



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Facultad de Farmacia  
Departamento de Nutrición y Bromatología

Programa de doctorado  
Nutrición, Tecnología e Higiene de los Alimentos

---

---

**ESTUDIO DE ALTERNATIVAS PARA LA EVALUACIÓN  
DE LA FRESCURA Y LA CALIDAD DEL BOQUERÓN  
(*Engraulis encrasicolus*) Y SUS DERIVADOS**

---

---

Memoria presentada por Sofía Pons Sánchez-Cascado  
Para optar al grado de Doctor en Farmacia.

Dirección: Dra. M. Carmen Vidal Carou  
Dra. M. Teresa Veciana Nogués

Barcelona 2005





UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Facultat de Farmàcia**

Departament de Nutrició i Bromatologia

Av. Joan XXIII, s/n

08028 Barcelona

Tel. 34 93 402 45 08

Fax 34 93 402 18 96

M. CARMEN VIDAL CAROU y M. TERESA VECIANA NOGUÉS, Catedrática y Profesora Titular de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona

Hacen constar que la Tesis Doctoral ***Estudio de alternativas para la evaluación de la frescura y la calidad del boquerón (Engraulis encrasicolus) y sus derivados***, que presenta la Lda. Sofía Pons Sánchez-Cascado, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Barcelona y, considerándola concluida, autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Barcelona, 30 de Mayo de 2005

Fdo: Dra. M. CARMEN VIDAL CAROU

Dra. M. TERESA VECIANA NOGUÉS



El trabajo expuesto en esta memoria ha sido subvencionado por la Comisión Europea mediante el proyecto FAIR CT.97.3653 (*QUALPOISS 2: The evaluation of a simple, cheap, rapid method of non-protein nitrogen determination in fish products through the processing/merchandising chain*). Asimismo, se ha disfrutado de una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) vinculada a este proyecto y subvencionada en parte por la Universidad de Barcelona.



¿Qué sabe el pez del agua donde nada toda su vida?  
Albert Einstein (1.879 - 1.955); Físico y Matemático



Por fin “el proyecto tesis” se ha finalizado. Han sido unos años muy marcados por los cambios a nivel personal, unos geniales y maravillosos, otros, desgraciadamente todo lo contrario. En este tiempo han sido muchas las personas a las que he tenido a mi lado animándome, ayudándome y ofreciéndome su tiempo, apoyo, cariño, confianza y.... paciