con el jurel control. Esto se atribuyó a la presencia en el hielo de compuestos conservantes procedentes de ambas plantas.

Se sabe que los AGL producen efectos perjudiciales sobre las propiedades de las proteínas y se oxidan más rápidamente que los lípidos de mayor peso molecular (triglicéridos y fosfolípidos), debido a que proporcionan al oxígeno y a otras moléculas pro-oxidantes, una mayor accesibilidad (menor impedimento

estérico). En este estudio, se obtuvo una buena correlación entre la formación de AGL y la evaluación de TBARS ( $r^2 = 0,83-0,87$ ).

### **Análisis sensorial**

En cuanto al análisis sensorial realizado en este estudio, se observó una disminución progresiva de la aceptación para los dos lotes durante todo el periodo de almacenamiento en refrigeración, obteniéndose una buena correlación en todos los casos con el tiempo de enfriamiento ( $r^2 = 0,90 - 0,92$ ; ajuste cuadrático). El pescado conservado en el lote C presentó una buena calidad hasta el día 5 y se mantuvo aceptable hasta el final del experimento. Sin embargo, el pescado del lote C sólo fue considerado de buena calidad hasta el día 2 y mostró una vida útil de 7 días. Los atributos limitantes resultaron ser el olor de la carne, el sabor del pescado cocinado y el aspecto y olor de las branquias.

Esta investigación no ofreció valores buenos de correlación entre la aceptación sensorial y los diferentes parámetros químicos de oxidación lipídica, ya que el olor desagradable detectado en el panel fue calificado como pútrido y no como rancio. Así, la mejor correlación fue obtenida para el valor de TBA ( $r^2 = 0,72$  a  $0,86$ ).

Investigaciones anteriores han demostrado que la acumulación de ácidos grasos libres tiene una fuerte incidencia en la pérdida de calidad del pescado, estando su presencia asociada, en gran medida, a la pérdida de aceptabilidad sensorial y relacionada con el desarrollo de olores desagradables (Ingemansson y col., 1995.; Refsgaard y col., 2000). En este sentido, este trabajo proporcionó un

valor de correlación aceptable entre la aceptación sensorial con la formación de ácidos grasos libres ( $r^2 = 0,81-0,90$ ).

Los resultados aquí obtenidos, respecto al aumento de la vida útil de bacaladilla refrigerada como resultado de un tratamiento en dos pasos con ácidos orgánicos, concuerdan con investigaciones previas. Así, CA y AA han mostrado que proporcionan un aumento de la vida útil al ser empleados como pre-tratamiento (es decir, inmersión en una solución acuosa) para favorecer las condiciones de almacenamiento congelado (Pourashouri y col., 2009).

En cuanto al almacenamiento en refrigeración, un tratamiento previo por inmersión en una solución de ácido láctico también aumentó la vida útil en filetes de siluro (*S. glanis*) (Kim y col., 1995) y estornino (*S. japonicus*) (Metin y col., 2001)



**CAPÍTULO 5:**

**Effect of different icing conditions on lipid damage development in chilled horse mackerel (*Trachurus trachurus*) muscle.**

**Efecto de distintos sistemas de hielo sobre el desarrollo de la alteración lipídica en el músculo de jurel (*Trachurus trachurus*) refrigerado.**



## Effect of different icing conditions on lipid damage development in chilled horse mackerel (*Trachurus trachurus*) muscle

By M. Sanjuás-Rey<sup>1</sup>, J. Barros-Velázquez<sup>1</sup> and S.P. Aubourg<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain.

<sup>2</sup> Department of Food Technology. Instituto de Investigaciones Marinas (IIM-CSIC), Vigo, Spain.  
(\* Corresponding author: saubourg@iim.csic.es)

### RESUMEN

**Efecto de distintas condiciones de refrigeración sobre la alteración lipídica en músculo de jurel (*Trachurus trachurus*).**

Se estudió el empleo de hielo conteniendo una mezcla de ácidos orgánicos naturales (cítrico, ascórbico, láctico) como método de refrigeración en jurel (*Trachurus trachurus*). Para ello, se aplicó hielo incluyendo dos concentraciones (0.005 y 0.020 %; p/v) de cada ácido (condiciones P-1 y P-2, respectivamente). Se estudiaron los efectos producidos sobre el desarrollo de la alteración lipídica en el músculo de pescado conservado durante 13 días; asimismo, se realizaron análisis químicos complementarios de calidad y de aceptación sensorial. Como resultado de la presencia de los ácidos, se observó un pequeño efecto inhibitorio de la formación de peróxidos y de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico. Asimismo, las muestras correspondientes al tratamiento P-2 reflejaron un tiempo de vida útil mayor que las pertenecientes a las condiciones P-1 y control. La presencia de ácidos en el hielo no produjo diferencias en la degradación de nucleótidos ni en la formación de ácidos grasos libres.

**PALABRAS CLAVE:** Ascórbico – Cítrico – Láctico – Lípidos – Oxidación – Refrigeración – *Trachurus trachurus*.

### SUMMARY

**Effect of different icing conditions on lipid damage development in chilled horse mackerel (*Trachurus trachurus*) muscle.**

This study was aimed at investigating the effect of including a mixture of natural organic acids (citric, ascorbic and lactic) in the icing medium employed during the chilled storage of horse mackerel (*Trachurus trachurus*). To this end, two aqueous solutions including 0.005% and 0.020% (w/v) of each acid (P-1 and P-2 conditions, respectively) were employed as icing systems. The effects on lipid damage development in fish muscle were monitored for up to a 13-day storage period; complementary chemical quality and sensory acceptance analyses were carried out. According to peroxide and thiobarbituric acid reactive substance assessment, a slight inhibitory effect was concluded as a result of the acid mixture present in the chilling medium. At the same time, P-2-treated fish showed a longer shelf life than their counterparts belonging to P-1 and control conditions. No effect of the acid presence in the icing system

could be outlined on the nucleotide degradation or the free fatty acid formation.

**KEY-WORDS:** Ascorbic – Chilling – Citric – Lactic – Lipids – Oxidation – *Trachurus trachurus*.

### 1. INTRODUCTION

Marine species deteriorate rapidly after death owing to the effect of a wide variety of biochemical and microbial degradation mechanisms (Whittle *et al.*, 1990; Olafsdóttir *et al.*, 1997). Marine lipids are known to be composed of highly unsaturated fatty acids that are prone to oxidation development, which leads to an important effect on fish quality loss (Aubourg, 1999; Chaouqy *et al.*, 2008). Accordingly, the application of newer and more efficient refrigeration systems to the operations involved in fish handling and storage has drawn attention to enhancing the quality of commercial products. With this objective, a number of preservative strategies to be combined with flake ice chilling have been tested satisfactorily such as previous chemical and physical treatments (Toledo-Flores and Zall, 1992; Ashie *et al.*, 1996) and packaging (Ozen and Floros, 2001; Sivertsvik *et al.*, 2002); other strategies have included the replacement of flake ice with slurry ice (Lago *et al.*, 2010; Aubourg *et al.*, 2010) or chilled sea water (Slattery and Forrest, 2006).

Among previous chemical treatments for chilling storage, natural low molecular weight organic acids and their sodium salts have shown to represent a good choice because of their easy availability, low commercial cost and wide range of permitted concentrations for their use in both European and American administrations (Madrid *et al.*, 1994; Giese, 1996). Thus, ascorbic and citric acids (AA and CA, respectively) are widely known for their role as chelators, acidulants in biological systems and synergists of primary antioxidants, so that a profitable effect on fish fillets (Badii and Howell, 2002; Kilinc *et al.*, 2009; Pourashouri *et al.*, 2009) and whole fish (Aubourg *et al.*, 2004) has been observed. Further, lactic acid (LA) has been reported

to be effective in suppressing Gram-negative bacteria, which are known to be the most important fish spoiler group; thus, LA pre-treatment has shown to be effective in preserving and extending shelf life in fish fillets (Kim *et al.*, 1995; Metin *et al.*, 2001; Erkan, 2003), coated fish (Gogus *et al.*, 2006) and fish slices (Sallam, 2007).

Small pelagic fish species can constitute food products of great economic importance in many European countries (FAO, 2007a). Some of these species are captured in high proportions when their demand is relatively low, so that a large portion of their catches is underutilized and transformed into fish meal for animals. One such abundant medium-fat species in the Northeast Atlantic is horse mackerel (*Trachurus trachurus*) (FAO, 2007b). Great efforts have been made to enhance its shelf life in the frozen state as whole (Simeonidou *et al.*, 1997; Aubourg and Ugliano, 2002; Lugasi *et al.*, 2007), fillet (Simeonidou *et al.*, 1997; Aubourg *et al.*, 2004) or restructured (Sánchez-Alonso *et al.*, 2007; Pazos *et al.*, 2008; Eymard *et al.*, 2010) fish products. Concerning the horse mackerel chilled storage under traditional flake ice conditions, an important quality loss has been observed relating to microbial, physical, chemical and sensory properties (Smith *et al.*, 1980; Mendes, 1999; Aubourg, 2001; Shigemura *et al.*, 2003). Therefore, alternative chilling methods have been attempted such as refrigerated sea water (Smith *et al.*, 1980), liquid ice (Piñeiro *et al.*, 2004) and previous irradiation (Mendes *et al.*, 2005) to inhibit this quality loss.

The present work focuses on the search for appropriate technological treatments that may lengthen the shelf-life of whole horse mackerel traded as a chilled product. To this end, ice including different quantities of CA, AA and LA, was tested as a chilling system. The effects on lipid damage development in fish muscle were monitored for up to 13 days of chilled storage; complementary chemical quality and sensory acceptance analyses were also carried out.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Icing systems

Aqueous solutions including two concentration values (0.050% and 0.020%, w/v) of each natural organic acid (CA, AA and LA) were prepared, packed in polythene bags and kept frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Traditional ice was prepared starting from water only that was packed and kept frozen in the same way as the ones including the organic acid mixtures. Before addition to individual fishes, the different ices were ground to obtain common flakes.

### 2.2. Raw fish, processing and sampling

Fresh horse mackerel (117 individuals) were caught near the Galician Atlantic coast (north western Spain) in Autumn 2010 and transported on ice to

the laboratory. The length and weight of the fish specimens were included in the following ranges: 25-30 cm and 200-250 g, respectively.

Upon arrival at the laboratory, nine individual fishes were separated and considered as starting raw fish (day 0). Three different groups (three individuals per group) were analyzed independently ( $n = 3$ ). The remaining fish were divided into three batches (36 individuals in each batch). The first batch was placed in boxes and directly surrounded by ice prepared with the aqueous solution including 0.005% of each acid (preserved fish; P-1 condition). The second batch was placed in boxes and surrounded by ice prepared with the aqueous solution including 0.020% of each acid (preserved fish; P-2 condition). The remaining batch was placed in boxes and surrounded by traditional ice prepared with water only (control fish; C condition). In all batches, a 1:1 fish-to-ice ratio was employed. All batches were placed in a refrigerated room ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Boxes were allowed to drain and the ice was renewed when needed. Fish samples were taken for analysis on days 4, 7, 11 and 13. At each sampling point, nine individuals from each batch were taken for analysis, being classified into three groups (three individuals in each group) and were studied independently ( $n=3$ ).

### 2.3. Lipid damage analysis

Lipids were extracted from the fish white muscle according to the Bligh and Dyer (1959) method, employing a single-phase solubilization of the lipids using a chloroform-methanol (1:1) mixture. Quantification results were expressed as  $\mu\text{g lipid}/100\text{ g muscle}$ .

The peroxide value (PV) was determined in the lipid extract by peroxide reduction with ferric thiocyanate, according to the Chapman and McKay (1949) method. Results were expressed as meq active oxygen/kg lipids.

The thiobarbituric acid index (TBA-i) was determined according to Vyncke (1970). This method is based on the reaction between a trichloroacetic acid extract of the fish muscle and thiobarbituric acid. The content of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was spectrophotometrically measured at 532 nm and the results were expressed as mg malondialdehyde/kg muscle.

The formation of fluorescent compounds was determined by measurements at 393/463 nm and 327/415 nm as described by Aubourg *et al.* (2004). The relative fluorescence (RF) was calculated as follows:  $\text{RF} = F/F_{\text{st}}$ , where  $F$  is the fluorescence measured at each excitation/emission maximum, and  $F_{\text{st}}$  is the fluorescence intensity of a quinine sulphate solution ( $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$  in  $0.05\ \text{M}\ \text{H}_2\text{SO}_4$ ) at the corresponding wavelength. The fluorescence ratio (FR) was calculated as the ratio between the two RF values:  $\text{FR} = \text{RF}_{393/463\ \text{nm}} / \text{RF}_{327/415\ \text{nm}}$ . The FR value was determined in the lipid fraction resulting from the fish muscle extraction (Bligh and Dyer, 1959).

The free fatty acid (FFA) content was determined in the lipid extract of the fish muscle according to the Lowry and Tinsley (1976) method based on a complex formation with cupric acetate-pyridine followed by spectrophotometric (715 nm) assessment. Results were expressed as g FFA/kg muscle.

#### 2.4. Quality loss analysis by non-lipid chemical indexes

Nucleotide degradation analysis was carried out starting from 6% perchloric acid extracts from the fish muscle according to previous research (Ryder, 1985). The analysis was performed using HPLC, with a Beckman device provided with the programmable solvent module 126, and the scanning detector module 167 connected to the System Gold software, version 8.1 (Beckman Coulter, London, UK). Separations were achieved on a reverse-phase Spherisorb ODS-2 C18 250 x 4.60 mm column (Waters, Milford, MA, USA), with an internal particle diameter of 5 µm. Standard curves for adenosine 5'-triphosphate (ATP) and each compound involved in its degradation pathway, adenosine 5'-diphosphate (ADP), adenosine 5'-monophosphate (AMP), inosine 5'-monophosphate (IMP), inosine (INO) and hypoxanthine (Hx), were constructed in the 0-1 mM range. Results obtained for each degradation compound were calculated as mmol/kg muscle. The K value was calculated according to the following concentration ratio:

$$K \text{ value (\%)} = 100 \times (\text{INO} + \text{Hx}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP} + \text{IMP} + \text{INO} + \text{Hx})$$

The evolution of pH values in fish muscle throughout storage time was determined by means of a 6-mm diameter insertion electrode (Crison, Barcelona, Spain).

#### 2.5. Sensory analysis

A sensory analysis was conducted by a sensory panel consisting of five experienced judges, according to guidelines concerning fresh and refrigerated fish (Council Regulations, 1989). Panellists have been involved in sensory analysis of different kinds of fish foods for the last 10 years. Previous to the present experiment, a special training session was conducted on chilled horse mackerel.

Four categories were ranked: highest quality (E), good quality (A), fair quality (B) and unacceptable quality (C). Sensory assessment of the fish included the following parameters: eyes, gills, external odor, flesh odor (raw and cooked fish) and taste (cooked fish). At each sampling time, the fish muscle portions were presented to panellists in individual trays and were scored individually. The panel members shared samples tested.

#### 2.6. Statistical analysis

Data corresponding to the three icing batches were subjected to one-way analysis of variance

to assess significant ( $p < 0.05$ ) differences among batches. The Statsoft (Statistica, version 6.0, 2001) software was used to explore the statistical significance of the results obtained, including multivariate contrasts and multiple comparisons by the Scheffe, Tukey and Kruskal-Wallis tests. A confidence interval at the 95% level was used in all cases.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Lipid oxidation development

The lipid contents of fish white muscle ranged from 1.0 and 2.5%. The differences observed may be attributed to fish-to-fish variation and not to icing conditions or storage time. The value range obtained corresponds to a medium-fat fish species and agrees with previous research on the same fish species (Aubourg, 2001; Losada *et al.*, 2005).

Lipid oxidation development was assessed by means of the peroxide (primary oxidation), TBARS (secondary oxidation) and fluorescent compound (FR value; tertiary oxidation) formation.

The peroxide development showed a great increase in fish corresponding to control conditions in the 11-13-day period (Table 1); however, during such a period, PV remained under 7.0, a score for fish corresponding to both preserving icing conditions (P-1 and P-2). As a result, an inhibitory effect on peroxide formation could be concluded for the presence of the acid mixture in the icing system, while no effect of the acid content could be outlined.

TBARS formation led to fewer differences than in the case of the PV assessment (Table 1). However, some inhibitory effect ( $p < 0.05$ ) could be concluded for the P-2 icing condition (days 4 and 13) and for the P-1 condition (day 13) as a result of the acid presence in the icing system. As for the PV analysis, an increasing TBARS content was observed with time in all types of processed fish.

Interaction compound formation between oxidized lipids and nucleophilic compounds (namely, protein-like molecules; tertiary lipid oxidation) was assessed according to the fluorescence ratio (Table 2). This analysis showed some differences at earlier stages of the study (day 4 for P-2 condition and day 7 for P-1 condition) when compared to control fish; however, no differences ( $p > 0.05$ ) could be found in the latest stages of the study (11-13-day period), when a higher effect on tertiary lipid oxidation compound would be expected to be present as a result of a higher primary and secondary lipid oxidation development (Table 1).

#### 3.2. Lipid hydrolysis development

With regards to lipid hydrolysis development, no differences ( $p > 0.05$ ) in FFA formation could be concluded as a result of the icing condition employed (Table 2). Indeed, their formation was found relatively low throughout the whole experiment when compared

Table 1  
Peroxide value (PV) and thiobarbituric acid index (TBA-i) assessment\* in chilled horse mackerel kept under different icing conditions\*\*

Chilling Time (days)	Peroxide Value (meq active oxygen/ kg lipids)			Thiobarbituric Acid Index (mg malondialdehyde/ kg muscle)		
	C	P-1	P-2	C	P-1	P-2
4	2.46 (0.78)	2.72 (1.07)	2.36 (1.11)	0.62 b (0.10)	0.64 b (0.13)	0.30 a (0.16)
7	4.61 (1.94)	3.95 (1.86)	4.35 (1.01)	0.65 (0.10)	0.72 (0.23)	0.59 (0.13)
11	10.63 b (1.92)	6.38 ab (2.61)	6.70 a (1.61)	1.08 (0.08)	0.99 (0.17)	0.98 (0.11)
13	14.07 b (2.35)	6.67 a (1.88)	6.87 a (2.32)	1.61 b (0.12)	1.37 a (0.10)	1.22 a (0.14)

\* Mean values of three independent determinations (n = 3); standard deviations are indicated in brackets.

Starting fish values: 1.34±0.52 (PV) and 0.30±0.04 (TBA-i). For each parameter and for each chilling time, mean values followed by different letters (a, b) indicate significant (p<0.05) differences as a result of the icing condition.

\*\* Abbreviations of icing conditions: P-1 (ice including 0.005% of each organic acid), P-2 (ice including 0.020% of each organic acid) and C (ice prepared from water only; control).

Table 2  
Fluorescence ratio (FR) and free fatty acid (FFA) assessment\* in chilled horse mackerel kept under different icing conditions\*\*

Chilling Time (days)	Fluorescence Ratio			Free Fatty Acid (g/ kg muscle)		
	C	P-1	P-2	C	P-1	P-2
4	1.86 b (0.15)	1.35 ab (0.53)	0.92 a (0.05)	0.14 (0.03)	0.16 (0.03)	0.14 (0.04)
7	2.01 b (0.11)	1.58 a (0.37)	1.99 ab (0.27)	0.20 (0.05)	0.21 (0.07)	0.21 (0.02)
11	2.64 (0.54)	2.19 (0.41)	2.39 (0.57)	0.26 (0.03)	0.28 (0.02)	0.27 (0.05)
13	2.96 (0.28)	3.37 (0.35)	2.87 (0.44)	0.33 (0.01)	0.32 (0.04)	0.32 (0.04)

\* Mean values of three independent determinations (n 5 3); standard deviations are indicated in brackets.

Starting fish values: 0.92±0.08 (FR) and 0.11±0.05 (FFA). For each parameter and for each chilling time, mean values followed by different letters (a, b) indicate significant (p<0.05) differences as a result of the icing condition.

\*\* Abbreviations of icing conditions as expressed in Table 1.

to previous research related to horse mackerel chilled storage under traditional flake ice conditions (Aubourg, 2001; Losada *et al.*, 2005). However, as a result of endogenous enzyme activity, an important lipid hydrolysis development has already been detected in horse mackerel muscle during frozen storage (Aubourg and Ugliano, 2002; Lugasi *et al.*, 2007).

The formation of FFA itself does not lead to nutritional losses. However, FFA presence has shown an important role in fish muscle texture changes (Sikorski and Kolakowska, 1994) and lipid oxidation enhancement (Mackie, 1993) and as being strongly related with off-odor development (Refsgaard *et al.*, 2000). Additionally, FFA have shown to develop a bigger oxidation rate than higher molecular-weight lipid classes such as triglycerides and phospholipids as a result of providing a lower steric hindrance to the initial development of the oxidation mechanism (Labuza, 1971).

### 3.3. Quality loss assessment by non-lipid chemical indexes

During post-mortem fish storage, muscle nucleotides are known to degrade in a series of stages as a result of endogenous biochemical changes; the level of major adenine nucleotides and their related compounds have been used extensively as an index of freshness (K value assessment) of fish muscle (Howgate, 2006). In the present research (Table 3), fish corresponding to all kinds of icing conditions showed a progressive K value increase with chilling time, in agreement with previous research where this fish species was stored under traditional icing conditions (Losada *et al.*, 2005). However, no differences (p>0.05) as a result of the icing system employed could be observed in the actual study. It is concluded that, under the present conditions, the presence of the organic

Table 3  
K value and pH assessment\* in chilled horse mackerel kept under different icing conditions\*\*

Chilling Time (days)	K Value			pH		
	C	P-1	P-2	C	P-1	P-2
4	14.00 (0.99)	15.24 (0.56)	15.00 (1.20)	6.61 (0.11)	6.49 (0.10)	6.57 (0.01)
7	21.57 (1.66)	23.09 (0.79)	20.95 (3.20)	6.48 (0.09)	6.50 (0.10)	6.46 (0.03)
11	37.41 (2.44)	40.94 (2.22)	39.21 (1.30)	6.96 (0.13)	6.88 (0.05)	6.86 (0.24)
13	44.66 (1.66)	43.81 (1.22)	43.03 (0.97)	7.12 (0.02)	7.15 (0.07)	7.07 (0.08)

\* Mean values of three independent determinations (n = 3); standard deviations are indicated in brackets. Starting fish values: 7.38±0.57 (K value) and 6.37±0.10 (pH). No significant differences (p>0.05) could be observed as a result of the icing condition.

\*\* Abbreviations of icing conditions as expressed in Table 1.

acid mixture has no effect on the muscle nucleotide degradation. On the contrary, previous research has shown a great influence of storage temperature on the K value when comparing traditional flake ice and slurry ice conditions (Piñeiro *et al.*, 2004; Losada *et al.*, 2005; Lago *et al.*, 2010).

The pH value showed, with some exceptions, a progressive increase with chilling time in all fish batches (Table 3), according to previous research (Mendes, 1999; Rodríguez *et al.*, 2005). Such increase would suggest a more intense growth of alkalinizing bacteria, leading to a higher accumulation of ammonia compounds. However, no differences (p>0.05) as a result of the icing conditions employed could be observed. In spite of the fact that pH value is considered a dependable spoilage index, its assessment in the present research was not suitable for showing quality differences among the different kinds of fish samples under study.

### 3.4. Sensory analysis

Sensory acceptance results can be shown in Table 4. In all cases, a progressive quality decrease

was detected by the panel with chilling time for all kinds of fish samples. Control fish and fish corresponding to P-1 condition have led to a shelf life time of 7 days, according to previous research related to horse mackerel kept under traditional flake ice conditions (Simeonidou *et al.*, 1997; Aubourg, 2001). However, individuals corresponding to the highest acid content condition (P-2) were still acceptable at day 11. As a result, a preserving effect of this kind of icing medium is concluded for the sensory attributes, so that a longer shelf life time is attained. For all kinds of fish samples, features that limited the acceptability of horse mackerel were eye appearance, external and flesh (both in raw and cooked conditions) odors and gill appearance.

According to sensory analysis results, the P-2 condition has shown a stronger preservative effect than in the case of analyzing the chemical quality indexes, including the lipid indexes. Since organic acids applied in the present research have been reported to have antimicrobial properties in addition to antioxidant ones (Erkan, 2003; Kilinc *et al.*, 2009), an antimicrobial effect would have been likely to occur by employment of this condition, leading to a remarkable sensory quality retention.

Table 4  
Evolution of sensory acceptance\* in chilled horse mackerel kept under different icing conditions\*\*

Chilling Time (days)	Icing Condition		
	C	P-1	P-2
4	A <sup>b</sup>	A <sup>b</sup>	E <sup>a</sup>
7	B <sup>b</sup>	A <sup>a</sup>	A <sup>a</sup>
11	C <sup>b</sup>	C <sup>b</sup>	B <sup>a</sup>
13	C	C	C

\* Quality categories: E (excellent), A (good), B (fair) and C (unacceptable). Starting fish was category E. For each chilling time, mean values followed by different superscript letters (a, b) indicate significant (p<0.05) differences as a result of the icing condition.

\*\* Abbreviations of icing conditions as expressed in Table 1.

#### 4. FINAL REMARKS

Assurance of both high acceptability and nutritional values of chilled seafood is currently an important challenge for fish traders and food technologists, so that commercial requirements are always related to the search for valuable and practical technologies that may provide enhancing possibilities of quality retention.

In the present research, icing systems including a mixture of natural organic acids were tested and applied during horse mackerel chilling storage. According to lipid oxidation (peroxide and TBARS formation) assessment, a slight inhibitory effect ( $p < 0.05$ ) was concluded as a result of the presence of the acid mixture. However, no effect ( $p > 0.05$ ) of the acid presence in the icing system could be outlined on the nucleotide degradation and the FFA formation. In addition, no differences could be concluded between P-1 and P-2 treatments, when analyzing the results obtained on chemical quality indexes.

P-2-treated fish showed a longer shelf life time than their counterparts belonging to P-1 and control conditions. According to the sensory analysis results, P-2 condition has shown a stronger preservative effect than in the case of analyzing the chemical quality indexes. Since organic acids applied in the present research have been reported to have antimicrobial properties in addition to antioxidant ones (Erkan, 2003; Kilinc *et al.*, 2009), an antimicrobial effect would have been likely to occur under this condition, so that a remarkable sensory quality retention was attained. In this sense, the surface wash caused by the melting of the ice during storage and the subsequent antioxidant and antimicrobial effects of such acids on the fish skin can be invoked as the main reasons for the lower damage development found in the acid-treated horse mackerel muscle.

Similar results had been reported before for other preservation methods such as liquid ice (Piñeiro *et al.*, 2004; Aubourg *et al.*, 2010), where ice melting led to the release of salt that exerted a preserving effect on fish and in experiences where a washing step including a preserving aqueous solution is applied before further refrigeration or frozen storage of the fish material (Richards *et al.*, 1998; Erkan, 2003).

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Mr. Marcos Trigo and Mrs. Cristina Nine for their excellent technical assistance. This work was supported by the Secretaría Xeral de I+D from the Xunta de Galicia (Galicia, Spain) through the Research Project PGIDIT 10 TAL 402001PR.

#### REFERENCES

Ashie I, Smith J, Simpson B. 1996. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **36**, 87-121.

- Aubourg S, Álvarez V, Pena J. 2010. Lipid hydrolysis and oxidation in farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) slaughtered and chilled under different icing conditions. *Grasas Aceites*, **61**, 183-190.
- Aubourg S, Pérez-Alonso F, Gallardo J. 2004. Studies on rancidity inhibition in frozen horse mackerel (*Trachurus trachurus*) by citric and ascorbic acids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **106**, 232-240.
- Aubourg S, Ugliano M. 2002. Effect of brine pre-treatment on lipid stability of frozen horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *Eur. Food Res. Technol.* **215**, 91-95.
- Aubourg S. 2001. Damage detection in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) during chilled storage. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **78**, 857-862.
- Aubourg, S. 1999. Effect of lipid damages on processed fish quality. *Grasas Aceites* **50**, 218-224.
- Badii F, Howell N. 2002. Effect of antioxidants, citrate, and cryoprotectants on protein denaturation and texture of frozen cod (*Gadus morhua*). *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2053-2061.
- Bligh E, Dyer W. 1959. A rapid method of total extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917.
- Chaouqy NE, Gallardo JM, El Marrakchi A, Aubourg S. 2008. Lipid damage development in anchovy (*Engraulis encrasicolus*) muscle during storage under refrigerated conditions. *Grasas Aceites* **59**, 309-315.
- Chapman R, McKay J. 1949. The estimation of peroxides in fats and oils by the ferric thiocyanate method. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **26**, 360-363.
- Council Regulations. 1989. Baremo de clasificación de frescura. In: Diario Oficial de las Comunidades Europeas, nº L 5/21, pp. 5-6. European Communities, Brussels, Belgium.
- Erkan N. 2003. Treatment of fillets (*Scomber colias* and *Mugil cephalus*) with sodium lactate and propyl gallate: influence on shelf life and quality. *Archiv für Lebensmittelhygiene.* **54**, 60-63.
- Eymard S, Jacobsen C, Baron C. 2010. Assessment of washing with antioxidant on the oxidative stability of fatty fish mince during processing and storage. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 6182-6189.
- FAO. 2007a. Fishery statistics. Commodities. In *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Yearbook 2005*, Vol. **101**, pp. 134-135, 138-139, 152-153, 157-158, 174-175, 178, Rome, Italy.
- FAO. 2007b. Fishery statistics. Capture production. In *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Yearbook 2005*, Vol. **100/1**, pp. 247-248, Rome, Italy.
- Giese J. 1996. Antioxidants: Tools for preventing lipid oxidation. *Food Technol.* **50**, 73-80.
- Gogus U, Bozoglu F, Yurdugul, S. 2006. Comparative effects of lactic acid, nisin, coating combined and alone applications on some postmortem quality criteria of refrigerated *Sardina pilchardus*. *J. Food Qual.* **29**, 658-671.
- Howgate P. 2006. A review of the kinetics of degradation of inosine monophosphate in some species of fish during chilled storage. *Int. J. Food Sci. Technol.* **41**, 341-353.
- Kilinc B, Cakli S, Dincer T, Tolasa S. 2009. Microbiological, chemical, sensory, color, and textural changes of rainbow trout fillets treated with sodium acetate, sodium lactate, sodium citrate, and stored at 4°C. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* **18**, 3-17.
- Kim C, Hearnberger J, Eun J. 1995. Gram-negative bacteria in refrigerated catfish fillets treated with lactic culture and lactic acid. *J. Food Prot.* **58**, 639-643.

- Labuza T. 1971. Kinetics of lipid oxidation in foods. *CRC Crit. Rev. Food Technol.* **2**, 355-405.
- Lago H, Pena J, Aubourg S. 2010. Effect of slaughtering conditions on lipid damage of chilled farmed turbot (*Psetta maxima*) muscle. *Grasas Aceites*, **61**, 312-320.
- Losada V, Piñeiro C, Barros-Velázquez J, Aubourg S. 2005. Inhibition of chemical changes related to freshness loss during storage of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in slurry ice. *Food Chem.* **93**, 619-625.
- Lowry R, Tinsley I. 1976. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **53**, 470-472.
- Lugasi A, Losada V, Hóvári J, Lebovics V, Jakóczy I, Aubourg S. 2007. Effect of pre-soaking whole pelagic fish in a plant extract on sensory and biochemical changes during subsequent frozen storage. *Food Sci. Technol.* **40**, 930-936.
- Mackie I. 1993. The effects of freezing on flesh proteins. *Food Rev. Internat.* **9**, 575-610.
- Madrid A, Madrid J, Madrid R. 1994. Chilling, freezing and ultra-freezing of fish and derivatives in Madrid A (Ed.) *Technology of fish and its derivatives*, pp. 45-103. AMV Ediciones y Mundi-Prensa Libros, S. A., Madrid, Spain.
- Mendes R, Alves Silva H, Nunes ML, Abecassis Empis J. 2005. Effect of low-dose irradiation and refrigeration on the microflora, sensory characteristics and biogenic amines of Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *Eur. Food Res. Technol.* **221**, 329-335.
- Mendes R. 1999. Changes in biogenic amines of major Portuguese bluefish species during storage at different temperatures. *J. Food Biochem.* **23**, 33-43.
- Metin S, Erkan N, Varlik C, Aran N. 2001. Extension of shelf life of chub mackerel (*Scomber japonicus* Houttuyn 1780) treated with lactic acid. *Eur. Food Res. Technol.* **213**, 174-177.
- Olafsdóttir G, Martinsdóttir E, Oehlenschläger J, Dalgaard P, Jensen B, Undeland I, Mackie I, Henahan G, Nielsen J, Nielsen H. 1997. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends Food Sci. Technol.* **8**, 258-265.
- Ozen B, Floros J. 2001. Effects of emerging food processing techniques on the packaging materials. *Trends Food Sci. Technol.* **12**, 60-67.
- Pazos M, Alonso A, Sánchez I, Medina I. 2008. Hydroxytyrosol prevents oxidative deterioration in foodstuffs rich in fish lipids. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 3334-3340.
- Piñeiro C, Barros-Velázquez J, Aubourg S. 2004. Effects of newer slurry ice systems on the quality of aquatic food products: a comparative review versus flake-ice chilling methods. *Trends Food Sci. Technol.* **15**, 575-582.
- Pourashouri P, Shabanpour B, Aubourg S, Daghigh Rohi J, Shabani A. 2009. An investigation of rancidity inhibition during storage of Wels catfish (*Silurus glanis*) fillets by previous ascorbic and citric acid treatment. *Int. J. Food Sci. Technol.* **44**, 1503-1509.
- Refsgaard H, Brockhoff P, Jensen B. 2000. Free polyunsaturated fatty acids cause taste deterioration of salmon during frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3280-3285.
- Richards M, Kelleher S, Hultin H. 1998. Effect of washing with or without antioxidants on quality retention of mackerel fillets during refrigerated and frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4363-4371.
- Rodríguez O, Losada V, Aubourg S, Barros-Velázquez J. 2005. Sensory, microbial and chemical effects of a slurry ice system on horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *J. Sci. Food Agric.* **85**, 235-242.
- Ryder J. 1985. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **33**, 678-680.
- Sallam KI. 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*, **18**, 566-575.
- Sánchez-Alonso I, Jiménez-Escrig A, Saura-Calixto F, Borderías AJ. 2007. Effect of grape antioxidant dietary fibre on the prevention of lipid oxidation in minced fish: Evaluation by different methodologies. *Food Chem.* **101**, 372-378.
- Shigemura Y, Ando M, Tsukamasa Y, Makinodan Y, Kawai T. 2003. Correlation of type V collagen content with post-mortem softening of fish meat during chilled storage. *Fish. Sci.* **69**, 842-848.
- Sikorski Z, Kolakowska A. 1994. Changes in protein in frozen stored fish in Sikorski Z, Sun Pan B, Shahidi F (Eds.) *Seafood proteins*, pp. 99-112. Chapman and Hall, New York, USA.
- Simeonidou S, Govaris A, Varelziz K. 1997. Effect of frozen storage on the quality of whole fish and fillets of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) and Mediterranean hake (*Merluccius mediterranean*). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **204**, 405-410.
- Sivertsvik M, Jeksrud W, Rosnes T. 2002. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products - significance of microbial growth, activities and safety. *Int. J. Food Sci. Technol.* **37**, 107-127.
- Slattery S, Forrest A. 2006. Evaluation of three storage systems used for chilling and holding swordfish. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* **15**, 53-74.
- Smith J, Hardy R, McDonald I, Templeton J. 1980. The storage of herring (*Clupea harengus*) in ice, refrigerated sea water and at ambient temperature. Chemical and sensory assessment. *J. Sci. Food Agric.* **31**, 375-385.
- Toledo-Flores L, Zall R. 1992. Methods for extending the storage life of fresh tropical fish in Flick G, Martin R (Eds.) *Advances in Seafood Biochemistry*, pp. 233-243. Technomic Publishing, Lancaster, PA, USA.
- Vyncke W. 1970. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette Seifen Anstrichm.* **72**, 1084-1087.
- Whittle K, Hardy R, Hobbs G. 1990. Chilled fish and fishery products in Gormley T. (Ed.) *Chilled foods: The state of the art*, pp. 87-116. Elsevier Applied Science, New York, USA.

Recibido: 11/3/11  
Aceptado: 12/4/11



## **CAPÍTULO 5: Efecto de distintos sistemas de hielo sobre el desarrollo de la alteración lipídica en el músculo de jurel (*Trachurus trachurus*) refrigerado**

Continuando con el estudio de la aplicación de ácidos orgánicos como sistema de refrigeración para productos de la pesca, especificado en la parte 3 de este trabajo de investigación, en este capítulo se procedió a la evaluación de las concentraciones adecuadas (0,005 y 0,020 %; p/v) de una mezcla de ácidos orgánicos (cítrico, ascórbico, láctico) como sistema de conservación para el jurel (*Trachurus trachurus*).

### **Análisis lipídico**

El contenido de lípidos en el músculo del pescado blanco estuvo en el rango de 1,0 y 2,5%. Las diferencias observadas pueden atribuirse a la variabilidad individual de los individuos y no a las condiciones de enfriamiento o al tiempo de almacenamiento. El rango de valores obtenido se corresponde con el de especies de pescado semi-grasas, estando de acuerdo con investigaciones anteriores para la misma especie (Aubourg, 2001; Losada y col., 2005).

El desarrollo de oxidación lipídica se evaluó analizando la formación de peróxidos (oxidación primaria), TBARS (oxidación secundaria) y compuestos fluorescentes (índice de FR, oxidación terciaria).

El desarrollo de peróxidos en el lote control mostró un incremento importante en el período del día 11 al día 13, siendo sus valores de 10,63 meq/ kg y 10,14 meq/kg, respectivamente. Sin embargo, durante ese período, el valor de peróxidos para el jurel conservado en hielo acidificado, (P-1 y P-2), se mantuvo por debajo de 7,0 meq/kg. De estos resultados se puede concluir, que la

presencia de ácidos en el medio de refrigeración produce un efecto inhibitor en cuanto a la formación de peróxidos, mientras que la concentración de los ácidos no pareció ejercer un efecto significativo.

El contenido en TBARS aumentó con el tiempo para los tres tipos de lotes de pescado procesado. Aun así, se observó un ligero efecto inhibitor ( $P < 0,05$ ) en el sistema de hielo P-2 (días 4 y 13) y en el sistema P-1 (día 13), como resultado de la presencia de ácido en el hielo.

La formación de compuestos de interacción entre lípidos oxidados y compuestos nucleofílicos se evaluó por determinación de fluorescencia. Este análisis mostró algunas diferencias en las primeras etapas del estudio (día 4 para las condiciones P-2 y día 7 para las condiciones P-1), en comparación con el lote control. Sin embargo, no se encontraron diferencias ( $P > 0,05$ ) en las últimas etapas del estudio (días 11 a 13), cuando se esperaba un mayor contenido en los compuestos de oxidación terciaria, como resultado del mayor desarrollo de compuestos de oxidación primaria y secundaria.

En lo que respecta al desarrollo de la hidrólisis de lípidos, no se hallaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre lotes. De hecho, la formación de ácidos grasos libres fue relativamente baja a lo largo del estudio, en comparación con las investigaciones previas de almacenamiento de jurel en hielo tradicional en escamas (Aubourg, 2001; Losada y col., 2005). Sin embargo, se ha detectado en el músculo del jurel un importante desarrollo de hidrólisis lipídica durante su almacenamiento congelado como resultado de la actividad enzimática endógena (Aubourg & Ugliano, 2002; Lugasi y col., 2007).

La formación de AGL en sí no conduce a pérdidas nutricionales. Sin embargo, la presencia de AGL ha demostrado tener un papel importante sobre los cambios de textura del músculo de pescado (Sikorski & Kolakowska, 1994) y sobre la oxidación de lípidos (Mackie, 1993). Asimismo, la formación de AGL genera olor desagradable (Refsgaard y col., 2000). Finalmente, los AGL muestran una cinética de oxidación mayor que moléculas lipídicas de alto peso molecular como triglicéridos y fosfolípidos, como resultado del menor impedimento estérico para el desarrollo inicial de la reacción de oxidación (Labuza, 1971).

### **Análisis químicos no lipídicos**

La evaluación de la pérdida de la calidad se realizó, además, empleando índices químicos no lipídicos, teniendo en cuenta que durante el almacenamiento post-mortem del pescado los nucleótidos del músculo se degradan en una serie de etapas como resultado de mecanismos autolíticos. La concentración de los nucleótidos trifosfato ha sido utilizada como un índice de frescura (evaluación del valor K) del músculo de pescado (Howgate, 2006).

En el presente estudio, todas las muestras reflejaron un aumento progresivo del valor K a medida que transcurrió el tiempo de almacenamiento, lo que concuerda con investigaciones previas realizadas en esta especie almacenada en hielo tradicional (Losada y col., 2005). Sin embargo, en nuestro estudio no hubo diferencias ( $P > 0,05$ ) derivadas del empleo de distintos tipos de hielo.

El valor de pH experimentó, con algunas excepciones, un aumento progresivo a medida que progresó el tiempo de almacenamiento en todos los lotes, lo que concuerda con estudios anteriores (Mendes, 1999; Rodríguez y col., 2005). Este aumento sugiere una notable actividad de bacterias alcalinizantes,

dando lugar a una mayor acumulación de compuestos nitrogenados. Sin embargo, se puede observar que no hubo diferencias ( $P > 0,05$ ) entre lotes. A pesar del hecho de que el valor de pH se considera un índice de deterioro de confianza, su evaluación en la presente investigación no resultó ser adecuado para mostrar las diferencias de calidad entre los diferentes lotes de pescado objeto de estudio.

#### **Análisis sensorial**

Los resultados del análisis sensorial demostraron, para todos los individuos, un deterioro progresivo de la calidad a medida que transcurrió el almacenamiento. Los especímenes control y los correspondientes al lote P-1, exhibieron un tiempo de vida útil de 7 días, de acuerdo con investigaciones previas relacionadas con jurel sometido a condiciones de hielo tradicional en escamas (Simeonidou y col., 1997; Aubourg, 2001). Sin embargo, los individuos pertenecientes a las condiciones donde la concentración de ácidos fue mayor (lote P-2), continuaron siendo aceptables a día 11.

Los resultados de los atributos sensoriales confirmaron el efecto conservante de este tipo de hielo, consiguiendo una extensión de su vida útil. Las características limitantes de todas las muestras de pescado resultaron ser el aspecto de los ojos, el olor externo y en el músculo (tanto en crudo como en cocido) y la apariencia de las branquias. De acuerdo con los resultados del análisis sensorial, las condiciones P-2 han reflejado un efecto más marcado de conservación que en el caso de los índices químicos de calidad, incluyendo los índices de lípidos.

Dado que los ácidos orgánicos aplicados en este estudio han sido descritos como poseedores de propiedades antimicrobianas además de antioxidantes (Erkan, 2003; Kilinc y col, 2009), es probable que debido al empleo de estas condiciones ácidas, se haya producido un efecto antimicrobiano, caracterizado por una notable retención de la calidad sensorial.



**CAPÍTULO 6:**

**Microbial activity inhibition in chilled mackerel (*Scomber scombrus*) by employment of an organic acid-icing system.**

**Inhibición de la actividad microbiana en caballa (*Scomber scombrus*) refrigerada mediante el empleo de un sistema de hielo que incluye ácidos orgánicos naturales.**



# Microbial Activity Inhibition in Chilled Mackerel (*Scomber Scombrus*) by Employment of an Organic Acid-Icing System

Minia Sanjuás-Rey, José M. Gallardo, Jorge Barros-Velázquez, and Santiago P. Aubourg

**Abstract:** The present study concerns Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) traded as a chilled product. The study was aimed to investigate the effect of including a mixture of organic acids (citric, ascorbic, and lactic) in the icing medium employed during the fish chilled storage. To this end and according to preliminary trials results, an aqueous solution including 0.050% (w/v) of each acid was employed as icing medium; its effect on the microbial activity development in mackerel muscle was monitored for up to 13 d of chilled storage and compared to a counterpart-fish batch kept under traditional water ice considered as control. Results indicated a lower bacterial growth in mackerel muscle subjected to storage in the organic acid-icing system by comparison with control fish. Thus, statistically-significant ( $P < 0.05$ ) differences between both batches for all 6 microbial groups investigated (aerobes, anaerobes, psychrotrophes, Enterobacteriaceae, lipolytics, and proteolytics) and for 2 chemical indices related to microbial activity development (total volatile bases and trimethylamine) were obtained. The surface wash caused by the melting of the ice during storage and the subsequent antimicrobial effect of such acids on skin microflora of the fish can be invoked as the main reasons for the limited bacterial growth found in the corresponding mackerel muscle.

**Keywords:** ascorbic, chilling, citric, lactic, microbial activity, *Scomber scombrus*

**Practical Application:** Among natural antioxidants, citric, ascorbic, and lactic acids are low molecular weight organic compounds that represent a relevant choice because of their easy availability, low commercial cost, and wide range of permitted concentrations for their use in foods. Present results obtained by their inclusion in a novel icing system have led to a lower microbial development in chilled mackerel when compared to its counterpart fish kept under traditional icing conditions. Such a finding indicated that inclusion of this acid mixture in the icing medium can lead to a marked quality and safety enhancement as well as to profitable commercial value increases.

## Introduction

Maintaining good quality and shelf life extension of fresh fish are nowadays mandatory. Flake ice has been the most employed method to cool and store fish products and partially inhibit detrimental effects on the commercial value. However, significant deterioration of sensory quality and nutritional value has been detected in chilled fish as a result of microbial and biochemical degradation mechanisms (Whittle and others 1990). To retard fish spoilage as long as possible, a wide number of preservative strategies to be combined to flake ice chilling have been tested satisfactorily such as chemical (washing or dipping by means of an aqueous solution including preservative compounds) and physical (hydrostatic high pressure, low-dose irradiation, and so on) treatments (Ashie and others 1996; Richards and others 1998) and employment of preservative packaging (Ozen and Floros 2001).

Among previous chemical treatments to chilling storage, natural low molecular weight organic acids and their sodium salts have shown to represent a relevant choice because of their easy availability, low commercial cost and wide range of permitted concentrations for their use. Thus, ascorbic and citric acids (AA and CA, respectively) are widely known for their role as chelators, acidulants in biological systems and synergists of primary antioxidants, so that a profitable effect on fish fillets (Badii and Howell 2002; Pourashouri and others 2009) and whole fish (Aubourg and others 2004) has been observed. Further, lactic acid (LA) has been reported to be effective in suppressing Gram-negative bacteria, which are known to be the most important fish spoiler group; thus, LA pre-treatment has shown to be effective in preserving and extending shelf life in fish fillets (Kim and others 1995; Metin and others 2001), coated fish (Gogus and others 2006), and fish slices (Sallam 2007).

Small pelagic fatty fish species can constitute food products of great economic importance in many European countries (FAO 2007a). Some of these fish species are captured in high proportions when their demand is relatively low, so that a large portion of their catches is underutilized and transformed into fish meals for animals. Thus, great attention is being accorded by manufacturers in the search of appropriate technological treatments that may

MS 20110804 Submitted 7/4/2011, Accepted 2/8/2012. Authors Sanjuás-Rey and Barros-Velázquez are with Dept. of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences, Univ. of Santiago de Compostela, Lugo, Spain. Authors Gallardo and Aubourg are with Dept. of Food Technology, Marine Research Inst. (CSIC), Vigo, Spain. Direct inquiries to author Aubourg (E-mail: saubourg@iim.csic.es).

2  
3 increase their shelf life and accordingly, their trading value. One  
4 such abundant species at both North Atlantic coasts is Atlantic  
5 mackerel (*Scomber scombrus*) belonging to the *Scombridae* family  
6 (FAO 2007b). Although it is recognized as a healthy food, it re-  
7 mains underutilized because of its short chilled shelf life (up to  
8 9 to 10 d). Most research has been focused on the assessment of  
9 lipid hydrolysis and oxidation as these are the most relevant mech-  
10 anisms of quality loss during mackerel chilling storage (Decker  
11 and Hultin 1990; Saeed and Howell 2001). In this sense, different  
12 technologies have been checked to partially inhibit them (Hwang  
13 and Regenstein 1995; Richards and others 1998). However, chilling  
14 storage of mackerel has shown an important microbial activity  
15 (Jhaveri and others 1982; Bennour and others 1991), so that great  
16 efforts should also be directed to the inhibition of this damage  
17 pathway.

18 The present study concerns mackerel traded as a chilled product.  
19 The study was aimed to investigate the effect of including a mixture  
20 of organic acids in the icing medium employed. To this end, an  
21 aqueous solution including CA, AA, and LA was employed as  
22 icing medium; its effect on microbial activity development was  
23 monitored in mackerel muscle for up to 13 d of chilled storage.

## 24 Material and Methods

### 25 Icing systems

An aqueous solution containing 0.050% (w/v) of each natural  
organic acid (CA, AA, and LA) was prepared, packed in polythene  
bags and kept frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Traditional ice was  
prepared starting only from water that was packed and kept frozen  
in the same way as the one including the organic acid mixture.  
Before addition to individual fishes, the different ices were ground  
to obtain common flakes. Organic acids encountered in the present  
research are generally regarded as safe (GRAS) for use in foods  
according to European and American administrations (Madrid  
and others 1994; Giese 1996).

Preliminary trials were carried out to assess a convenient con-  
centration of the organic acid mixture used to prepare the ice.  
Thus, a solution combining the 3 organic acids in the 0.005% to  
0.250% concentration range was preliminary evaluated. According  
to results obtained on the visual analysis of individual fishes, the  
0.050% concentration was chosen as the most suitable for further  
investigation.

### 46 Raw fish, processing, and sampling

47 Fresh mackerel (81 individuals) were caught near the Galician  
48 Atlantic coast (north-western Spain) in Autumn 2010 and trans-  
49 ported on ice to the laboratory. The length and weight of the fish  
50 specimens were included in the following ranges: 21 to 25 cm and  
51 175 to 230 g, respectively.

52 Upon arrival in the laboratory, 9 individual fishes were separated  
53 and analyzed as starting raw fish (day 0); for it, 3 different groups  
54 (3 individuals per group) were analyzed independently to achieve  
55 the statistical analysis ( $n = 3$ ). The remaining fish were divided into  
56 2 batches (36 individuals in each batch). The first batch (preserved  
57 fish; P batch) was placed in boxes and directly surrounded by  
58 ice prepared with the organic acid-mixture previously mentioned.  
59 Fish corresponding to the second batch (control batch; C batch)  
60 was placed in boxes and surrounded by traditional ice prepared  
61 with water.

62 In both batches, a 1 : 1 fish-to-ice ratio was employed. Both  
63 batches were placed in a refrigerated room ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Boxes employed  
64 allowed draining and ice was renewed when required. Fish samples

from the 2 different batches were taken for analysis on days 3, 6, 10,  
and 13. At each sampling time, 9 individuals of each batch were  
taken for analysis, being considered into 3 groups (3 individuals  
in each group) that were studied independently to achieve the  
statistical analysis ( $n = 3$ ).

### Microbial analysis

Samples of 10 g of fish muscle were dissected aseptically from  
chilled fish specimens, mixed with 90 mL of 0.1% peptone wa-  
ter (Merck, Darmstadt, Germany), and homogenized in sterilized  
stomacher bags (AES, Combourg, France) as previously described  
(Ben-Gigirey and others 1998, 1999). In all cases, serial dilutions  
from the microbial extracts were prepared in 0.1% peptone water.

Total aerobes were investigated by surface inoculation on plate  
count agar (PCA, Oxoid Ltd., London, U.K.), after incubation  
at  $30^{\circ}\text{C}$  for 48 h. Psychrotrophes were also investigated in PCA  
but incubation was carried out at  $7$  to  $8^{\circ}\text{C}$  for 7 d. Enter-  
obacteriaceae were investigated by pour plating using Violet Red  
Bile Agar (VRBA) (Merck, Darmstadt, Germany) after incuba-  
tion at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h. Microorganisms exhibiting a proteolytic or  
lipolytic phenotype were investigated in casein-agar medium or  
tributyryl-agar, respectively, after incubation at  $30^{\circ}\text{C}$  for 48 h, as  
previously described by Ben-Gigirey and others (2000).

In all cases, bacterial counts were transformed into log CFU/g  
muscle before undergoing statistical analysis. All analyses were  
done by triplicate.

### Chemical analysis of microbial activity

Total volatile base-nitrogen (TVB-N) values were measured as  
previously reported (Aubourg and others 1997). Briefly, fish mus-  
cle (10 g) was extracted with 6% perchloric acid (30 mL) and  
brought up to 50 mL. An aliquot of the acid extracts was rendered  
alkaline to pH 13 with 20% NaOH and then steam-distilled.  
Finally, the TVB-N content was determined by titration of the  
distillate with 10 mM HCl. Results were expressed as mg TVB-  
N/100 g muscle.

Trimethylamine-nitrogen (TMA-N) values were determined by  
the picrate method, as previously described by Tozawa and others  
(1971). This involves the preparation of a 5% trichloroacetic acid  
extract of fish muscle (10 g/25 mL). Results were expressed as mg  
TMA-N/100 g muscle.

### Statistical analysis

Data obtained from the different microbial and chemical analyses  
were subjected to the analysis of variance (ANOVA) method ( $P <$   
 $0.05$ ) to explore differences by 2 different ways: icing conditions  
effect and chilling time effect. For it, the PASW Statistics 18 soft-  
ware for Windows (SPSS Inc., Chicago, Ill., U.S.A.) was employed.  
The comparison of means was performed using the least-squares  
difference (LSD) method. Correlation analysis among parameters  
(chilling time, microbial indices and chemical values) was carried  
out by means of the Pearson correlation coefficient ( $r$ -value).

## Results and Discussion

### Microbial count analysis

The development of aerobic bacteria was significantly ( $P <$   
 $0.05$ ) slowed down in the batch submitted to the organic acid-  
icing system, as compared to the control batch (Table 1). Thus,  
the differences in the microbial numbers reached its maximum,  
more than 2 log units, at day 6 of storage, while the average dif-  
ference for aerobic mesophiles throughout storage was 1.18 log

units. Remarkably, the control batch stored in traditional ice for 13 d reached levels above  $10^7$  CFU/g. Bennour and others (1991) and Gram and Huss (1996) reported aerobic count to be the breakpoint for relevant microbial spoilage (Gram and Huss 1996). On contrast, the aerobic counts in the batch preserved with organic acids were round  $10^6$  CFU/g at that time (Table 1). Aerobe counts as high as  $10^7$  CFU/g have been reported in the skin of horse mackerel stored for 7 d at 4 °C (Kuda and others 1996). This result is quite in agreement with our results and that underscores the microbial inhibition exerted by the organic acid-icing system. In the present research, both fish batches showed fair correlation values between aerobic counts and chilling time ( $r = 0.93$  and  $0.84$  for C- and P-fish, respectively; Table 2).

With respect to the development of anaerobic bacteria, significant ( $P < 0.05$ ) advantages derived from the use of the organic acid-icing system were also observed (Table 1). Thus, the average differences between batches C and P in the anaerobic counts throughout storage were higher than 2 log units, which means that the slowing down of anaerobic bacterial growth was over 99%. Furthermore, final counts after 13 d of storage differed in more than 3.60 log units, which clearly indicates a remarkably better control of anaerobes growth as a result of the storage in the organic acid-icing system. Correlation value between aerobic counts and chilling time was only good in the case of the C batch ( $r = 0.93$ ; Table 2).

**Table 1—Aerobe, anaerobe, and psychrotrophe count (log CFU/g muscle) assessment<sup>a</sup> in chilled mackerel kept under different icing conditions.<sup>b</sup>**

Chilling Time (d)	Aerobes		Anaerobes		Psychrotrophes	
	C	P	C	P	C	P
Raw fish	3.31C (0.08)	3.31B (0.08)	1.97D (0.85)	1.97AB (0.85)	3.26C (0.37)	3.26B (0.37)
3	3.41BC (0.65)	3.12B (0.19)	3.33C (0.60)	2.79A (0.70)	4.02BC (0.61)	3.16B (1.02)
6	4.21aB (0.37)	2.20bC (0.17)	3.50aC (0.41)	1.99bB (0.05)	4.85B (0.30)	3.77B (1.06)
10	6.44aA (0.45)	5.34bA (0.52)	4.57aB (0.43)	1.99bB (0.05)	7.06aA (0.37)	5.74bA (0.45)
13	7.28aA (0.32)	6.05bA (0.77)	5.68aA (0.44)	1.99bB (0.05)	7.93aA (0.50)	6.43bA (0.51)

<sup>a</sup>Mean values of 3 replicates ( $n = 3$ ); standard deviations are indicated in brackets. For each parameter and for each chilling time, mean values followed by different low-case letters (a, b) indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences as a result of the icing condition. For each parameter and for each icing condition, values followed by different capital letters (A to D) denote significant ( $P < 0.05$ ) differences as a result of the chilling time. No letters are indicated when significant differences are not found ( $P > 0.05$ ).

<sup>b</sup>Abbreviations of icing conditions: P (ice including the organic acid-mixture) and C (ice prepared only from water).

**Table 2—Correlation coefficient ( $r$ -value)<sup>A</sup> between the chilled storage time and the different parameters analyzed in chilled mackerel kept under different icing conditions.<sup>B</sup>**

Quality parameter	$r$ -value	
	C	P
Aerobes	0.93 <sup>b</sup>	0.84 <sup>b</sup>
Anaerobes	0.93 <sup>a</sup>	-0.39 <sup>b</sup>
Psychrotrophes	0.94 <sup>a</sup>	0.93 <sup>b</sup>
Enterobacteriaceae	0.79 <sup>b</sup>	0.87 <sup>b</sup>
Lipolytics	0.93 <sup>b</sup>	0.80 <sup>b</sup>
Proteolytics	0.89 <sup>a</sup>	0.69 <sup>c</sup>
Total volatile base-nitrogen	0.91 <sup>b</sup>	0.79 <sup>b</sup>
Trimethylamine-nitrogen	0.93 <sup>b</sup>	0.95 <sup>b</sup>

<sup>A</sup>For each index, linear<sup>a</sup>, quadratic<sup>b</sup> and logarithmic<sup>c</sup> fittings were studied. In each case, the best correlation coefficient value is expressed.

<sup>B</sup>Abbreviations of icing conditions as expressed in Table 1.

The comparative analysis of psychrotrophe counts indicated significant ( $P < 0.05$ ) differences among batches after 10 d of storage (Table 1). The development of this microbial group was quite limited in both batches on early storage periods, with microbial numbers below 4.85 log CFU/g units until day 6, although the organic acid icing system provided a remarkable protective effect. Differences between batches increased on day 10, with the psychrotrophes higher than 7 log units on the control batch while the organic acid icing system exhibited values below 6 log units. Even a more significant effect was observed on day 13, although both batches were above the 6 log CFU/g units breakpoint of microbial spoilage. The average differences between batches during the whole storage period rose to 1.17 log units, this indicating a remarkable slowing down of the growth of this bacterial group in the organic acid-icing system. Moreover, as storage progressed higher differences in the psychrotrophe counts were achieved, these reaching its maximum at day 13; at this time (day 13), a difference of 1.50 log units between batches was observed. As in the case of the aerobes, the psychrotrophes did not reach  $10^7$  CFU/g in the muscle of the fish specimens stored in the organic acid-icing system, while this value was clearly surpassed in the control batch. Both fish batches showed good correlation values between psychrotrophe counts and chilling time ( $r = 0.94$  and  $0.93$  for C- and P-fish, respectively; Table 2), according to previous research on chilled mackerel (Bennour and others 1991).

With respect to Enterobacteriaceae, the counts were below 1.5 log units for both batches until day 10 (Table 3). These results confirm the very good initial quality of the mackerel specimens employed and the limited growth of enteric bacteria during chilled storage, regardless of the ice system considered. Low numbers of Enterobacteriaceae had also been reported before by other researchers for related fish species such as horse mackerel (Rodríguez and others 2005) or jack mackerel (Figuerola and others 1990), subjected to storage on flake ice and slurry ice conditions. However, in our study, the counts for this bacterial group were similar in the organic acid-icing system than in the control batch except for advanced storage times (day 13), where a difference of 1.95 log units between batches was determined. However, the fact that the counts for this bacterial group were quite low up to day 10 (below 1.30 log CFU/g) and as a result of the ample standard deviation values obtained, no conclusion could be depicted related to any beneficial effect of the organic acid system up to day 10. The results also indicate a good control of this microbial group up to day 10 in both batches, this being probably related with the good hygienic practices and the rapid chilling of fish. However, on day 10 the microbial quality of the fish was at its limit, this leading to a rapid increase in the numbers of Enterobacteriaceae at day 13. According to this Enterobacteriaceae count distribution, fair correlation values with chilling time were only obtained for fish corresponding to the P batch ( $r = 0.87$ ; Table 2).

This study was also aimed at evaluating the effect of the organic acid-mixture on microbial groups exhibiting specific spoilage phenotypes. Thus, the development of bacteria able to produce extracellular lipolytic enzymes has been described to negatively affect the preservation of medium-fat fish species (Rodríguez and others 2005). Likewise, the inhibition of proteolytic bacteria, able to synthesize and secrete proteolytic enzymes, has also been linked to a better preservation of fish species, due to the limitation of the physical damage of the muscle structure also reducing the formation of alkaline compounds such as ammonia and related metabolites (Venugopal 1990; Odagami and others 1994; Makarios-Laham and Lee 1993; Rodríguez and others 2003). Accordingly, the

2  
3 inhibition of bacteria exhibiting lipolytic and/or proteolytic phenotypes may limit the negative effects of lipases and proteases on the quality of fish species, since these enzymes have always been characterized for retaining activity during long storage periods even under refrigeration temperatures (Alford and Pierce 1961).

4  
5  
6  
7  
8 With respect to the lipolytic bacteria, and as in the cases of other microbial groups studied before, significant ( $P < 0.05$ ) differences were determined between batches (Table 3). Thus, the average difference during storage was 1.41 log units, and reached its maximum at advanced stages of storage. Remarkably, differences of 1.25 and 2.73 log units were determined at 10 and 13 d of storage, respectively. According to these results, the growth of bacteria potentially involved in the lipolytic breakdown of mackerel was slowed down as a consequence of storage in the organic acid-icing system. Similar inhibition of lipolytic microorganisms was observed with other preservation methods such as ice slurries for other medium-fat and fat fish species like horse mackerel (Rodríguez and others 2005) and sardine (Campos and others 2005), respectively. Good correlation values between lipolytic counts and chilling time were only obtained for fish corresponding to the C batch ( $r = 0.93$ ; Table 2).

9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25 With respect to the proteolytic bacteria, a similar type of behavior was observed than in the case of lipolytic ones (Table 3). Thus, the counts of proteolytic bacteria in mackerel muscle stored in the organic acid-icing system did not reach levels of  $10^4$  CFU/g at any storage time, while the control batch exhibited values higher than  $10^5$  CFU/g after 10 d of storage. The average difference in the counts between batches throughout storage was 1.19 log units, and the growth inhibition was more intense as storage progressed, a result that is in agreement with those observed for the majority of the microbial groups studied before. As with lipolytic counts, proteolytic ones only provided fair correlation values with chilling time in the case of the C batch ( $r = 0.89$ ; Table 2).

26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48 A marked inhibitory effect of the novel icing system on several microbial groups investigated was observed, this being especially remarkable in the cases of the aerobes, anaerobes and lipolytic bacteria. The surface wash caused by the melting of the ice during storage and the subsequent antimicrobial effect of the organic acids on skin microflora of the fish can be invoked as the main reasons for the limited bacterial growth found in the corresponding mackerel muscle. Similar results had been reported before for other preservation methods such as ice slurries, where ice melting led to the release of salt that exerted a bacteriostatic effect on fish microflora (Rodríguez and others 2003, 2005; Campos and

others 2005). Moreover, previous studies on horse mackerel have confirmed the presence of *Proteus penneri* and *Staphylococcus xylosus* strains exhibiting remarkable lipolytic and proteolytic phenotype, and, to a lesser extent, *Proteus vulgaris*. The fact that the organic acid-icing system evaluated in this study significantly ( $P < 0.05$ ) slowed down the growth of proteolytic and lipolytic bacteria in mackerel muscle, stresses the benefits that such storage system may have on the maintenance of the quality of this fish species.

#### Chemical analysis of microbial activity

Microbial activity development was also measured by chemical indices. The TVB-N content showed a relatively high value ( $30.21 \pm 1.48$ ) for starting fish (Table 4); this value is found quite similar to the one obtained by Civera and others (1993) (31.9 mg/100 g muscle) but markedly higher than the values reported by Bennour and others (1991) and Fagan and others (2003). In this study (Table 4), a higher ( $P < 0.05$ ) TVB-N content in fish samples corresponding to the control batch could be observed when compared to preserved fish in the 6 to 13-d period. Volatile amine content showed a marked increase in the 10 to 13-d period for C-fish, this being in agreement with a previous report on chilled mackerel (Bennour and others 1991); in the case of the P-batch, a marked increase on volatile amine formation was only attained at the end of the experiment. As for aerobic count assessment, TVB-N values showed a mean value decrease in the P-fish batch in the 0 to 6-d period; this result can be explained as a result of the preservative effect of the organic acid presence in the ice and by a relatively low microbial activity at that period. Good correlation values between TVB-N content and chilling time were obtained for fish corresponding to the C batch ( $r = 0.91$ ; Table 2), according to the strong relationship between TVB-N content and freshness loss (Whittle and others 1990; Bennour and others 1991). Volatile amine compounds have been reported to be produced partially by means of endogenous enzyme activity, but mostly as a result of microbial development (Whittle and others 1990).

Initial fish showed low TMA-N values ( $0.07 \pm 0.04$ ; Table 4), this indicating the high freshness of the raw material employed. All fish specimens showed a progressive TMA-N content increase ( $P < 0.05$ ) with time regardless the icing system employed; such increase was specially marked at the end of storage, this also being in agreement with previous reports on chilled mackerel (Jhaveri and others 1982; Bennour and others 1991). As a result of this, good correlation values between TMA-N values and chilling time

49  
50  
51 **Table 3—Enterobacteriaceae, lipolytic, and proteolytic count (log CFU/g muscle) assessment<sup>a</sup> in chilled mackerel kept under different icing conditions.<sup>b</sup>**

Chilling Time (d)	Enterobacteriaceae		Lipolytics		Proteolytics	
	C	P	C	P	C	P
Raw fish	0.99B (0.01)	0.99B (0.01)	2.16D (0.28)	2.16AB (0.28)	2.09C (0.18)	2.09B (0.18)
3	0.99B (0.05)	0.99B (0.05)	3.32C (0.56)	2.85A (0.41)	3.51B (0.11)	3.16AB (1.01)
6	0.99B (0.05)	1.23AB (0.41)	3.30aC (0.52)	2.10bB (0.18)	3.10B (0.35)	2.76AB (0.69)
10	0.99B (0.05)	1.29AB (0.53)	4.81aB (0.07)	3.56bAB (1.15)	5.30aA (0.29)	3.78bA (1.09)
13	4.42aA (0.44)	2.47bA (0.93)	6.40aA (0.20)	3.67bAB (1.85)	5.51aA (0.52)	2.96bAB (1.48)

52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64 <sup>a</sup>Mean values of three replicates ( $n = 3$ ); standard deviations are indicated in brackets. For each parameter and for each chilling time, mean values followed by different low-case letters (a, b) indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences as a result of the icing condition. For each parameter and for each icing condition, values followed by different capital letters (A to D) denote significant ( $P < 0.05$ ) differences as a result of the chilling time. No letters are indicated when significant differences are not found ( $P > 0.05$ ).

<sup>b</sup>Abbreviations of icing conditions as expressed in Table 1.

were observed ( $r = 0.93$  and  $0.95$ , for C- and P-fish, respectively; Table 2). Such results are in agreement with previous research where TMA-N assessment showed to be an accurate index for assessing quality loss during mackerel chilling storage (Bennour and others 1991; Civera and others 1993), according to the strong relationship between TMA-N content and freshness loss (Whittle and other 1990). As for TVB-N value, trimethylamine has been reported to be produced mostly as a result of microbial development. Comparison between both kinds of icing conditions (Table 4) showed lower TMA-N mean values throughout the whole experiment as a result of employing the organic acid-mixture in the icing medium; such differences were found significant at the end of the experiment.

Relationship between chemical and microbial parameters was also analyzed in the present research (Table 5). Related to the control batch, better correlation values with microbial count assessments were obtained for TMA-N values ( $r = 0.84$  to  $0.92$ ) than for TVB-N scores ( $r = 0.78$  to  $0.89$ ). In this sense, previous research (Bennour and others 1991) showed that TMA-N content was profitable to classify the freshness degree of chilled mackerel (1st, 2nd, and 3rd grade would correspond to 0 to 1, 1 to 3, and 3 to 6 mg TMA-N/100 g muscle, respectively). In addition, a previous correlation study between TVB-N and TMA-N values and sensory acceptance in chilled mackerel concluded that this species was not suitable for consumption when both parameters were above 40 and 4 mg/100 g muscle, respectively (Civera and others 1993). In the present research, a higher TVB-N value was attained in the case of the control fish at the end of the experiment (Table 4).

**Table 4—Evolution of total volatile base-nitrogen (TVB-N) and trimethylamine-nitrogen (TMA-N) values<sup>a</sup> in chilled mackerel kept under different icing conditions.<sup>b</sup>**

Chilling Time (d)	TVB-N (mg/100 g muscle)		TMA-N (mg/100 g muscle)	
	C	P	C	P
Raw fish	30.21C (1.48)	30.21B (1.48)	0.07D (0.04)	0.07D (0.04)
3	30.74C (2.00)	28.69BC (1.70)	0.29CD (0.20)	0.16D (0.04)
6	30.15aC (1.57)	27.44bC (0.62)	0.54C (0.27)	0.34C (0.06)
10	35.12aB (2.08)	30.47bB (1.57)	1.04B (0.12)	0.85B (0.14)
13	44.61aA (1.76)	35.21bA (2.53)	2.32aA (0.25)	1.47bA (0.23)

<sup>a</sup>Mean values of 3 replicates ( $n = 3$ ); standard deviations are indicated in brackets. For each parameter and for each chilling time, mean values followed by different low-case letters indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences as a result of the icing condition. For each parameter and for each icing condition, values followed by different capital letters (A to D) denote significant ( $P < 0.05$ ) differences as a result of the chilling time. No letters are indicated when significant differences are not found ( $P > 0.05$ ).

<sup>b</sup>Abbreviations of icing conditions as expressed in Table 1.

**Table 5—Linear correlation coefficient values between microbial and chemical parameters analyzed in chilled mackerel kept under different icing conditions.<sup>a</sup>**

Microbial parameter	Total volatile base-nitrogen		Trimethylamine-nitrogen	
	C	P	C	P
Aerobes	0.86	0.84	0.88	0.84
Anaerobes	0.84	-0.30	0.84	-0.37
Psychrotrophes	0.84	0.75	0.88	0.92
Enterobacteriaceae	0.89	0.84	0.87	0.88
Lipolytics	0.89	0.68	0.92	0.80
Proteolytics	0.78	0.07	0.88	0.42

<sup>a</sup>Abbreviations of icing conditions as expressed in Table 1.

Related to the preserved batch, correlation values were again better for TMA-N value than for TVB-N scores. For both chemical parameters, fair correlation values were obtained with aerobes, psychrotrophes, and Enterobacteriaceae.

## Conclusions

The results obtained in this study indicated significant ( $P < 0.05$ ) differences between batches for all 6 microbial groups investigated, as well as in both chemical indices related to microbial activity development. These findings clearly indicated a significantly ( $P < 0.05$ ) lower bacterial growth in mackerel muscle subjected to storage in the organic acid-icing system as compared with traditional flake ice. The novel icing system evaluated in this study contains 3 organic acids, all of them previously reported as possessing antimicrobial and antioxidant activities. In addition, such natural organic acids are known to represent a relevant choice because of their easy availability, low commercial cost, and wide range of permitted concentration for their use in foods.

As being a highly fatty fish species, previous research on quality loss of chilled mackerel has mostly focused the lipid changes, these concerning specially lipid oxidation and hydrolysis. In the present investigation, an extensive study on microbial activity development during the chilled storage of this pelagic fish species has been undertaken; as a result, progress of different bacteria groups has been described, as well as its relationship with chemical parameters related to microbial activity development.

## Acknowledgements

The authors thank Marcos Trigo and Cristina Nine for their excellent technical assistance. This study was supported by the Secretaría Xeral de I+D from the Xunta de Galicia (Galicia, Spain) through the Research Project PGIDIT 10 TAL 402001 PR.

## References

- Alford JA, Pierce DA. 1961. Lipolytic activity of microorganisms at low and intermediate temperatures. III. Activity of microbial lipases at temperatures below 0 °C. *J Food Sci* 26:518.
- Ashie I, Smith J, Simpson B. 1996. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Crit Rev Food Sci Nutr* 36:87–121.
- Aubourg S, Setolo C, Gallardo JM. 1997. Quality assessment of sardines during storage by measurement of fluorescent compounds. *J Food Sci* 62:295–8, 304.
- Aubourg S, Pérez-Alonso F, Gallardo J. 2004. Studies on rancidity inhibition in frozen horse mackerel (*Trachurus trachurus*) by citric and ascorbic acids. *Eur J Lipid Sci Technol* 106:232–40.
- Badii F, Howell N. 2002. Effect of antioxidants, citrate, and cryoprotectants on protein denaturation and texture of frozen cod (*Gadus morhua*). *J Agric Food Chem* 50:2053–61.
- Ben-Gigirey B, Vieites Baptista de Sousa J, Villa T, Barros-Velázquez J. 1998. Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *J Food Prot* 61:608–15.
- Ben-Gigirey B, Vieites Baptista de Sousa J, Villa T, Barros-Velázquez J. 1999. Histamine and cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen albacore (*Thunnus alalunga*). *J Food Prot* 62:933–9.
- Ben-Gigirey B, Vieites Baptista de Sousa J, Villa T, Barros-Velázquez J. 2000. Characterization of biogenic amine-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from white muscle of fresh and frozen albacore tuna. *Int J Food Microb* 57:19–31.
- Bennour M, El Marrakchi A, Bouchriti N, Hamama A, El Ouada M. 1991. Chemical and microbiological assessment of mackerel (*Scomber scombus*) stored in ice. *J Food Prot* 78:4789–92.
- Campos C, Rodríguez O, Losada V, Aubourg S, Barros-Velázquez J. 2005. Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*Sardina pilchardus*). *Int J Food Microb* 103:121–30.
- Civera T, Turi R, Bisio C, Parisi E, Fazio G. 1993. Sensory and chemical assessment of marine teleosts. Relationship between total volatile basic nitrogen, trimethylamine and sensory characteristics. *Sci Alim* 13:109–17.
- Decker E, Hultin H. 1990. Factors influencing catalysis of lipid oxidation by the soluble fraction of mackerel muscle. *J Food Sci* 55:947–50, 953.
- Fagan J, Gormley R, Mhuircheartaigh M. 2003. Effect of freeze-chilling, in comparison with fresh, chilling and freezing, on some quality parameters of raw whiting, mackerel, and salmon portions. *Lebensm Wissen Technol* 36:647–55.
- [FAO] Food and Agriculture Organization. 2007a. Fishery statistics. Commodities. Yearbook 2005. Vol. 101. Rome, Italy: FAO United Nations. p 134–78.
- [FAO] Food and Agriculture Organization. 2007b. Fishery statistics. Capture production. Yearbook 2005. Vol. 100/100-1. Rome, Italy: FAO United Nations. p 262.
- Figuerola G, Galeno H, Troncoso M, Aguilera JM. 1990. Analysis of the microbial flora of jack mackerel (*Trachurus murphyi*) minced products. *Sci Alim* 10:907–12.
- Giese J. 1996. Antioxidants: tools for preventing lipid oxidation. *Food Technol* 50:73–80.

1 Microbial inhibition in chilled mackerel . .

- 2
- 3 Gogus U, Bozoglu F, Yurdugul S. 2006. Comparative effects of lactic acid, nisin, coating  
4 combined and alone applications on some postmortem quality criteria of refrigerated *Sardina*  
5 *pilchardus*. J Food Qual 29:658–71.
- 6 Gram L, Huss H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. Int J Food Microb  
7 33:121–37.
- 8 Hwang K, Regenstein J. 1995. Hydrolysis and oxidation of mackerel (*Scomber scombrus*) mince  
9 lipids with NaOCl and NaF treatments. J Aquat Food Prod Technol 4:19–30.
- 10 Jhaveri S, Leu S, Constantinides S. 1982. Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*, L.): shelf life in  
11 ice. J Food Sci 47:1808–10.
- 12 Kim C, Hearnberger J, Eun J. 1995. Gram-negative bacteria in refrigerated catfish fillets treated  
13 with lactic culture and lactic acid. J Food Prot 58:639–43.
- 14 Kuda T, Matsumoto C, Yano T. 1996. Changes in acid and alkaline phosphatase activities during  
15 the spoilage of raw muscle from horse mackerel (*Tiachurus japonicus*) and gurnard (*Lepidotrigla*  
16 *microptera*). Food Chem 76:443–7.
- 17 Madrid A, Madrid J, Madrid R. 1994. Chilling, freezing and ultra-freezing of fish and derivatives.  
18 In: Madrid A, editor. Technology of fish and its derivatives. Madrid, Spain: AMV Ediciones  
19 y Mundi-Prensa Libros, S. A. p 45–103.
- 20 Makarios-Laham IK, Lee TC. 1993. Protein hydrolysis and quality deterioration of refrigerated  
21 and frozen seafood due to obligately psychrophilic bacteria. J Food Sci 58:310–3.
- 22 Metin S, Erkan N, Varlik C, Aran N. 2001. Extension of shelf life of chub mackerel (*Scomber*  
23 *japonicus* Houttuyn 1780) treated with lactic acid. Eur Food Res Technol 213:174–7.
- 24 Odagami T, Morita J, Takama K, Suzuki S. 1994. Substrate specificities of extracellular proteases  
25 produced by marine putrefactive bacteria, *Shewanella putrefaciens* and *Alteromonas haloplanktis*.  
Lett Appl Microb 18:50–2.
- 26 Ozen B, Floros J. 2001. Effects of emerging food processing techniques on the packaging  
27 materials. Trends Food Sci Technol 12:60–7.
- 28 Pourashouri P, Shabanpour B, Aubourg S, Daghighi Rohi J, Shabani, A. 2009. An investigation  
29 of rancidity inhibition during storage of Wels catfish (*Silurus glanis*) fillets by previous ascorbic  
30 and citric acid treatment. Int J Food Sci Technol 44:1503–9.
- 31 Richards M, Kelleher S, Hultin H. 1998. Effect of washing with or without antioxidants on  
32 quality retention of mackerel fillets during refrigerated and frozen storage. J Agric Food Chem  
46:4363–71.
- 33 Rodríguez O, Aubourg S, Piñeiro C, Barros-Velázquez J. 2003. Evaluation of sensory and  
34 microbiological changes and identification of proteolytic bacteria during the iced storage of  
35 farmed turbot (*Psetta maxima*). J Food Sci 68:2764–71.
- 36 Rodríguez O, Losada V, Aubourg S, Barros-Velázquez J. 2005. Sensory, microbial and chemical  
37 effects of a slurry ice system on horse mackerel (*Tiachurus trachurus*). J Sci Food Agric  
85:235–42.
- 38 Saeed S, Howell N. 2001. 12-lipoxygenase activity in the muscle tissue of Atlantic mack-  
39 erel (*Scomber scombrus*) and its prevention by antioxidants. J Sci Food Agric 81:  
745–50.
- 40 Sallam KI. 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and  
41 sodium citrate in refrigerated sliced salmon. Food Cont 18:566–75.
- 42 Tozawa H, Erokibara K, Amano K. 1971. Proposed modification of Dyer's method for trimeth-  
43 ylamine determination in codfish. In: Kreuzer R, editor. Fish inspection and quality control.  
44 London, UK: Fishing News Books Ltd. p 187–90.
- 45 Venugopal V. 1990. Extracellular proteases of contaminant bacteria in fish spoilage: a review. J  
46 Food Prot 53:341–50.
- 47 Whittle K, Hardy R, Hobbs G. 1990. Chilled fish and fishery products. In: Gormley  
48 T, editor. Chilled foods: the state of the art. New York: Elsevier Applied Science. p  
49 87–116.

**CAPITULO 6: Inhibición de la actividad microbiana en caballa (*Scomber scombrus*) refrigerada mediante el empleo de un sistema de hielo que incluye ácidos orgánicos naturales.**

Esta parte de la investigación se corresponde con la continuación del objetivo tercero formulado en este trabajo. Siendo la caballa (*Scomber scombrus*) una especie grasa, las investigaciones realizadas hasta ahora en relación a la pérdida de calidad en esta especie refrigerada, han estado enfocadas en los cambios lipídicos, relacionados con la oxidación y la hidrólisis lipídicas. En el presente trabajo de investigación, se ha realizado un estudio del desarrollo de la actividad microbiana durante el almacenamiento en refrigeración de esta especie pelágica. Como resultado, se ha descrito el progreso de los diferentes grupos bacterianos, así como su relación con los parámetros químicos relacionados con el desarrollo de la actividad microbiana. Se evaluó la inhibición de la actividad de microorganismos alteradores de la calidad en esta especie representativa de la pesca de bajura como consecuencia de su almacenamiento en refrigeración en un sistema de hielo incluyendo un 0,050% (p/v) de la mezcla de ácidos orgánicos naturales.

**Análisis de actividad microbiana mediante parámetros microbianos**

El desarrollo de bacterias aerobias en el lote sometido a la acción del hielo con ácidos orgánicos naturales (lote-P) fue significativamente ( $P < 0,05$ ) más lento comparado con el lote control (lote C). Así, las diferencias en los recuentos microbianos alcanzaron su máximo con más de 2 unidades logarítmicas de

diferencia a día 6, mientras que la diferencia media para los aerobios mesófilos durante todo el periodo de almacenamiento fue de 1,18 unidades logarítmicas. Son destacables los valores alcanzados por el lote C almacenado en hielo en escamas a día 13, donde los niveles superaron los  $10^7$  log UFC/g, conforme a investigaciones previas realizadas en caballa refrigerada (Bennour y col., 1991); esta concentración microbiana ha sido a menudo referida por ser el punto de partida a partir del cual comienza a ser relevante el deterioro microbiológico (Gram y Huss., 1996). En contraste, el recuento de aerobios en el lote P estuvo alrededor de  $10^6$  UFC/g en ese mismo día. Otros autores han obtenido recuentos de aerobios en la piel de la caballa almacenada durante 7 días a 4° C con valores superiores a  $10^7$  log UFC/g (Kuda y col., 1996). Este resultado está en concordancia con los obtenidos en este estudio lo que refuerza la idea de la acción que realiza el sistema de hielo con ácidos sobre la inhibición microbiana. En el presente estudio, ambos lotes de pescado mostraron valores buenos de correlación entre los recuentos de aerobios y el tiempo de almacenamiento ( $r^2 = 0,93$  y  $0,84$  para C y P, respectivamente; regresión cuadrática).

Con respecto al desarrollo de bacterias anaerobias, el uso del sistema de ácidos orgánicos proporcionó ventajas significativas ( $P < 0,05$ ) derivadas de su uso. Así, la diferencia media en los recuentos de este grupo bacteriano durante el periodo de almacenamiento en refrigeración resultó ser mayor de 2 unidades logarítmicas, lo que significa que la ralentización del crecimiento bacteriano fue alrededor del 99%. Además, los últimos recuentos después de 13 días de almacenamiento se diferenciaron en más de 3,60 unidades logarítmicas, lo que indica un mejor control del crecimiento de aerobios como resultado del almacenamiento en el sistema de hielo con ácido orgánico. Los valores de

correlación entre los recuentos de aerobios y el tiempo de refrigeración resultaron ser buenos solamente para el caso del lote C ( $r^2 = 0,93$ ; regresión cuadrática).

El análisis comparativo de psicrófilos indicó diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre lotes después de 10 días de almacenamiento. El desarrollo de este grupo de microorganismos resultó ser bastante limitado para ambos lotes en los primeros días de almacenamiento, con recuentos microbiológicos menores de 4,85 log UFC/ g unidades hasta el día 6; sin embargo, el sistema de hielo con ácidos orgánicos suministró un destacable efecto protector. Las diferencias entre lotes aumentaron a día 10, alcanzando el lote control valores superiores a 7 unidades logarítmicas, mientras que el sistema de hielo con ácidos orgánicos, mostró valores menores de 6 unidades logarítmicas. Incluso, se observó un mayor efecto significativo a día 13, aunque en ambos lotes se alcanzaron valores de unidades superiores a 6 log UFC/g, límite de deterioro microbiano. Las diferencias medias entre lotes durante todo el proceso de almacenamiento, alcanzaron unidades logarítmicas de 1,17; esto indica una ralentización del crecimiento de este grupo de bacterias en el sistema de hielo con ácidos orgánicos. Por otra parte, a medida que avanzó el periodo de almacenamiento, se alcanzaron mayores diferencias en los recuentos de psicrófilos, alcanzando su máximo a día 13; en este día, se observaron diferencias entre lotes de unidades 1,50 log.

Así, al igual que en el caso de los organismos aerobios, los organismos psicrófilos no superaron valores de  $10^7$  UFC/ g en el músculo de las muestras de pescado almacenadas en el sistema de hielo con ácidos orgánicos, mientras que este valor, se superó claramente en el lote control. Ambos lotes, mostraron buenos valores de correlación entre recuentos de psicrófilos y el tiempo de almacenamiento ( $r = 0,94$  y  $0,93$ ; correlación lineal y cuadrática para los lotes C y

P respectivamente) acorde con investigaciones previas realizadas en caballa (Bennour y col., 1991).

Con respecto a las *Enterobacteriaceae*, los recuentos fueron menores de 1,5 unidades logarítmicas en ambos lotes hasta el día 10. Estos resultados confirman la buena calidad inicial de las muestras de caballa y el limitado crecimiento de las bacterias entéricas durante el almacenamiento en refrigeración, sin tener en cuenta el sistema de hielo empleado. Los valores bajos de *Enterobacteriaceae* han sido puestos de manifiesto por otros autores para relacionar las especies marinas como el jurel (Rodríguez y col., 2005) o el jurel del Pacífico (Figuroa y col., 1990) sometidos a condiciones de almacenamiento de hielo en escamas o hielo líquido. Sin embargo, en nuestro estudio, los recuentos para este grupo bacteriano fueron significativamente ( $P < 0,05$ ) menores en el sistema de hielo con ácidos orgánicos que en el lote control a medida que avanzó el tiempo de almacenamiento; las diferencias alcanzaron 1,95 unidades logarítmicas a día 13. No obstante, el hecho de que los recuentos para este grupo de bacterias fuesen bastante menores a día 10 (menor de 1,30 log UFC/g unidades) y como resultado de los amplios valores obtenidos de la desviación estándar, no se puede concluir que exista un efecto beneficioso del sistema de ácidos orgánicos más allá del día 10. Además, para ambos lotes, los resultados indicaron un buen control de este grupo de microorganismos después del día 10; esto pudo ser debido a las buenas prácticas higiénicas y el rápido enfriamiento del pescado. Sin embargo, a día 10, la calidad microbiológica del pescado llegó a su límite, incrementándose el número de *Enterobacteriaceae* a día 13. Conforme a la distribución de los recuentos de *Enterobacteriaceae*, sólo se obtuvo un valor de correlación justo con

el tiempo de almacenamiento para el pescado correspondiente al lote P ( $r^2 = 0,87$ ; correlación cuadrática).

En este trabajo se pretendía evaluar el efecto de la mezcla de los ácidos orgánicos en los grupos de microorganismos que exhiben fenotipos específicos de deterioro. Así, el desarrollo de bacterias capaces de producir enzimas lipolíticas extracelulares ha sido descrito como un efecto negativo para la conservación de especies de pescado semi-grasas (Rodríguez y col., 2005). Asimismo, la inhibición de bacterias proteolíticas capaces de sintetizar y segregar enzimas proteolíticas ha estado relacionada con la mejor conservación de las especies de pescado, debido a la limitación del deterioro físico de la estructura del músculo, reduciéndose también la formación de compuestos alcalinos como amoníaco y metabolitos relacionados (Venugopal 1990; Odagami y col., 1994; Makarios-Laham & Lee 1993; Rodríguez y col., 2003).

En consecuencia, la inhibición de bacterias que exhiben fenotipos proteolíticos y/o lipolíticos puede limitar los efectos negativos de las proteasas y lipasas en la calidad de las especies marinas desde que estas enzimas han sido caracterizadas por retener actividad durante largos tiempos de almacenamiento incluso bajo temperaturas de refrigeración (Alford & Pierce, 1961).

Con respecto a las bacterias lipolíticas, al igual que en los grupos bacterianos estudiados anteriormente, fueron determinadas diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre lotes. Así, las diferencias medias durante el almacenamiento alcanzaron un máximo de 1,41 log UFC/g en los estados avanzados del almacenamiento. Fueron destacables las diferencias determinadas en los días 10 y 13, alcanzándose valores de 1,25 y 2,73 unidades logarítmicas, respectivamente. Según estos resultados, el crecimiento de bacterias

relacionadas con la ruptura lipolítica en la caballa, resultó ser retardada como consecuencia del almacenamiento en el sistema de enfriamiento con ácidos orgánicos. Una inhibición similar fue observada en microorganismos lipolíticos con otros métodos de conservación como el hielo líquido para especies grasas y semigrasas como jurel (Rodríguez y col., 2005) y sardina (Campos y col., 2005). Sólo se obtuvieron buenos valores de correlación entre recuentos lipolíticos y el tiempo de enfriamiento para el pescado del lote control ( $r^2 = 0,93$ ; regresión cuadrática).

Respecto a las bacterias proteolíticas, se observó un comportamiento similar al caso de las bacterias lipolíticas. De hecho, los recuentos de las bacterias proteolíticas en el músculo de la caballa almacenada en el sistema de hielo con ácidos orgánicos no alcanzaron niveles superiores a  $10^4$  UFC/g en ningún momento del almacenamiento, mientras que para el lote control, se encontraron valores superiores a  $10^5$  UFC/g después de 10 días de almacenamiento. La diferencia media de recuentos entre lotes durante el almacenamiento fue de 1,19 unidades logarítmicas, siendo la inhibición del crecimiento mayor a medida que avanzaba el periodo de almacenamiento; este resultado está conforme con los resultados obtenidos en los grupos bacterianos estudiados anteriormente. Al igual que los recuentos lipolíticos, los proteolíticos también proporcionaron unos valores de correlación buenos con el periodo de almacenamiento en el caso del lote control ( $r^2 = 0,89$ ; correlación lineal).

Se produjo un marcado efecto inhibitorio de este nuevo sistema de hielo en todos los grupos microbianos investigados, siendo destacable en los casos de bacterias aerobias, anaerobias y lipolíticas. El lavado superficial provocado por el

deshielo durante el almacenamiento y el posterior efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos en la microflora de la piel del pescado puede ser una de las razones por las cuales se encontró un limitado crecimiento bacteriano en el músculo de la caballa. Resultados similares se han encontrado anteriormente para otros métodos de conservación como el hielo líquido, donde el deshielo liberaba sales que ejercían un efecto bacteriostático en la microflora del pescado (Rodríguez y col., 2003; Rodríguez y col, 2005; Campos y col., 2005). Además, estudios previos en caballa, confirmaron la presencia de cepas *Proteus penneri* y *Staphylococcus xylosus*, que manifiestan un destacado fenotipo lipolítico y protelítico, y en un menor grado *Proteus vulgaris*. El hecho de que el sistema de hielo con ácidos orgánicos evaluado en este estudio retarde significativamente ( $P < 0,05$ ) el crecimiento de bacterias lipolíticas y proteolíticas en el músculo de la caballa, acentúa los beneficios de este sistema de almacenamiento para el mantenimiento de la calidad en estas especies marinas.

#### **Análisis químico de la actividad microbiana**

El desarrollo de la actividad microbiana fue medido también mediante índices químicos. El contenido de N-BVT mostró un valor elevado ( $30,21 \pm 1,48$ ) para las muestras de pescado iniciales; este valor resulta similar al obtenido por Civera y col. (1993) ( $31,9 \text{ mg}/100\text{g}$  músculo), pero es marcadamente superior que los valores obtenidos por Bennour y col. (1991) y Fagan y col. (2003). En este estudio, el mayor contenido ( $P < 0,05$ ) en N-BVT de las muestras de pescado correspondientes al hielo tradicional puede observarse cuando son comparados los valores obtenidos para las muestras preservadas entre los días 6 y 13. El contenido en aminas volátiles mostró un marcado incremento en el periodo

comprendido entre los días 10-13, ya que se puede observar un ligero incremento en el lote P. Así, se obtuvo una buena correlación entre los valores de N-BVT y el tiempo de almacenamiento en refrigeración para el lote C ( $r^2 = 0,91$ ; regresión cuadrática).

Las muestras iniciales de pescado reflejaron valores de N-TMA ( $0,07 \pm 0,04$ ) conforme al alto grado de frescura del material empleado. El pescado correspondiente a ambos sistemas de hielo mostró un contenido en N-TMA que incrementó ( $P < 0,05$ ) con el tiempo. Este incremento fue especialmente marcado al final del almacenamiento, en conformidad con investigaciones anteriores en caballa refrigerada (Jhaveri y col., 1982; Bennour y col., 1991). En el caso del lote P, solamente se llegó a un notable aumento en la formación de aminas volátiles al final del experimento. Al igual que los recuentos alcanzados para aerobios, los valores de N-BVT mostraron una disminución del valor medio en el lote P en el periodo comprendido entre los días 0-6; este resultado puede ser explicado como consecuencia del efecto conservante de los ácidos presentes en el hielo y por la actividad microbiológica relativamente baja en este periodo.

Se obtuvieron buenos valores de correlación entre el contenido de N-BVT y el tiempo de enfriamiento para el lote C, ( $r^2 = 0,91$ ; correlación cuadrática), según la fuerte relación entre el contenido de N-BVT y la pérdida de frescura (Whittle y col., 1990; Bennour y col., 1991). Los compuestos de aminas volátiles han sido descritos por ser producidos parcialmente por la actividad enzimática endógena, pero principalmente, como el resultado del desarrollo microbiano (Whittle y col., 1990).

El pescado inicial mostró valores bajos de N-TMA ( $0,07 \pm 0,04$  mg/100 g de músculo); esto es un indicador de la elevada frescura del material crudo empleado. En todas las muestras se hizo patente el aumento progresivo del contenido en N-TMA ( $P < 0,05$ ) con el tiempo, independientemente del sistema de hielo empleado; este incremento, resultó acentuado al final del periodo de almacenamiento, conforme a investigaciones previas en caballa refrigerada (Jhaveri y col., 1982; Bennour y col., 1991). Se observaron buenos valores de correlación cuadráticos entre los valores de N-TMA y el tiempo en refrigeración ( $r^2 = 0,93$  y  $0,95$ , para C y P, respectivamente). Al igual que los valores de N-TVB, la TMA ha sido descrita por ser producida generalmente como resultado del desarrollo microbiano.

La comparación entre ambas condiciones de hielo, mostró valores medios menores de N-TMA durante todo el experimento, como resultado del empleo de la mezcla de ácidos orgánicos en el hielo. Se encontraron estas diferencias al final del experimento.

En el presente trabajo de investigación, también se analizó la relación entre los parámetros químicos y microbiológicos). En relación al lote control, se obtuvieron valores de correlación mejores entre recuentos microbiológicos y valores de N-TMA ( $r = 0,84-0,92$ ; coeficientes de correlación lineal) que para los valores de N-BVT ( $r = 0,78-0,89$ ; coeficientes de correlación lineal). En este sentido, investigaciones previas (Bennour y col., 1991) mostraron que el contenido de N-TMA era adecuado para clasificar el grado de frescura de la caballa refrigerada (los grados primero, segundo y tercero corresponderían con 0-1, 1-3 y 3-6 mg TMA-N/ 100 g músculo, respectivamente). En definitiva, correlaciones previas estudiadas entre los valores de N-BVT, N-TMA y

aceptabilidad sensorial en caballa refrigerada concluyeron que esta especie no es apropiada para su consumo cuando ambos parámetros superen los valores de 40 y 4 mg/100 g de músculo (Civera y col., 1993), respectivamente.


En este estudio, se alcanzaron valores altos de N-BVT en el caso del lote control al final del experimento (44,61 mg/100 g de músculo). En relación al lote preservado, los valores de correlación fueron de nuevo mejores en relación a N-TMA que en relación a N-BVT. Para ambos parámetros químicos, se obtuvieron valores aceptables de correlación con aerobios, psicrófilos y *Enterobacteriaceae*.

**CAPÍTULO 7:**

**Effect of oregano and thyme essential oils on the microbiological and chemical quality of refrigerated (4° C) ready-to-eat squid rings.**

**Efecto de aceites esenciales de orégano y tomillo sobre la calidad química y microbiológica de anillas de calamar precocinadas conservadas en refrigeración (4°C).**



	I J F S	2 9 9 1	B	Dispatch: 25.2.12	Journal: IJFS	CE: K. Karthik
	Journal Name	Manuscript No.		Author Received:	No. of pages: 9	PE: Sathya Kala

Original article

## Effect of oregano and thyme essential oils on the microbiological and chemical quality of refrigerated (4 °C) ready-to-eat squid rings

Minia Sanjuás-Rey,<sup>1</sup> Parastoo Pourashouri,<sup>2†</sup> Jorge Barros-Velázquez,<sup>1</sup> & Santiago P. Aubourg<sup>2†</sup><sup>1</sup> Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences, University of Santiago de Compostela, 27002-Lugo, Galicia, Spain<sup>2</sup> Department of Food Technology, Institute for Marine Research (CSIC), C/Eduardo Cabello 6, 36208-Vigo, Galicia, Spain

(Received 17 November 2011; Accepted in revised form 6 February 2012)

**Summary** The efficacy of oregano and thyme essential oils (OEO and TEO, respectively) in the quality retention of a refrigerated (4 °C) squid (*Loligo vulgaris*) ring ready-to-eat (RTE) product was studied. Essential oils were added at different concentrations to the coating medium during processing. An inhibitory ( $P < 0.05$ ) effect of OEO on the microbial activity (aerobes, anaerobes, Enterobacteriaceae, psychrotrophs) of the squid rings was observed, with a more pronounced effect as OEO concentration increased. The addition of OEO also led to an inhibitory ( $P < 0.05$ ) effect on lipid oxidation, as determined by peroxide, thiobarbituric acid-reactive substance and interaction compound formation; however, no effect ( $P > 0.05$ ) of the OEO concentrations on lipid oxidation development was detected. The addition of TEO did not lead to an inhibitory effect ( $P > 0.05$ ) on the microbial activity of the refrigerated RTE squid, although a slight inhibitory ( $P < 0.05$ ) effect on lipid oxidation was observed in the batches including the higher TEO concentrations.

**Keywords** Lipid oxidation, microbial activity, oregano, quality, ready-to-eat, squid ring, thyme.

### Introduction

Marine species provide highly perishable products whose quality and freshness rapidly decline post-mortem because of different microbial and biochemical degradation mechanisms (Whittle *et al.*, 1990; Olafsdóttir *et al.*, 1997). A wide variety of preservation strategies have been satisfactorily tested to delay the spoilage of marine food while retaining its nutritional value and guaranteeing its safety. These strategies include chemical and/or physical treatments (Toledo-Flores & Zall, 1992; Ashie *et al.*, 1996; Sanjuás-Rey *et al.*, 2011) and packaging employment (Ozen & Floros, 2001; Sivertsvik *et al.*, 2002; Corbo *et al.*, 2009).

With respect to the preservation techniques based on chemical methods, recent efforts have focused on the replacement of synthetic antioxidants by natural antioxidants. In this sense, essential oils have been reported to provide natural antimicrobial and antioxidant components with the potential to extend the shelf

life of certain food products (Dziezak, 1989). Among the essential oils extracted from aromatic plants, oregano (*Origanum vulgare*) (Goulas & Kontominas, 2007; Giatrakou *et al.*, 2008; Mexis *et al.*, 2009) and thyme (*Thymus vulgaris*) (Del Nobile *et al.*, 2009; Kykkidou *et al.*, 2009; Erkan, 2010) oils have gained a great technological interest. The preservation effects found in both essential oils have been explained on the basis of the presence of different compounds such as carvacrol, thymol, p-cymene and  $\gamma$ -terpinene (Burt, 2004; Yanishlieva *et al.*, 2006).

A recent strategy to increase marine product distribution according to new trends in food consumption and lifestyle is represented by the increasing commercialisation of ready-to-eat (RTE) food products, which include a myriad of refrigerated, frozen, cured and canned seafood products (Manrique & Jensen, 2001). Thus, novel and attractive RTE products are increasingly available today in the market and restorer sectors, all of which require strict safety controls and attempt to satisfy the consumer's expectations for taste, flavour and healthiness (Gilbert *et al.*, 2000; Gopinath *et al.*, 2007).

Cephalopod catches have increased gradually in the last decade because of a growing market demand and the expansion of fisheries into new fishing grounds and

\*Correspondent: Fax: +34 986 292762;

e-mail: saubourg@iim.csic.es

<sup>†</sup>Actual address: Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran

deeper waters (FAO, 2007a). Among these cephalopods, squid species represent a major portion of the catches in many countries and are mainly exported as chilled or frozen products (FAO, 2007b).

This study focused on an RTE product consisting of pre-fried squid rings maintained under modified atmosphere packaging (MAP) conditions. The main objective of this work was to investigate the effects of the addition of oregano and thyme essential oils (OEO and TEO, respectively) on the quality and shelf life of such food products. For it, different concentrations of the essential oils were added to the coating mixture of the pre-fried squid rings. The microbial growth and lipid oxidation events in squid rings during the refrigerated storage (4 °C) were observed and compared with those of control batches prepared in the absence of these essential oils.

## Materials and methods

### Raw material, processing and sampling

Frozen individual peeled squid (*Loligo vulgaris*) mantle rings (weight:  $19.0 \pm 1.0$  g each squid ring) were acquired from a local seafood industry specialising in the commercialisation of RTE seafood products. Squid rings had been prepared from fresh squid and then kept frozen ( $-40$  °C) for 1 month. Once in our laboratory, two different experiments were conducted to assess the effect of the presence of OEO and TEO independently. In both experiments, the thawing step was performed by overnight storage at 4 °C.

The first experiment concerned OEO (oregano oil, FCC grade, from *Thymus capitatus*; density:  $0.939$  g mL<sup>-1</sup> at 25 °C; boiling point: 239 °C; Sigma Aldrich, Madrid, Spain) and included squid rings ( $n = 306$ ) that were randomly assigned into four batches (seventy two rings in each). Three of the batches were processed with a coating mixture supplemented with OEO at the following concentrations: 0.010% (O-1 batch), 0.025% (O-2 batch) or 0.050% (O-3 batch) (w/w, OEO/squid ring). The fourth batch was prepared without oregano oil (control batch, C-O). The remaining rings ( $n = 18$ ) were considered as the initial sample of the oregano experiment; they were distributed among three groups (six rings in each) that were analysed independently.

The coating formulation consisted of wheat flour and cold water in a 3/2 ratio, and the mixture was homogenised for 5 min in an Ultraturrax (Janke & Kunkel; Ultraturrax T25, Manasquan, NJ, USA) mixer. After mixing, OEO was added, and the mixture was homogenised for 1 min. Then, the squid rings were immersed into each coating solution for 2 min and deep-fried with refined sunflower oil at  $180 \pm 2$  °C for 20 s in a Fritaurus Professional four domestic electric fryer

(Taurus, Barcelona, Spain). After frying, the squid ring products were placed on polystyrene trays (20 × 12 cm), which were packed in retractile multiplayer co-extruded film bags. A mixture of gases consisting of 70% N<sub>2</sub>, 25% CO<sub>2</sub> and 5% O<sub>2</sub> was injected into each sample at a ring/atmosphere ratio of 1/2 (w/v). The bags were immediately sealed to obtain the final commercial RTE product. Each tray contained three squid rings, so twenty four trays were prepared for each treatment. The packed samples were stored in a refrigerated room at 4 °C. The samples were taken for analysis on days 3, 7, 10 and 14 of the refrigerated storage.

The second experiment concerned TEO (thyme oil white, FCC grade, from *Thymus vulgaris* and/or *Thymus zygis*; density:  $0.917$  g mL<sup>-1</sup> at 25 °C; boiling point: 195 °C; Sigma Aldrich) and included squid rings ( $n = 234$ ) that were randomly assigned into four batches (fifty four rings in each). Three of the batches were processed with a coating mixture supplemented with TEO at the following concentrations: 0.010% (T-1 batch), 0.025% (T-2 batch) or 0.050% (T-3 batch) (w/w, TEO/squid ring). A control batch (C-T) without thyme oil was also prepared. The remaining rings ( $n = 18$ ) were considered as the initial sample of the thyme experiment; they were distributed among three groups (six rings in each) that were analysed independently. The coating process, frying, packaging and storage temperature were the same as in the OEO experiment. Each tray contained three squid rings, so eighteen trays were prepared for each treatment. Samples were taken for analysis on days 5, 8 and 12 of refrigerated storage.

In both the oregano and the thyme experiments, six trays corresponding to each treatment were analysed at each refrigeration time. For this analysis, the trays were distributed into three groups (two trays per group), and each group was analysed separately.

Previous preliminary trials were performed to establish the maximum concentration of each essential oil that could be employed without modifying the product odour. Analysis of squid ring odour was conducted by a sensory panel of five experienced judges. For it, three-digit-code samples were presented to the panellists and qualified as 'modified', 'not modified' or 'doubtful'. Under the present experimental conditions, it was concluded that if the essential oils were added at a 0.075% (w/w; essential oil/squid ring) concentration or higher, the presence of the essential oil odour was noticed in the squid ring RTE product. Accordingly, concentrations tested in the present research are below this value.

### Microbiological analyses

Squid rings were dissected aseptically from the coating medium in the refrigerated products; the initial squid rings were directly analysed. For this analysis, 10 g of

1 squid ring was mixed with 90 mL of 0.1% peptone water  
2 and homogenised in a stomacher (AES, Combourg,  
3 France) as previously described (Ben-Gigirey *et al.*,  
4 1998, 1999). In all cases, serial dilutions of the microbial  
5 extracts were prepared in 0.1% peptone water.

6 The total aerobic counts were determined in plate  
7 count agar (PCA; Oxoid Ltd., London, UK) after  
8 incubation at 30 °C for 48 h as previously described  
9 (Ben-Gigirey *et al.*, 1998, 1999). The anaerobe counts  
10 were also determined in PCA at 30 °C, but the plates  
11 were introduced inside an anaerobiosis jar. The psy-  
12 chrotroph counts were also determined in PCA under  
13 aerobic conditions, but the incubation was carried out at  
14 7–8 °C for 7 days. The Enterobacteriaceae counts were  
15 determined by pour plating on violet red bile glucose  
16 agar (VRBG) and subsequently incubated at 30 °C for  
17 24–48 h.

18 In all cases, the bacterial counts were converted into  
19 log CFU g<sup>-1</sup> squid ring before undergoing statistical  
20 analysis. All analyses were performed in triplicate.

#### 21 22 23 Chemical analyses

24 The squid rings were separated from the coating  
25 medium, minced, homogenised and employed for the  
26 different chemical analyses: pH, total lipids, peroxide  
27 value (PV), thiobarbituric acid index (TBA-i) and  
28 fluorescence ratio (FR). The initial squid rings were  
29 analysed after mincing and homogenising.

30 The evaluation of the pH values in the squid rings  
31 throughout the storage time was performed via a 6-mm-  
32 diameter insertion electrode (Crison, Barcelona, Spain).

33 The lipids were extracted from the squid rings using  
34 the Bligh & Dyer (1959) method, which employs a  
35 single-phase solubilisation step of the lipids using a  
36 chloroform/methanol (1/1) mixture. The quantification  
37 of results was expressed as g lipid kg<sup>-1</sup> squid ring.

38 The PV was determined in the lipid extract by  
39 peroxide reduction with ferric thiocyanate according to  
40 the method of Chapman & McKay (1949). The results  
41 were expressed as meq active oxygen kg<sup>-1</sup> lipids.

42 The TBA-i was determined according to the method  
43 of Vyncke (1970). This method is based on the reaction  
44 between a trichloroacetic acid extract of the squid ring  
45 and thiobarbituric acid. The concentration of thiobar-  
46 bituric acid-reactive substances (TBARS) was spectro-  
47 photometrically measured at 532 nm, and the results  
48 were expressed as mg malondialdehyde kg<sup>-1</sup> squid ring.

49 The formation of fluorescent compounds was deter-  
50 mined by measurements at 393/463 nm and 327/415 nm  
51 as described by Aubourg & Gallardo (1997). The  
52 relative fluorescence (RF) was calculated as follows:  
53  $RF = F/F_{st}$ , where  $F$  is the fluorescence measured at  
54 each excitation/emission maximum and  $F_{st}$  is the  
55 fluorescence intensity of a quinine sulphate solution  
56 (1 µg mL<sup>-1</sup> in 0.05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) at the corresponding

wavelength pair. The FR was calculated as the ratio  
between the two RF values:  $FR = RF_{393/463 \text{ nm}} / RF_{327/415 \text{ nm}}$ . Results on fluorescent compound forma-  
tion are expressed as FR values and were determined in  
the lipid fraction resulting from the squid ring extraction  
(Bligh & Dyer, 1959) All analyses were performed in  
triplicate.

#### Statistical analyses

The data from the different analyses were subjected to  
analysis of variance (ANOVA). PASW Statistics 18 (SPSS,  
Chicago, IL, USA) was used to explore the statistical  
significance of the differences because of the presence of  
the essential oil and the refrigeration time. Differences  
were considered significant for a confidence interval at  
the 95% level ( $P < 0.05$ ) in all cases.

### Results and discussion

#### Microbiological stability

The comparative evolution of aerobes, anaerobes, Enterobacteriaceae and psychrotrophs during the refrigerated storage of RTE squid rings treated with OEO is shown in Table 1. Significantly ( $P < 0.05$ ) lower aerobic mesophile counts were measured in the squid rings treated with any of the three oregano concentrations relative to the control batch. Remarkably, aerobic counts below three log units were determined after 14 days of storage, whereas the control batch exhibited concentrations of approximately six log units on day 10. With respect to the development of anaerobic bacteria, lower counts at advanced storage times (10–14 days) were determined in the squid rings treated with any of the oregano concentrations tested than in the control batch. This inhibitory effect was found to be higher at day 10 for the two highest oregano concentrations (O-2 and O-3 conditions). It should be noted that the final anaerobe concentrations remained below two log units in the OEO batches, whereas these values were above five log units in the control batch on day 10.

With respect to Enterobacteriaceae, significant differences were found on day 7 between the three batches treated with oregano and the control batch. On day 14, significant differences between the control batch and the two most concentrated oregano batches (O-2 and O-3) were also observed. As in the case of aerobes and anaerobes, the Enterobacteriaceae assessment of oregano-treated squid samples exhibited a decreasing ( $P < 0.05$ ) value after processing and storing for 3 days. As raw samples were analysed before the pre-frying step, the decrease in the microbial numbers determined for all batches on day 3 can be easily explained as a result of such frying step, which is required for the industrial elaboration of the RTE food

**Table 1** Microbiological count (log CFU g<sup>-1</sup> muscle) assessment\* in refrigerated squid rings treated with oregano essential oil (OEO)<sup>†</sup>

Microbiological parameter	Storage time (days)	OEO treatment			
		C-O	O-1	O-2	O-3
Aerobes	Raw squid rings	a 3.39 (0.12)	c 3.39 (0.12)	b 3.39 (0.12)	b 3.39 (0.12)
	3	a 2.85 y (1.21)	a 1.99 z (0.00)	a 1.99 z (0.00)	a 1.99 z (0.00)
	7	ab 4.16 y (1.66)	a 1.99 z (0.00)	a 1.99 z (0.00)	a 1.99 z (0.00)
	10	b 5.94 y (0.41)	abc 2.63 z (0.91)	a 1.80 z (0.28)	b 2.77 z (0.66)
	14	ab 5.35 y (1.70)	b 2.57 z (0.38)	b 2.95 zy (0.83)	ab 2.85 zy (1.21)
Anaerobes	Raw squid rings	b 3.76 (0.63)	b 3.76 (0.63)	c 3.76 (0.63)	b 3.76 (0.63)
	3	ab 2.15 (1.20)	a 1.74 (0.37)	a 1.39 (0.12)	a 1.74 (0.37)
	7	a 1.99 (0.00)	a 1.99 (0.00)	b 1.99 (0.00)	a 1.99 (0.00)
	10	c 5.45 x (0.52)	b 3.92 y (0.45)	b 1.80 z (0.28)	a 1.65 z (0.49)
	14	c 5.42 y (1.03)	a 1.99 z (0.00)	abc 1.99 z (1.81)	a 1.99 z (0.00)
<i>Enterobacteriaceae</i>	Raw squid rings	b 1.89 (0.27)	b 1.89 (0.27)	b 1.89 (0.27)	b 1.89 (0.27)
	3	a 0.99 (0.00)	a 0.99 (0.00)	a 0.99 (0.00)	a 0.99 (0.00)
	7	b 2.56 y (0.78)	a 0.99 z (0.00)	a 0.99 z (0.00)	a 0.99 z (0.00)
	10	a 0.99 (0.00)	a 0.99 (0.00)	a 0.99 (0.00)	a 0.99 (0.00)
	14	b 2.36 y (0.52)	b 1.65 y (0.49)	a 0.99 z (0.00)	a 0.99 z (0.00)
Psychrotrophs	Raw squid rings	a 1.30 (0.43)	b 1.30 (0.43)	b 1.30 (0.43)	a 1.30 (0.43)
	3	ab 1.95 (1.34)	a 0.99 (0.00)	a 0.99 (0.00)	a 1.49 (0.43)
	7	b 1.99 (0.00)	c 1.99 (0.00)	c 1.99 (0.00)	b 1.99 (0.00)
	10	c 5.56 y (0.79)	d 3.62 z (0.74)	abc 2.15 z (1.63)	ab 2.33 z (1.89)
	14	abc 4.10 y (2.99)	c 1.99 z (0.00)	abc 1.99 y (1.08)	b 1.99 z (0.00)

\*Mean values of three independent replicates ( $n = 3$ ); SD are indicated in brackets. For each storage time, mean values in the same row followed by different letters (z, y, x) indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences as a result of the OEO treatment. For each treatment, mean values in the same column followed by different letters (a–d) denote significant differences ( $P < 0.05$ ) as a result of the refrigeration time. No letters are indicated when significant differences are not found ( $P > 0.05$ ).

<sup>†</sup>OEO concentrations (TEO/squid ring, w/w) employed in the coating medium: 0.000% (C-O; control), 0.010% (O-1), 0.025% (O-2) and 0.050% (O-3).

product. However, when the pre-fried batches were compared (3- to 14-day period), the significant differences found among OEO batches and controls for all microbial groups evidenced the inhibitory effect derived from the presence of such essential oil.

Differences in psychrotroph counts were also observed after 10 and 14 days of storage. Thus, on day 10, lower counts were obtained for the OEO batches than for the control batch. On day 10, differences between the control batch and the O-1, O-2 and O-3 batches, respectively, were observed.

In conclusion, OEO in the coating medium of squid rings had a marked inhibitory effect on microbial development. Our study included a MAP strategy and refrigerated storage, which were combined with the OEO treatment. Our results are in agreement with those of previous studies where OEO resulted in an enhancement of quality when combined with other preservation technologies. For example, an inhibitory effect of OEO on microbial activity development (total volatile base-nitrogen and trimethylamine-nitrogen assessment, TVB-N and TMA-N, respectively) was reported for the combination of OEO–MAP in salted sea bream (*Sparus aurata*) that were stored under refrigerated conditions ( $4 \pm 0.5$  °C) (Goulas & Kontominas, 2007). Likewise, Giatrakou *et al.* (2008) reported positive results for

microbial count and volatile amine assessment for the combination of OEO–MAP in swordfish (*Xiphias gladius*) fillets stored at 4 °C. More recently, Pyrgotou *et al.* (2010) reported an inhibitory effect of the combination of OEO and MAP on the microbial activity (determined via the microbial counts and volatile amine formation) of salted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets stored at 4 °C. In a different type of combination (an OEO package provided with an oxygen absorber), Mexis *et al.* (2009) found that microbial activity was partially inhibited (microbial count and volatile amine assessment) during the storage of rainbow trout (*O. mykiss*) fillets at 4 °C.

The assessment of microbial growth on the RTE squid rings from the TEO experiment is shown in Table 2. The comparative evolution of aerobic mesophiles did not significantly ( $P > 0.05$ ) differ with the addition of TEO to the coating medium during processing. A marked decrease ( $P < 0.05$ ) was observed in all cases after processing (namely frying) and storage for 5 days. Then (5- to 12-day period), an increase in aerobic counts with storage time was observed for all types of squid batches; a marked effect of MAP conditions can be involved because aerobe numbers observed at the end of the experiment could be considered relatively low (counts under 3.50 log units) in all cases.

**Table 2** Microbiological count (log CFU g<sup>-1</sup> muscle) assessment\* in refrigerated squid rings treated with thyme essential oil (TEO)<sup>†</sup>

Microbiological parameter	Storage time (days)	TEO treatment			
		C-T	T-1	T-2	T-3
Aerobes	Raw squid rings	b 3.72 (0.02)	b 3.72 (0.02)	c 3.72 (0.02)	b 3.72 (0.02)
	5	a 2.00 (0.00)	a 1.99 (0.00)	a 1.99 (0.00)	a 2.15 (0.21)
	8	ab 2.84 (1.21)	a 1.99 (0.00)	ab 2.65 (0.93)	a 1.99 (0.00)
	12	b 3.09 (0.87)	ab 2.74 (1.06)	b 3.34 (0.18)	b 3.27 (0.70)
Anaerobes	Raw squid rings	c 3.16 (0.45)	b 3.16 (0.45)	b 3.16 (0.45)	b 3.16 (0.45)
	5	bc 2.87 zy (0.80)	ab 2.42 zy (0.60)	b 3.00 y (0.00)	a 2.15 z (0.21)
	8	a 1.99 (0.00)	a 1.99 (0.00)	a 1.99 (0.00)	a 1.99 (0.00)
	12	ab 2.15 (0.21)	a 1.99 (0.00)	a 2.00 (0.01)	a 2.00 (0.01)
Enterobacteriaceae	Raw squid rings	c 3.39 (0.54)	b 3.39 (0.54)	b 3.39 (0.54)	b 3.39 (0.54)
	5	b 1.50 (0.71)	a 0.99 (0.00)	a 0.99 (0.00)	a 0.99 (0.00)
	8	a 0.99 (0.00)	a 0.99 (0.00)	a 0.99 (0.00)	a 0.99 (0.00)
	12	a 0.99 (0.00)	a 0.99 (0.00)	a 0.99 (0.00)	a 0.99 (0.00)
Psychrotrophs	Raw squid rings	b 3.14 (0.56)	b 3.14 (0.56)	b 3.14 (0.56)	b 3.14 (0.56)
	5	a 2.00 (0.01)	a 2.15 (0.22)	a 1.99 (0.00)	a 1.99 (0.00)
	8	a 1.99 (0.00)	a 1.99 (0.00)	a 1.99 (0.00)	a 1.99 (0.00)
	12	a 2.00 (0.01)	a 1.99 (0.00)	a 2.00 (0.01)	a 2.00 (0.01)

\*Mean values of three independent replicates ( $n = 3$ ); SD are indicated in brackets. For each storage time, mean values in the same row followed by different letters (z, y) indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences as a result of the TEO treatment. For each treatment, mean values in the same column followed by different letters (a, b, c) denote significant differences ( $P < 0.05$ ) as a result of the refrigeration time. No letters are indicated when significant differences are not found ( $P > 0.05$ ).

<sup>†</sup>TEO concentrations (TEO/squid ring, w/w) employed in the coating medium: 0.000% (C-T; control), 0.010% (T-1), 0.025% (T-2) and 0.050% (T-3).

Only slight differences in the number of anaerobes among batches were detected; thus, the presence of thyme in the coat did not have an effect ( $P > 0.05$ ) on anaerobe growth. Contrary to the case of aerobes, a decreasing mean number of anaerobes with storage time was observed in most batches, and these decreases were significant ( $P < 0.05$ ) in the case of the T-3 batch after processing and storage for 5 days and on day 8 for the remaining sample types (Table 2). As in the case of the aerobe numbers, the anaerobe numbers in all batches could be considered relatively low (scores under 3.20) and be the probable effect derived from the application of MAP conditions, especially of the presence of CO<sub>2</sub> in the packaging atmosphere.

The Enterobacteriaceae counts were markedly decreased ( $P < 0.05$ ) after processing and storage for 5 days in all batches. Such a decrease can be mostly explained as a result of the pre-frying process, as stated earlier. Subsequently (5- to 8-day period), no significant ( $P > 0.05$ ) differences because of storage time were observed, except for the control batch. In addition, no effect ( $P > 0.05$ ) of the thyme addition at any concentration to the coating medium on the Enterobacteriaceae counts was observed (Table 2). As for Enterobacteriaceae, psychrotroph counts showed a marked decrease ( $P < 0.05$ ) after processing and storage for 5 days; then, no significant differences ( $P > 0.05$ ) were observed for this microbial group, a result that may also be explained as an effect of MAP conditions on all kinds of samples.

Accordingly, an inhibitory effect of TEO in the coating medium on the microbiological quality of squid ring products subjected to MAP and refrigeration was not observed. Contrary to our results, the use of thyme extended the shelf life of fresh fish, such as wild and farmed gilthead sea bream (*S. aurata*) fillets, by approximately 5 days as assessed by TVB-N, TMA-N, free amino acid formation and water-holding capacity assays (Attouchi & Sadok, 2010). The presence of TEO has also been reported to improve the microbial quality in terms of microbial counts, TMA-N and TVB-N assessment and the sensory quality of refrigerated ( $4.0 \pm 0.5$  °C) sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets when combined with MAP (Kostaki *et al.*, 2009). This preservation combination (TEO-MAP) led to an improvement in the microbial quality in blue fish burgers stored at 4 °C for 28 days (Del Nobile *et al.*, 2009) and inhibited the microbial activity (microbial count, TMA-N and TVB-N assessment) and sensory quality loss of swordfish (*X. gladius*) during 18 days of storage at 4 °C (Kykkidou *et al.*, 2009). Additionally, the combination of TEO and vacuum packaging of hot smoked rainbow trout (*O. mykiss*) stored at 2 °C was reported to inhibit the microbial activity (in terms of microbial count and TVB-N and TMA-N assessments) (Erkan, 2010).

In previous research, Mejlholm & Dalgaard (2002) found that the addition of OEO and TEO reduced microbial growth in cod (*Gadus morhua*) fillets and extended the shelf life of these fillets during refrigerated

storage (2 °C), and the antimicrobial activity of OEO was higher than that of TEO. However, Harpaz *et al.* (2003) showed that both OEO and TEO additions slowed the spoilage of Asian sea bass (*Lates calcarifer*) during storage at 0–2 °C without showing a differential effect between both types of oils.

In contrast to these reports, the lack of the effect of TEO on the microbial development in pre-fried squid rings observed in our study may be explained as follows: (i) unlike other previous studies, the initial frying step considered in our study might have exerted a negative effect on TEO stability; (ii) unlike other previous studies that considered aerobic storage or vacuum packaging of fish, the squid rings considered in our study were subjected to MAP. The particular atmosphere considered in our study may imply the selection of a different type of spoilage microflora as compared with previous reports, and this might be related to the lack of effect of TEO in our study; and (iii) while most of the previous reports have been focused on fish fillets, the final TEO concentrations in elaborated products such as squid rings might need to be modified because of the potential different level of microbial contamination in this type of products. In all cases, and although these causes may explain the results obtained, the lack of effect of TEO in our study will need an additional research effort.

### Chemical stability

In the oregano experiment (Table 3), lower pH values were obtained at all storage times for the two batches treated with the higher OEO concentrations. The differences in the pH values were significant ( $P < 0.05$ ) on day 7 for the squid rings in the O-3 batch compared with those of the control batch. However, in the thyme experiment (Table 4), a marked tendency could not be discerned when comparing the different batches. With respect to the effect of the storage time, both experiments (Tables 3–4) showed a marked pH increase ( $P < 0.05$ ) after processing and storage until day 3 and day 5 for the oregano and thyme experiments, respectively. After longer storage times, no differences ( $P > 0.05$ ) were observed for each essential oil because of the refrigerated storage conditions. In agreement with our results on the pH in the oregano experiment, other authors have previously reported lower pH values as a result of the OEO treatment of sea bream (*S. aurata*) fillets refrigerated at  $4 \pm 0.5$  °C (Goulas & Kontominas, 2007) and rainbow trout (*O. mykiss*) fillets refrigerated at 4 °C (Mexis *et al.*, 2009). Likewise, previous research has reported no effect of TEO treatment on the pH value when compared with the control; this observation accounts for the

**Table 3** Assessment of chemical quality parameters\* in refrigerated squid rings treated with oregano essential oil (OEO)<sup>†</sup>

Chemical parameter	Storage time (days)	OEO treatment			
		C-O	O-1	O-2	O-3
pH	Raw squid rings	a 6.42 (0.00)	a 6.42 (0.00)	a 6.42 (0.00)	a 6.42 (0.00)
	3	b 7.09 (0.30)	b 7.09 (0.30)	b 6.90 (0.21)	b 6.89 (0.04)
	7	b 7.06 y (0.08)	b 7.06 y (0.08)	b 6.98 zy (0.03)	b 6.87 z (0.10)
	10	b 7.15 (0.19)	b 7.15 (0.19)	b 7.07 (0.07)	b 6.99 (0.04)
	14	b 7.09 (0.06)	b 7.09 (0.06)	b 7.02 (0.19)	b 6.90 (0.13)
Peroxide value (meq oxygen kg <sup>-1</sup> lipids)	Raw squid rings	ab 2.36 (0.62)	c 2.36 (0.62)	b 2.36 (0.62)	a 2.36 (0.62)
	3	a 2.18 y (0.33)	a 0.82 z (0.24)	a 1.43 z (0.11)	a 1.43 z (0.41)
	7	bc 3.79 zy (1.18)	d 3.52 y (0.37)	b 2.16 z (0.50)	a 2.79 zy (1.08)
	10	c 3.90 y (0.21)	b 1.86 z (0.06)	b 2.16 z (0.55)	a 2.03 z (0.39)
	14	d 5.70 y (0.05)	e 5.70 y (0.33)	c 4.80 z (0.25)	b 5.21 z (0.11)
Thiobarbituric acid index (mg malondialdehyde kg <sup>-1</sup> muscle)	Raw squid rings	a 0.53 (0.15)	ab 0.53 (0.15)	a 0.53 (0.15)	a 0.53 (0.15)
	3	ab 0.74 (0.06)	bc 0.74 (0.06)	b 0.79 (0.05)	c 0.79 (0.03)
	7	b 0.78 y (0.04)	b 0.69 z (0.02)	ab 0.73 zy (0.12)	bc 0.75 zy (0.04)
	10	b 0.75 (0.03)	c 0.79 (0.04)	ab 0.74 (0.10)	bc 0.74 (0.04)
	14	b 0.79 y (0.01)	a 0.54 z (0.06)	a 0.65 z (0.05)	ab 0.66 z (0.07)
Fluorescence ratio	Raw squid rings	a 2.10 (0.10)	a 2.10 (0.10)	a 2.10 (0.10)	a 2.10 (0.10)
	3	a 2.15 (0.13)	a 1.98 (0.07)	a 1.98 (0.04)	ab 2.27 (0.29)
	7	b 2.54 (0.11)	b 2.43 (0.05)	b 2.36 (0.08)	b 2.47 (0.27)
	10	c 2.86 y (0.07)	ab 2.24 z (0.21)	ab 2.24 z (0.23)	b 2.44 z (0.11)
	14	d 3.38 y (0.12)	b 2.69 z (0.35)	b 2.43 z (0.12)	b 2.42 z (0.15)

\*Mean values of three independent replicates ( $n = 3$ ); SD are indicated in brackets. For each storage time, mean values in the same row followed by different letters (z, y) indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences as a result of the OEO treatment. For each treatment, mean values in the same column followed by different letters (a–e) denote significant differences ( $P < 0.05$ ) as a result of the refrigeration time. No letters are indicated when significant differences are not found ( $P > 0.05$ ).

<sup>†</sup>OEO concentrations employed as expressed in Table 1.

**Table 4** Assessment of chemical quality parameters\* in refrigerated squid rings treated with oregano essential oil (TEO)<sup>†</sup>

Chemical parameter	Storage time (days)	TEO treatment			
		C-O	O-1	O-2	O-3
pH	Raw squid rings	a 6.32 (0.01)	a 6.32 (0.01)	a 6.32 (0.01)	a 6.32 (0.01)
	5	b 7.47 (0.14)	b 7.57 (0.29)	b 7.38 (0.04)	b 7.45 (0.05)
	8	b 7.47 (0.14)	b 7.37 (0.05)	b 7.45 (0.24)	b 7.47 (0.14)
	12	b 7.48 (0.21)	b 7.46 (0.33)	b 7.59 (0.26)	b 7.48 (0.17)
Peroxide value (meq oxygen kg <sup>-1</sup> lipids)	Raw squid rings	2.42 (0.45)	2.42 (0.45)	2.42 (0.45)	b 2.42 (0.45)
	5	2.38 (1.32)	1.89 (1.00)	1.67 (0.85)	a 1.59 (0.24)
	8	1.95 y (0.11)	2.07 y (0.14)	1.89 y (0.10)	a 1.57 z (0.16)
	12	2.66 y (0.70)	1.97 zy (0.74)	1.89 zy (0.27)	a 1.57 z (0.21)
Thiobarbituric acid index (mg malondialdehyde kg <sup>-1</sup> muscle)	Raw squid rings	a 0.28 (0.04)	a 0.28 (0.04)	a 0.28 (0.04)	0.28 (0.04)
	5	b 0.51 (0.14)	b 0.41 (0.04)	b 0.48 (0.03)	0.45 (0.14)
	8	b 0.53 y (0.10)	b 0.39 zy (0.07)	a 0.33 z (0.03)	0.31 z (0.02)
	12	c 1.64 x (0.33)	c 0.96 y (0.25)	ab 0.41 z (0.16)	0.52 z (0.14)
Fluorescence ratio	Raw squid rings	a 2.26 (0.08)	a 2.26 (0.08)	a 2.26 (0.08)	a 2.26 (0.08)
	5	a 2.32 (0.11)	a 2.41 (0.17)	b 2.42 (0.03)	a 2.33 (0.05)
	8	b 2.61 (0.12)	b 2.84 (0.13)	c 2.75 (0.25)	b 2.70 (0.12)
	12	b 2.82 y (0.15)	b 2.76 zy (0.11)	c 2.68 zy (0.07)	b 2.60 z (0.05)

\*Mean values of three independent replicates ( $n = 3$ ); SD are indicated in brackets. For each storage time, mean values in the same row followed by different letters (z, y, x) indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences as a result of the TEO treatment. For each treatment, mean values in the same column followed by different letters (a, b, c) denote significant differences ( $P < 0.05$ ) as a result of the refrigeration time. No letters are indicated when significant differences are not found ( $P > 0.05$ ).

<sup>†</sup>EO concentrations as expressed in Table 2.

preservation of blue fish burgers during 28 days of storage (Del Nobile *et al.*, 2009) and of swordfish (*X. gladius*) fillets during storage at 4 °C (Kykkidou *et al.*, 2009). However, other authors have reported lower pH values as a consequence of the application of TEO when compared with a control; such research refers to different fish species such as sea bass (*D. labrax*) during refrigerated storage at 4 ± 0.5 °C (Kostaki *et al.*, 2009) and wild and farmed gilthead sea bream (*S. aurata*) fillets stored in ice (Attouchi & Sadok, 2010).

The lipid content of the initial non-fried squid ring samples was 4.4 ± 0.5 and 4.5 ± 0.5 g kg<sup>-1</sup> squid ring for the oregano and thyme experiments, respectively. The lipid content increased for all types of processed material such that the lipid contents were in the 8.0–11.0 and 8.5–11.5 g kg<sup>-1</sup> ranges for the samples corresponding to the oregano and thyme experiments, respectively. The increase in lipid content is likely a result of the frying step (Huidobro *et al.*, 1995; Castrillón *et al.*, 1997). No differences ( $P > 0.05$ ) in the lipid content of the squid rings could be found because of the addition of oregano or thyme or the storage time.

The occurrence of lipid oxidation in the squid rings was assessed via the formation of peroxide, TBARS and interaction compounds. The PV assessment indicated an inhibitory effect of OEO (Table 3), which was especially remarkable for the two batches with the higher OEO concentrations. This preservation effect could also be observed for the secondary (TBARS) and tertiary

(fluorescence ratio) lipid oxidation product formation, although in these cases, no differences could be established among the different OEO concentrations tested (Table 3). In all cases, the values determined for the PV and the TBA-i (below 6.0 and 0.80, respectively) can be considered relatively low.

Other authors have reported that the application of OEO has positive effects when combined with other preservation techniques. Thus, an inhibitory effect on lipid oxidation development (TBARS assessment) was observed when OEO was applied to salted sea bream (*S. aurata*) stored at 4 ± 0.5 °C (Goulas & Kontominas, 2007) and salted rainbow trout (*O. mykiss*) fillets stored at 4 °C (Pyrgotou *et al.*, 2010). The combination of OEO and an oxygen absorber also reduced the rate of lipid oxidation (peroxide value and TBARS assessment) in rainbow trout (*O. mykiss*) fillets stored at 4 °C (Mexis *et al.*, 2009).

An inhibitory effect of thyme oil on the lipid oxidation of squid rings was observed (Table 4). Thus, the highest thyme concentration tested (T-3 condition) decreased the formation of peroxides (PV), TBARS and fluorescent compounds as compared with the control batch. Likewise, the T-1 and T-2 batches also exhibited some inhibitory effect; this effect was significant ( $P < 0.05$ ) only for TBARS formation on day 12 and on both days 8 and 12 for the T-1 and T-2 batches, respectively.

In agreement with our results, other authors have reported a partial inhibition of lipid oxidation because

of the addition of TEO. For example, the use of TEO extended the lipid stability of wild and farmed gilthead sea bream (*S. aurata*) fillets by approximately 5 days during chilled storage (Attouchi & Sadok, 2010). Likewise, the combination of TEO and MAP was also found profitable when compared with MAP alone; thus, lipid oxidation was inhibited in sword fish (*X. gladius*) fillets at 4 °C during 18 days of refrigerated storage (Kykkidou *et al.*, 2009) and in hot smoked rainbow trout (*O. mykiss*) stored at 2 °C (Erkan, 2010). Finally, thyme oil was also tested as a component of a biodegradable film including hake (*Merluccius capensis*) proteins at different concentrations; the addition of TEO reduced the film thickness and water vapour permeability and exerted a significant antioxidant activity (Pires *et al.*, 2011).

### Conclusions

The present study provides the first approach to the employment of two important essential oils (OEO and TEO) with the aim of extending the period of good quality of an RTE product, pre-fried squid ring, commercialised under MAP and refrigeration conditions. It can be concluded that there is a marked ( $P < 0.05$ ) inhibitory effect on microbial activity (aerobes, anaerobes, Enterobacteriaceae and psychrotrophs) because of the addition of OEO to the coating medium at all OEO concentrations tested, and this effect was more relevant for the highest oregano concentration (0.050%). The addition of OEO also provoked the inhibition of lipid oxidation, as determined by the formation of peroxides, TBARS and interaction compounds. In contrast, the TEO experiment demonstrated that the addition of TEO to the coating medium did not result in an inhibitory effect ( $P > 0.05$ ) of the microbial activity in RTE squid rings, although some inhibitory effect on lipid oxidation development could be noted, especially when using the highest (0.050%) TEO concentration.

### Acknowledgments

The authors thank Mrs Estefanía Nova, Mr Marcos Trigo and Mrs Cristina Nine for their excellent technical assistance during the present investigation.

### References

- Ashie, I., Smith, J. & Simpson, B. (1996). Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **36**, 87–121.
- Attouchi, M. & Sadok, S. (2010). The effect of powdered thyme sprinkling on quality changes of wild and farmed gilthead sea bream fillets stored in ice. *Food Chemistry*, **119**, 1527–1534.
- Aubourg, S. & Gallardo, J. M. (1997). Fluorescence changes in amine model systems related to fish deterioration. *International Journal of Food Science and Technology*, **32**, 153–158.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J., Villa, T. & Barros-Velázquez, J. (1998). Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *Journal of Food Protection*, **61**, 608–615.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J., Villa, T. & Barros-Velázquez, J. (1999). Histamine and cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen albacore (*Thunnus alalunga*). *Journal of Food Protection*, **62**, 933–939.
- Bligh, E. & Dyer, W. (1959). A rapid method of total extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**, 911–917.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**, 223–253.
- Castrillón, A., Navarro, P. & Álvarez-Pontes, E. (1997). Changes in chemical composition and nutritional quality of fried sardine (*Clupea pilchardus*) produced by frozen storage and microwave reheating. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **75**, 125–132.
- Chapman, R. & McKay, J. (1949). The estimation of peroxides in fats and oils by the ferric thiocyanate method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **26**, 360–363.
- Corbo, M. R., Di Giulio, S., Conte, A., Speranza, B., Sinigaglia, M. & Del Nobile, M. (2009). Thymol and modified atmosphere packaging to control microbiological spoilage in packed fresh cod hamburgers. *International Journal of Food Science and Technology*, **44**, 1553–1560.
- Del Nobile, M. A., Corbo, M. R., Speranza, B., Sinigaglia, M., Conte, A. & Caroprese, M. (2009). Combined effect of MAP and active compounds on fresh blue fish burger. *International Journal of Food Microbiology*, **135**, 281–287.
- Dziezak, J. (1989). Spice. *Food Technology*, **43**, 102–116.
- Erkan, N. (2010). The effect of thyme and garlic oil on the preservation of vacuum-packaged hot smoked rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food and Bioprocess Technology*, **????**, **????**–**????**. DOI: 10.1007/s11947-010-0412-7.
- FAO (2007a). Fishery statistics. Capture Production. In: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (edited by **????** **????** & **????** **????**). Pp. 342–350. **Vol. 100/1**. Rome, Italy: Yearbook 2005.
- FAO (2007b). Fishery statistics. Commodities. In: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (edited by **????** **????** & **????** **????**). Pp. 191–192. **Vol. 101**. Rome, Italy: Yearbook 2005.
- Gitrakou, V., Kykkidou, S., Papavergou, A., Kontominas, M. G. & Savvaidis, I. N. (2008). Potential of oregano essential oil and MAP to extend the shelf life of fresh swordfish: a comparative study with ice storage. *Journal of Food Science*, **73**, 167–173.
- Gilbert, R., de Louvois, J., Donovan, T. *et al.* (2000). Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. *Communicable Disease and Public Health*, **3**, 163–167.
- Gopinath, S. P., Kochery Anthony, M. X., Nagarajarao, R. C., Jaganath, B. & Krishnaswamy, S. G. T. (2007). Standardisation of process parameters for ready-to-eat squid masala in indigenous polymer-coated tin-free steel cans. *International Journal of Food Science and Technology*, **42**, 148–1155.
- Goulas, A. E. & Kontominas, M. G. (2007). Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, **100**, 287–296.
- Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V. & Gelman, A. (2003). Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *Journal of Food Protection*, **66**, 410–417.
- Huidobro, A., Gómez-Guillén, C. & Borderías, J. (1995). Frozen storage of dressed and pre-fried portions of minced sardine muscle. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **200**, 178–181.

- 1 Kostaki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, I. N. & Kontominas, M. G.  
2 (2009). Combined effect of MAP and thyme essential oil on the  
3 microbiological, chemical and sensory attributes of organically  
4 aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiology*, **26**, 475–482.
- 5 Kykkidou, S., Giatrakou, V., Papavergou, A., Kontominas, M. G. &  
6 Savvaidis, I. N. (2009). Effect of thyme essential oil and packaging  
7 treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at  
8 4°C. *Food Chemistry*, **115**, 169–175.
- 9 Manrique, J. & Jensen, H. H. (2001). Spanish household demand for  
10 seafood. *Journal of Agricultural Economics*, **52**, 23–37.
- 11 Mejlholm, O. & Dalgaard, P. (2002). Antimicrobial effect of essential  
12 oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum*  
13 in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, **34**, 27–31.
- 14 Mexis, S. F., Chouliara, E. & Kontominas, M. G. (2009). Combined  
15 effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life  
16 extension of rainbow trout fillets stored at 4°C. *Food Microbiology*, **26**, 598–605.
- 17 Olafsdóttir, G., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, J. et al. (1997).  
18 Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science and Technology*, **8**, 258–265.
- 19 Ozen, B. & Floros, J. (2001). Effects of emerging food processing  
20 techniques on the packaging materials. *Trends in Food Science and Technology*, **12**, 60–67.
- 21 Pires, C., Ramos, C., Teixeira, G. et al. (2011). Characterization of  
22 biodegradable films prepared with hake proteins and thyme oil.  
23 *Journal of Food Engineering*, **105**, 422–428.
- 24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56
- Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A. & Savvaidis, I. (2010).  
Quality assessment of salted, modified atmosphere packaged rainbow trout under treatment with oregano essential oil. *Journal of Food Science*, **75**, M406–M410.
- Sanjuás-Rey, M., García-Soto, B., Barros-Velázquez, J., Fuertes-Gamundi, J. & Aubourg, S. (2011). Effect of a two-step natural organic acid-treatment on microbial activity and lipid damage during blue whiting (*Micromesistius poutassou*) chilling. *International Journal of Food Science and Technology*, **46**, 1021–1030.
- Sivertsvik, M., Jeksrud, W. & Rosnes, T. (2002). A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science and Technology*, **37**, 107–127.
- Toledo-Flores, L. & Zall, R. (1992). Methods for extending the storage life of fresh tropical fish. In: *Advances in Seafood Biochemistry* (edited by G. Flick & R. Martin). Pp. 233–243. Lancaster, PA: Technomic Publishing.
- Vyncke, W. (1970). Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette Seifen Anstrichmittel*, **72**, 1084–1087.
- Whittle, K., Hardy, R. & Hobbs, G. (1990). Chilled fish and fishery products. In: *Chilled Foods. The State of the Art* (edited by T. Gormley). Pp. 87–116. New York: Elsevier Applied Science.
- Yanishlieva, N., Marinova, E. & Pokorný, J. (2006). Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **108**, 776–793.



## **CAPITULO 7: Efecto de aceites esenciales de orégano y tomillo sobre la calidad química y microbiológica de anillas de calamar precocinadas conservadas en refrigeración (4°C).**

Esta fase final del estudio se corresponde con el quinto objetivo de este trabajo de investigación consistió en evaluar el efecto combinado de aceites esenciales naturales de orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) con un tratamiento bajo atmósfera protectora para anillas de calamar precocinadas lista para ser consumidas (“ready to eat”, RTE).

Los aceites esenciales fueron añadidos en el medio de cobertura empleado en la elaboración del producto comercial de calamar. Se emplearon las siguientes concentraciones: 0,010%, 0,025% y 0,050% (p/p, aceite/calamar).

### **Desarrollo de la acción microbiana**

El análisis comparativo de la evolución de la microbiota durante el periodo de refrigeración de las anillas de calamar precocinado demostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en los recuentos de aerobios mesófilos para las tres concentraciones de orégano empleadas con respecto a las muestras control.

Es destacable cómo los recuentos de aerobios mesófilos determinados después de 14 días de almacenamiento, resultaron ser menores en 3 unidades logarítmicas en los lotes tratados con orégano, mientras que los recuentos obtenidos en el lote control a día 6 alcanzaron 6 unidades logarítmicas.

Con respecto al desarrollo de bacterias anaerobias, se encontraron valores bajos en los lotes de calamar tratados con orégano a medida que avanzó el

tiempo de almacenamiento (días 10-14), en comparación con el lote control. Este efecto inhibitor resultó ser mayor a día 10 para las dos concentraciones mayores de orégano (condiciones O-2 y O-3).

Es destacable que la concentración final de anaerobios no superó las 2 unidades logarítmicas en los lotes AEO, mientras que en el lote control se alcanzaron valores de 5 unidades logarítmicas a día 10.

Con respecto a *Enterobacteriaceae*, las diferencias encontradas a día 7 entre los tres lotes tratados con orégano y el lote control fueron 1,56 unidades logarítmicas menores en los lotes tratados con orégano, mientras que para el lote control se obtuvieron 2,56 UFC/g. A día 14, también se observaron diferencias entre lote control y los lotes O-2 y O-3. Al igual que en el caso de los organismos aerobios y anaerobios, la evaluación de *Enterobacteriaceae* en las muestras de calamar tratados con orégano, indica que los valores decrecen ( $P < 0,05$ ) después de ser tratados y almacenados durante 3 días.

Las muestras crudas fueron analizadas antes del paso de pre-fritura, por lo que la disminución del número de microorganismos determinados en todos los lotes a día 3 puede explicarse debido al resultado de esta etapa de fritura. Esta etapa es requerida para la elaboración industrial de los productos RTE. Sin embargo, cuando se compararon los lotes precocinados (periodo entre los días 3-14), las diferencias estadísticas encontradas entre los lotes AEO y el lote control para todos los grupos microbiológicos evidenciaron el efecto inhibitor derivado de la presencia de este aceite esencial.

Las diferencias se encontraron después de los días 10 y 14 de almacenamiento en el caso de considerar los microorganismos psicrófilos. Así, a

día 10 se obtuvieron recuentos menores en los lotes de AEO al ser comparados con el lote control. En este día, se observaron diferencias entre el lote control y los tres lotes de orégano (O-1, O-2, O-3).

En conclusión, el AEO incluido en el medio de cobertura de las anillas de calamar tuvo un marcado efecto inhibitor en el desarrollo microbiano. En nuestro estudio, se incluyó una estrategia EAM (envasado en atmósfera modificada) y almacenamiento en refrigeración, combinados con el tratamiento AEO.

Los resultados obtenidos están en acuerdo con estudios previos donde el AEO mostró un efecto positivo cuando era combinado con otras tecnologías de conservación. Por ejemplo, el efecto inhibitor del AEO en el desarrollo de la actividad microbiana (bases volátiles totales y valores de TMA) fue estudiado y observado en la combinación AEO-EAM en besugo (*Sparus aurata*) mantenido bajo condiciones de refrigeración de  $(4\pm 0,5^{\circ}\text{C})$  (Goulas & Kontominas, 2007).

Asimismo, Giatrakou y col. (2008) aportaron buenos resultados en recuentos microbianos y evaluación de aminas volátiles por la combinación de AEO-EAM en filetes de pez espada (*Xiphias gladius*) almacenados a  $4^{\circ}\text{C}$ . Recientemente, Pyrgotou y col. (2010) demostraron el efecto inhibitor causado por la combinación de AEO y EAM en la actividad microbiana (determinada por medio de recuento microbiológico y formación de aminas volátiles) en filetes salados de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) almacenados a  $4^{\circ}\text{C}$ .

En otro tipo de combinación (AEO junto a un embalaje con propiedades de absorción de oxígeno), Mexis y col. (2009) demostraron que la actividad microbiológica fue parcialmente inhibida (evaluación de recuentos microbianos y

aminas volátiles) durante el periodo de almacenamiento de filetes de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) a 4°C.

Con respecto al experimento con aceite esencial de tomillo (AET), la valoración del crecimiento microbiano en las anillas de calamar precocinadas no mostró diferencias significativas en la evolución de organismos aerobios mesófilos con la adición de AET en el medio de cobertura. Se observó una disminución importante ( $P < 0,05$ ) en todos los casos después del procesado, es decir, de la fritura y durante los días de almacenamiento.

Así, para todos los lotes de calamar, se observó un aumento en el recuento de aerobios con el tiempo de almacenamiento en el periodo comprendido entre los días 5-12. Sin embargo, se observó un destacado descenso ( $P < 0,05$ ) en todos los casos durante los días de almacenamiento 0-5 debido al procesamiento y al almacenamiento. En todos los lotes, el número de colonias de aerobios fue considerado como relativamente bajo (recuentos menores a 3,50 unidades logarítmicas) al final del experimento.

Con respecto a organismos anaerobios, se detectaron ligeras diferencias entre lotes, por lo que el proceso de cobertura con tomillo no tuvo efecto ( $P > 0,05$ ) en el crecimiento de anaerobios. Al contrario que en el caso de aerobios, se observó una disminución en el crecimiento de anaerobios en todos los lotes; este descenso resultó ser significativo ( $P < 0,05$ ) a día 5 ( $P < 0,05$ ) en el caso del lote T-3, del mismo modo, que a día 8, se observó esta disminución en todos los lotes.

Al igual que en el caso de los organismos aerobios, el recuento de organismos anaerobios se consideró relativamente bajo (recuentos inferiores a 3,20 unidades logarítmicas) como resultado del efecto derivado de la aplicación

de las condiciones de EAM, especialmente de la presencia de CO<sub>2</sub> en la atmósfera de envasado.

Los recuentos de *Enterobacteriaceae* decrecieron destacablemente ( $P < 0,05$ ) después del procesamiento y almacenamiento durante los 5 días de almacenamiento para todos los lotes. Esta disminución puede ser explicada como resultado del proceso de pre-fritura, como ya se ha comentado anteriormente. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) debido al periodo de almacenamiento durante el periodo comprendido entre los días 5-8, exceptuando al lote control. En definitiva, no se observaron efectos debidos a la adición de tomillo en el medio de cobertura para *Enterobacteriaceae*.

Se detectó un marcado descenso para organismos psicrófilos ( $P < 0,05$ ) después del procesado en los primeros días de almacenamiento, mientras que no se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) después del día 5 de almacenamiento; este resultado también puede ser explicado como un efecto de las condiciones de EAM sobre todas las muestras.

En conclusión, la inclusión de AET en el medio de cobertura no reflejó ningún efecto inhibitor sobre el desarrollo de los distintos grupos de microorganismos estudiados en las anillas de calamar sometidas a EAM y refrigeración.

Al contrario de los resultados aquí obtenidos, el uso de tomillo extendió la vida útil del pescado fresco, como la dorada (*Sparus aurata*), aproximadamente 5 días, evaluado mediante los índices N-TVB, N-TMA, formación de amino ácidos libres y capacidad de retención de agua (Attouchi & Sadok, 2010).

La presencia de AET demostró mejorar la calidad microbiológica en términos de recuentos microbianos, valores de N-TMA y N-TVB, y calidad sensorial en refrigeración ( $4,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) en filetes de lubina (*Dicentrarchus labrax*) en combinación con EAM (Kostaki y col., 2009). Esta combinación de conservación (AET-EAM) permitió mejorar la calidad microbiológica en hamburguesa de pescado azul almacenada a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 28 días (Del Nobile y col., 2009) e inhibir la actividad microbiana (recuentos microbiológicos, valores de N-TMA y N-TVB) y pérdida de la calidad durante 18 días de almacenamiento en pez espada (*Xiphias gladius*) a  $4^{\circ}\text{C}$  (Kykkidou y col., 2009). Además, la combinación de AET y envasado al vacío de trucha arcoíris ahumada (*Oncorhynchus mykiss*) almacenada a  $2^{\circ}\text{C}$  inhibió la actividad microbiana (en términos de recuentos microbiológicos y valores de N-TMA y N-TVB) (Erkan, 2010).

Investigaciones anteriores (Mejlholm y Dalgaard, 2002) hallaron que la adición de AEO y AET reduce el crecimiento de microorganismos en filetes de bacalao (*Gadus morhua*) y su vida útil se incrementa durante el periodo de almacenamiento en refrigeración ( $2^{\circ}\text{C}$ ), con una actividad antimicrobiana mayor en el caso de AEO que para AET. Sin embargo, Harpaz y col. (2003) mostraron que tanto AET como AEO añadidos a barramundi (*Lates calcarifer*) durante el almacenamiento a  $2^{\circ}\text{C}$  retardó su deterioro, sin encontrar diferencias entre ambos tipos de aceites.

En contraste a estas investigaciones, la falta de efecto observada en AET sobre el desarrollo microbiológico de las anillas de calamar pre-cocinadas puede ser explicada como: (i) a diferencia de otros estudios anteriores, el paso inicial de fritura considerado en nuestro estudio podría haber ejercido un efecto negativo

sobre la estabilidad de TEO; (ii) a diferencia de estudios anteriores, donde fueron consideradas condiciones de almacenamiento aerobias o al vacío, en este estudio las anillas de calamar consideradas fueron sometidas a EAM. La particular atmósfera considerada en este estudio pudo implicar la selección de un tipo de microflora responsable del deterioro diferente a la de los estudios anteriores, y esto podría estar relacionado con la falta de efecto de AET en este estudio; y (iii) mientras la mayor parte de las investigaciones anteriores han estado enfocadas en filetes de pescado, la concentración final de AET en los productos elaborados como las anillas de calamar, necesitan ser modificadas debido a los diferentes niveles de contaminación microbiana posibles. En todos los casos, y aunque estas causas pueden explicar los resultados obtenidos, la ausencia de efecto de AET en nuestro estudio necesita un esfuerzo adicional de investigación.

Basándonos en nuestros resultados, se encontró un mejor efecto de conservación en AEO comparado con AET cuando son aplicados en anillas de calamar.

#### **Análisis químico de la alteración microbiana**

En lo que concierne al análisis químico del experimento que incluye el tratamiento a base de orégano, se han obtenido valores de pH bajos en los dos lotes con concentración de AEO alta. Las diferencias en el valor de pH fueron significativas ( $P < 0,05$ ) a día 7 para el lote de calamar O-3 en comparación con el lote control. Sin embargo, para el experimento con tomillo, esta diferencia no se pudo discernir a la hora de comparar los diferentes lotes. Con respecto al efecto del tiempo de almacenamiento, ambos experimentos mostraron un marcado

incremento ( $P < 0,05$ ) de pH después del procesado y almacenamiento desde el día 3 a día 5 para los lotes de orégano y tomillo.

Después de un largo periodo de almacenamiento se observaron ligeras diferencias para cada lote de aceite esencial debidas a las condiciones de refrigeración. Conforme a los resultados obtenidos de pH en el experimento de orégano, otros autores han encontrado valores de pH bajos como consecuencia de un tratamiento de AEO en filetes de dorada (*Sparus aurata*) refrigerada a  $4,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  (Goulas y Kontominas, 2007) y filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) refrigerada a  $4^\circ\text{C}$  (Mexis y col., 2009). De igual modo, otros autores han descrito que el tratamiento con AET no tuvo ningún efecto sobre los valores de pH en hamburguesas de pescado azul almacenadas durante 28 días (Del Nobile y col., 2009), ni sobre filetes de pez espada (*Xiphias gladius*) durante el almacenamiento a  $4^\circ\text{C}$  (Kykkidou y col., 2009). Por otro lado, otros autores han descrito valores de pH bajos como consecuencia de la aplicación de AET a diferentes especies marinas como lubina (*Dicentrarchus labrax*) refrigerada a  $4 \pm 0,5^\circ\text{C}$  (Kostaki y col., 2009) y filetes de dorada (*Sparus aurata*) almacenadas en hielo (Attouchi y Sadok, 2010).

#### **Desarrollo de la oxidación lipídica**

En cuanto al contenido lipídico, las muestras de calamar sin cocinar contenían  $4,4 \pm 0,5$  and  $4,5 \pm 0,5$  g  $\text{kg}^{-1}$  en músculo para los experimentos con orégano y tomillo, respectivamente. El contenido lipídico incrementó para todos los materiales procesados, donde los valores obtenidos se incluyeron en los rangos 8,0-11,0 y 8,5-11,5 g  $\text{kg}^{-1}$  en músculo para las muestras de orégano y tomillo, respectivamente. El incremento en contenido lipídico puede ser

interpretado como resultado del proceso de fritura (Huidobro y col., 1995; Castrillón y col., 1997). No se encontraron diferencias ( $P>0,05$ ) en contenido lipídico de las anillas de calamar por la adición de orégano o de tomillo o del tiempo de almacenamiento.

El desarrollo de la oxidación lipídica en anillas de calamar fue evaluado en forma de peróxidos, TBARS e interacción de los compuestos de formación. La evaluación de PV puso de manifiesto el efecto inhibitorio de AEO, siendo especialmente destacable en los lotes con mayores concentraciones de AEO. Este efecto de conservación pudo ser observado en la formación de productos de oxidación lipídica secundaria (TBARS) y terciaria (nivel de fluorescencia). Aun así, no se establecieron diferencias entre las distintas concentraciones de AEO analizadas. En todos los casos, los valores determinados para PV y TBA-i (por debajo de 6,0 y 0,80, respectivamente) pueden considerarse bajos

Otros autores han demostrado los efectos positivos de la combinación de AEO con otras técnicas de conservación. Así, se ha observado un efecto inhibitorio de la oxidación lipídica (valores de TBARS) cuando se aplicó AEO a dorada (*Sparus aurata*) salada y mantenida a  $4\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  (Goulas y Kontominas, 2007), así como a trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) mantenida a  $4^{\circ}\text{C}$  en combinación con MAP (Pyrgotou y col., 2010).

La combinación de AEO y un embalaje susceptible de absorber oxígeno también ralentizó la oxidación lipídica (valores de peróxidos y medidas de TBARS) en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) almacenada a  $4^{\circ}\text{C}$  (Mexis y col., 2009). Se observó un efecto inhibitorio en la oxidación lipídica de las anillas de calamar tratadas con aceite de tomillo. Así, a mayor concentración de tomillo (T-3) resultó

ser menor la formación de peróxidos, TBARS y compuestos fluorescentes en comparación con el lote control. De manera análoga, los lotes T-1 y T-2 presentaron un pequeño efecto inhibitorio; este efecto fue significativo ( $P < 0,05$ ) para la formación de TBARS a día 12 para T-1 y los días 8 y 12 para T-2.

En consonancia a estos resultados, otros autores han reportado la inhibición parcial de la oxidación lipídica debido a la adición de AET. Por ejemplo, el uso de AET, incrementó la estabilidad lipídica de filetes de dorada (*S. aurata*) durante aproximadamente 5 días de almacenamiento en refrigeración (Attouchi & Sadok, 2010).

Además la combinación de AET con EAM resultó ser adecuada comparada con el empleo de AMP en solitario; así, se inhibió la oxidación lipídica en filetes de pez espada (*Xiphias gladius*) conservados a 4°C durante 18 días (Kikkidou y col., 2009) y en trucha arcoíris ahumada (*Oncorhynchus mykiss*) almacenada a 2°C (Erkan, 2010).

Finalmente, también se ensayó el aceite de tomillo como componente de un film biodegradable que incluía proteínas de merluza (*Merluccius capensis*) a diferentes concentraciones. Así, se observó que el tomillo empleado como aditivo proporcionaba una reducción del grosor del film, un descenso de la permeabilidad del vapor de agua y una actividad antioxidante muy significativa (Pires y col., 2011).

---

**REFERENCIAS**

---

- Alford, J. A. & Pierce, D.A.** 1961. Lipolytic activity of microorganisms at low and intermediate temperatures. III. Activity of microbial lipases at temperatures below 0°C. *Journal of Food Science*, **26**, 518-524.
- Ashie, I., Smith, J. & Simpson, B.** 1996. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **36**, 87–121.
- Attouchi, M. & Sadok, S.** 2010. The effect of powdered thyme sprinkling on quality changes of wild and farmed gilthead sea bream fillets stored in ice. *Food Chemistry*, **119**, 1527-1534
- Aubourg, S.** 1993. Review: Interaction of malondialdehyde with biological molecules: new trends about reactivity and significance. *International Journal of Food Science and Technology*, **28**, 323–335.
- Aubourg, S., Medina, I. & Gallardo, J.** 1998. Quality assessment of blue whiting (*Micromesistius poutassou*) during chilled storage by monitoring lipid damages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 3662–3666.
- Aubourg S.** 2001. Damage detection in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) during chilled storage. *Journal of the American Oil Chemistis Society*, **78**, 857-862
- Aubourg S & Ugliano M.** 2002. Effect of brine pre-treatment on lipid stability of frozen horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *European Food Research and Technolpgy*, **215**, 91-95.
- Aubourg, S., Pérez-Alonso, F. & Gallardo, J.** 2004. Studies on rancidity inhibition in frozen horse mackerel (*Trachurus trachurus*) by citric and ascorbic acids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **106**, 232–240.
- Aubourg, S., Lago, H., Sayar, N. & González, R.** 2007. Lipid damage during frozen storage of gadiform species captured in different seasons. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **109**, 608–616.
- Badii, F. & Howell, N.** 2002. Effect of antioxidants, citrate, and cryoprotectants on protein denaturation and texture of frozen cod (*Gadus morhua*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 2053–2061.

**Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. & Vidal- Carou, M. C.** 2002. Chemical and sensory changes in Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) under refrigeration (6–8°C) and stored in ice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 6504–6510.

**Barros-Velázquez, J., Gallardo, J. M., Calo, P. & Aubourg, S. P.** 2008. Enhanced quality and safety during on-board chilled storage of fish species captured in the Grand Sole North Atlantic fishing bank. *Food Chemistry*, **106**, 493-500.

**Bennour, M., El Marrakchi, A., Bouchriti, N., Hamama, A. & El Ouadaa, M.** 1991. Chemical and microbiological assessment of mackerel (*Scomber scombrus*) stored in ice. *Journal of Food Protection*, **784**,789-792.

**Campos, C., Rodríguez, O., Losada, V., Aubourg, S. & Barros-Velázquez, J.** 2005. Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*Sardina pilchardus*). *International Journal of Food Microbiology*, **103**, 121–130.

**Castrillón, A., Navarro, P. & Álvarez-Pontes, E.** 1997. Changes in chemical composition and nutritional quality of fried sardine (*Clupea pilchardus*) produced by frozen storage and microwave reheating. *Journal of the Science Food and Agriculture*, **75**, 125-132.

**Chen, H. H., Chiu, E. M. & Huang, J. R.** 1997. Color and gel forming properties of horse mackerel (*Trachurus japonicus*) as related to washing conditions. *Journal of Food Science*, **62**, 985–991.

**Civera, T., Turi, R., Bisio, C., Parisi, E. & Fazio, G.** 1993. Sensory and chemical assessment of marine teleosteans. Relationship between total volatile basic nitrogen, trimethylamine and sensory characteristics. *Sciences des Aliments*, **13**, 109-117.

**Da Silva, M. V., Gibbs, P. A. & Kirby, R. M.** 1998. Sensorial and microbial effects of gaseous ozone on fresh scad (*Trachurus trachurus*). *Journal of Applied Microbiology*, **84**, 802–810.

**Dagbjartson, B.** 1975. Utilization of blue whiting, *Micromesistius poutassou*, for human consumption. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **32**, 747–751.

- Dalgaard, P.** 2009. Seafood Spoilage and Safety Predictor (SSSP) Predictive Microbiology Version 3.1. Lyngby, Denmark: National Institute of Aquatic Resources (DTU Aqua), Technical University of Denmark.
- Del Nobile, M. A., Corbo, M. R., Speranza, B., Sinigaglia, M., Conte, A. & Caroprese, M.** 2009. Combined effect of MAP and active compounds on fresh blue fish burger. *International Journal of Food Microbiology*, **135**, 281-287.
- Dondo, A. C., Nachtman, C., Doglione, L., Rosso, A. & Genetti, A.** 1992. Foods: their preservation by combined use of refrigeration and ozone. *Ingenieria Alimentaria y Conserve Animale*, **8**, 16–25.
- Erkan, N.** 2003. Treatment of fillets (*Scomber colias* and *Mugil cephalus*) with sodium lactate and propyl gallate: influence on shelf life and quality. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **54**, 60–63.
- Erkan, N.** 2010. The Effect of Thyme and Garlic Oil on the Preservation of Vacuum-Packaged Hot Smoked Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food and Bioprocess Technology*. DOI: 10.1007/s11947-010-0412-7.
- Fagan, J., Gormley, R. & Mhuircheartaigh, M.** 2003. Effect of freeze-chilling, in comparison with fresh, chilling and freezing, on some quality parameters of raw whiting, mackerel, and salmon portions. *Lebensm Wissen Technol.*, **36**, 647-655.
- Fernández-Salguero, J. & Mackie, I.** 1987. Comparative rates of spoilage of fillets and whole fish during storage of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and herring (*Clupea harengus*) as determined by the formation of non-volatile and volatile amines. *International Journal of Food Science and Technology*, **22**, 385–390.
- Figuroa, G., Galeno, H., Troncoso, M. & Aguilera, J.M.** 1990. Analysis of the microbial flora of jack mackerel (*Trachurus murphyi*) minced products. *Sciences des Aliments*, **10**, 907–912.
- Giatrakou, V., Kykkidou, S., Papavergou, A., Kontominas, M. & Savvaidis, I.** 2008. Potential of oregano essential oil and MAP to extend the shelf life of fresh swordfish: A comparative study with ice storage. *Journal of Food Science*, **73**, 167-173.
- Gogus, U., Bozoglu, F. & Yurdugul, S.** 2006. Comparative effects of lactic acid, nisin, coating combined and alone applications on some postmortem quality criteria of refrigerated *Sardina pilchardus*. *Journal of Food Quality*, **29**, 658–671.

**Goulas, A. & Kontominas, M.** 2007 Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, **100**, 287-296.

**Gram, L. & Huss, H.** 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, **33**, 121–137.

**Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V. & Gelman, A.** 2003. Effects of Herbal Essential Oils Used To Extend the Shelf Life of Freshwater-Reared Asian Sea Bass Fish (*Lates calcarifer*). *Journal of Food Protection*, **66**, 410–417.

**Hebard, C. E., Flick, G. J. & Martin, R. E.** 1982. Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shellfish. En: Chemistry and biochemistry of marine food products. (Eds.) R. E. Martin, G. J. Flick, C. E. Hebard, & D. R. Ward, Westport CT: Avi Publishing, pp. 149-304.

**Howell, N.** 1995. Interaction of proteins with small molecules. En: Ingredient Interactions – Effects on Food Quality. (Ed.) Gaonkar, New York, USA, Marcel Dekker, pp. 269–289.

**Howgate, P.** 2006. A review of the kinetics of degradation of inosine monophosphate in some species of fish during chilled storage. *International Journal of Food Science & Technology*, **41**, 341–353.

**Huidobro, A., Gómez-Guillén, C. & Borderías, J.** 1995. Frozen storage of dressed and pre-fried portions of minced sardine muscle. *Z Lebensm Unters Forsch*, **200**, 178-181.

**Hwang, K. & Regenstein, J.** 1988. Protection of menhaden mince lipids from rancidity during frozen storage. *Journal of Food Science*, **45**, 1120–1124.

**Ingemansson, T., Kaufmann, P. & Ekstrand, B.** 1995. Multivariate evaluation of lipid hydrolysis and oxidation data from light and dark muscle of frozen stored rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 2046–2052.

**Jhaveri, S., Leu, S. & Constantinides, S.** 1982. Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*, L.): Shelf life in ice. *Journal of Food Science*, **47**, 1808-1810.

**Khalil, A. & Mansour, E.** 1998. Control of lipid oxidation in cooked and uncooked refrigerated carp fillets by antioxidant and packaging combinations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 1158–1162.

- Kilinc, B., Cakli, S., Dincer, T. & Tolasa, S.** 2009. Microbiological, chemical, sensory, color, and textural changes of rainbow trout fillets treated with sodium acetate, sodium lactate, sodium citrate, and stored at 4 °C. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **18**, 3-17.
- Kim, C., Hearnberger, J. & Eun, J.** 1995. Gram-negative bacteria in refrigerated catfish fillets treated with lactic culture and lactic acid. *Journal of Food Protection*, **58**, 639-643.
- Kim, J., Yousef, A. & Dave, S.** 1999. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. *Journal of Food Protection*, **62**, 1071–1087.
- Kim, T. J., Silva, J. L., Chamul, R. S. & Chen, T. C.** 2000. Influence of ozone, hydrogen peroxide or salt on microbial profile, TBARS and color of channel catfish fillets. *Journal of Food Science*, **65**, 1210–1213.
- Kostaki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, I.N. & Kontominas, M.G.** 2009. Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiology*, **26**, 475-482.
- Kötters, J., Pradur, A., Skura, B., Rosenthal, H., Black, E. A. & Rodrigues-Lopez, J.** 1997. Observations and experiments on extending shelf life of rockfish (*Sebastes spp*) products with ozone. *Journal of Applied Ichthyology*, **13**, 1–8.
- Krzyzy-nowek, J. & Wiggin, K.** 1979. Seasonal variation and frozen storage stability of blue mussels (*Mytilus edulis*). *Journal of Food Science*, **44**, 1644–1645.
- Kuda, T., Matsumoto, C. & Yano, T.** 1996. Changes in acid and alkaline phosphatase activities during the spoilage of raw muscle from horse mackerel (*Trachurus japonicus*) and gurnard (*Lepidotriga microptera*). *Food Chemistry*, **76**, 443-447.
- Kykkidou, S., Giatrakou, V., Papavergou, A., Kontominas, M. G. & Savvaidis, I. N.** 2009. Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4°C. *Food Chemistry*, **115**, 1, 169-175.
- Labuza T.** 1971. Kinetics of lipid oxidation in foods. *CRC Critical Reviews in Food Science and Technology*, **2**, 355-405.

**Losada, V., Piñeiro, C., Barros-Velázquez, J., & Aubourg, S.** 2005. Inhibition of chemical changes related to freshness loss during storage of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in slurry ice. *Food Chemistry*, **93**, 619-625.

**Lugasi, A., Losada, V., Hóvári, J., Lebovics, V., Jakóczy, I. & Aubourg, S.** 2007. Effect of pre-soaking whole pelagic fish in a plant extract on sensory and biochemical changes during subsequent frozen storage. *Food Science and Technology*, **40**, 930-936.

**Mackie, I.** 1993. The effects of freezing on flesh proteins. *Food Reviews International*, **9**, 575–610.

**Makarios-Laham, I.K. & Lee, T.C.** 1993. Protein hydrolysis and quality deterioration of refrigerated and frozen seafood due to obligately psychrophilic bacteria. *Journal of Food Science*, **58**, 310-313.

**Madrid, A., Madrid, J. & Madrid, R.** 1994. Chilling, freezing and ultra-freezing of fish and derivatives. En: *Technology of Fish and its Derivatives*. (Ed.) Mundi-Prensa, Madrid, España: AMV, pp. 45–103.

**Marshall, D. & Kim, C.** 1996. Microbiological and sensory analyses of refrigerated catfish fillets treated with acetic and lactic acids. *Journal of Food Quality*, **19**, 317-329.

**Mejlholm, O. & Dalgaard, P.** 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, **34**, 27-31.

**Mendes R.** 1999. Changes in biogenic amines of major Portuguese bluefish species during storage at different temperatures. *Journal of Food Biochemistry*. **23**, 33-43.

**Metin, S., Erkan, N., Varlik, C. & Aran, N.** 2001. Extension of shelf life of chub mackerel (*Scomber japonicus* Houttuyn 1780) treated with lactic acid. *European Food Research and Technology*, **213**, 174–177.

**Mexis, S., Chouliara, E. & Kontominas, M.** 2009. Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4° C. *Food Microbiology*, **26**, 598-605

**Miyashita, K. & Takagi, T.** 1986. Study on the oxidative rate and prooxidant activity of free fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **63**, 1380–1384.

**Moral, A.** 1987. Métodos físico-químicos de control de calidad de pescados. *Alimentación, Equipos Y Tecnología*, **5-6**, 115-122.

**Odagami, T., Morita, J., Takama, K. & Suzuk, S.** 1994. Substrate specificities of extracellular proteases produced by marine putrefactive bacteria, *Shewanella putrefaciens* and *Alteromonas haloplanktis*. *Letters in Applied Microbiology*, **18**, 50-52.

**Pérez-Villarreal, B. & Pozo, R.** 1990. Chemical composition and ice spoilage of albacore (*Thunnus alalunga*). *Journal of Food Science*, **55**, 678–682.

**Piñeiro, C., Bautista, R., Rodríguez, O., Losada, V., Barros-Velázquez, J. & Aubourg, S. P.** 2005. Quality retention during the chilled distribution of farmed turbot (*Psetta maxima*): effect of a primary slurry ice treatment. *International Journal of Food Science and Technology*, **40**, 817-824.

**Pires, C., Ramos, C., Teixeira, G., Batista, I., Mendes, R., Nunes, L. & Marques, A.** 2011. Characterization of biodegradable films prepared with hake proteins and thyme oil. *Journal of Food Engineering*, **105**, 422-428

**Pourashouri, P., Shabanpour, B., Aubourg, S., Daghigh Rohi, J. & Shabani, A.** 2009. An investigation of rancidity inhibition during storage of Wels catfish (*Silurus glanis*) fillets by previous ascorbic and citric acid treatment. *International Journal of Food Science and Technology*, **44**, 1503–1509.

**Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A. & Savvaidis, I.** 2010. Quality assessment of salted, modified atmosphere packaged rainbow trout under treatment with oregano essential oil. *Journal of Food Science*, **75**, M406-M410

**Quitral, V., Donoso, M<sup>a</sup>L., Ortiz, J., Herrera, M<sup>a</sup>V., Araya, H. & Aubourg, S.** 2009. Chemical changes during the chilled storage of Chilean jack mackerel (*Trachurus murphyi*): effect of a plant extracticing system. *Food Science and Technology*, **42**, 1450–1454.

**Refsgaard, H., Brockhoff, P. & Jensen, B.** 2000. Free polyunsaturated fatty acids cause taste deterioration of salmon during frozen storage. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 3280–3285.

**Rey-Mansilla, M., Sotelo, C. & Gallardo, J.** 1999. Decomposition of trimethylamine oxide during iced storage of blue whiting (*Micromesistius poutassou*). *Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und Forschung*, **208**, 267–269.

**Rodríguez, O., Barros-Velázquez, J., Ojea, A., Pineiro, C. & Aubourg, S. P.** 2003. Evaluation of sensory and microbiological changes and identification of proteolytic bacteria during the iced storage of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Journal of Food Science*, **68**, 2764-2771.

**Rodríguez, O., Losada, V., Aubourg, S. P. & Barros-Velázquez, J.** 2004. Enhanced shelf-life of chilled European hake (*Merluccius merluccius*) stored in slurry ice as determined by sensory analysis and assessment of microbiological activity. *Food Research International*, **37**, 749-757.

**Rodríguez, O., Losada, V., Aubourg, S. & Barros-Velázquez, J.** 2005. Sensory, microbial and chemical effects of a slurry ice system on horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85**, 235–242.

**Rodríguez, O., Barros-Velázquez, J., Piñeiro, C., Gallardo, J. & Aubourg, S.** 2006. Effects of storage in slurry ice on the microbial, chemical and sensory quality and on the shelf life of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Food Chemistry*, **95**, 270–278.

**Roger, V., Fonty, G., Andre, C. & Gouet, P.** 1992. Effects of glycerol on the growth, adhesion, and cellulolytic activity of rumen cellulolytic bacteria and anaerobic fungi. *Current Microbiology*, **25**, 197-201

**Ruíz-Capillas, C. & Moral, A.** 2001. Correlation between biochemical and sensory quality indices in hake stored in ice. *Food Research International*, **34**, 441–447.

**Sengoer, G. F., Mol, S. & Uecok, D.** 2007. The effect of ascorbic acid, citric acid and salt on the quality of spiny dogfish (*squalus acanthias*) fillet. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **16**, 103-113

**Sikorski, Z. & Kolakowska, A.** 1994. Changes in protein in frozen stored fish. En: Seafood Proteins. (Ed.) Z. Sikorski, Z.B. Sun Pan & F. Shahidi, New York, USA: Chapman and Hall, pp. 99–112.

**Simeonidou, S., Govaris, A. & Vareltsis, K.** 1997. Effect of frozen storage on the quality of whole fish and fillets of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) and Mediterranean hake (*Merluccius mediterranean*). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **204**, 405-410.

**Smith, J., Hardy, R., Thomson, A., Young, K. & Parsons, E.** 1980. Some observations on the ambient and chill storage of blue whiting (*Micromesistius poutassou*). En:

Advances in Fish Science and Technology . (Ed.) J. Connell, Farnham, Surrey, England, UK: Fishing News Books, pp. 299–303.

**Stodolnik, L., Blasiak, E. & Broszedzka, H.** 1992. Effect of Tween 80, citric acid and acetylsalicylic acids on changes in muscle tissue lipids of Baltic herrings during storage. *Chłodnictwo*, **27**, 29–35.

**Venugopal, V.** 1990. Extracellular proteases of contaminant bacteria in fish spoilage: A review. *Journal of Food Protection*, **53**, 341-350.

**Whittle, K., Hardy, R. & Hobbs, G.** 1990. Chilled fish and fishery products. En: Chilled Foods: The State of the Art. (Ed.) T. Gormley, New York, USA: Elsevier Applied Science, pp. 87–116.

**Yang, C. T., Jhaveri, S. N. & Constantinides, S. M.** 1981. Preservation of grayfish (*squalus-acanthias*) by salting. *Journal of Food Science*, **46**, 1646-1649.

**Yoshida, H., Kondo, I. & Kajimoto, G.** 1992. Participation of free fatty acids in the oxidation of purified soybean oil during microwave heating. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **69**, 1136–1140.

**Zambuchini, B., Fiorini, D., Verdenelli, M. C., Orpianesi, C. & Ballini, R.** 2008. Inhibition of microbiological activity during sole (*solea solea L.*) chilled storage by applying ellagic and ascorbic acids. *LWT - Food Science and Technology*, **41**, 1733-1738.





V- CONCLUSIONES



## V- CONCLUSIONES

---

### Conclusión 1 (Capítulos 1 y 2)

El empleo de la tecnología de hielo líquido combinado con ozono (HLO), como sistema de sacrificio, enfriamiento y almacenamiento de la trucha arco iris proporcionó una mejora en el control microbiológico y autolítico (valor K) de esta especie. Es la primera vez que se evalúa el sistema de hielo líquido como un proceso integral de refrigeración para una especie continental, por lo que este estudio abre el camino a la aplicación industrial de este sistema de conservación combinado en este tipo de especies.

Además el empleo de hielo líquido ozonizado como sistema de embalaje para las tres especies de bivalvos estudiadas (almeja, ostra y mejillón) permitió la extensión de sus vidas útiles junto a una notable retención de la calidad sensorial, tanto en la estación de primavera como en la de otoño. Además, este sistema de embalaje resultó ser un método valioso para mantener la calidad en estas especies de bivalvos y posterior cocción en destino.

### Conclusión 2 (Capítulo 3)

El sistema propuesto de hielo en escamas preparado a partir de la fórmula comercial BPS2, que contiene los ácidos ascórbico, láctico y cítrico, resultó ser efectivo en la conservación de pescado debido a su efecto antimicrobiano en la

## **V- CONCLUSIONES**

concentración más elevada. Los resultados obtenidos en los análisis microbiológico y sensorial permiten concluir que este nuevo sistema de conservación ralentiza el crecimiento microbiano en merluza, gallo y especialmente en rape; estos resultados se correlacionan con una extensión significativa de su vida útil. Este estudio puede resultar de interés práctico en la mejora de las estrategias de conservación de la calidad del pescado no solo en tierra, sino también a bordo.

### **Conclusión 3 (Capítulo 4)**

El tratamiento en dos etapas de bacaladilla con la mezcla de ácidos orgánicos naturales del producto comercial BPS2 reflejó efectos beneficiosos sobre la calidad microbiológica y la estabilidad lipídica, lo que llevó a un aumento de vida útil en comparación con el producto conservado en hielo tradicional en escamas. Además, con los resultados obtenidos en el presente estudio para bacaladilla refrigerado, se puede concluir que la hidrólisis lipídica resultó ser más relevante que la oxidación lipídica en la conservación en refrigeración de esta especie marina.

### **Conclusión 4 (Capítulos 5 y 6)**

El empleo del sistema de hielo preparado a partir de ácidos orgánicos naturales como sistema de almacenamiento en refrigeración de especies de bajura (jurel y caballa), ha permitido una extensión de la vida útil de ambas especies en comparación con los lotes control almacenados en hielo tradicional.

El lavado superficial provocado por la fusión del hielo durante el almacenamiento y los consiguientes efectos antioxidantes y antimicrobianos de estos ácidos sobre la superficie del pescado, podrían ser los mecanismos conducentes a un menor desarrollo de la alteración en las dos especies marinas estudiadas.

### **Conclusión 5 (Capítulo 7)**

Este trabajo permitió evaluar un sistema combinado de conservación mediante la incorporación de aceites esenciales y envasado en atmósfera modificada para aumentar la vida útil de un producto precocinado (anillas de calamar). Así, se confirmó el efecto antioxidante de los aceites esenciales de orégano y de tomillo sobre la fracción lipídica. Además, el aceite esencial de orégano demostró tener propiedades antibacterianas, lo cual unido a su actividad antioxidante, se tradujo en una extensión importante en la vida útil del producto. Este sistema combinado puede tener aplicación práctica en la industria de productos marinos elaborados, con el fin de reducir la adición de conservantes químicos sintéticos, logrando asimismo la prolongación de su vida útil.

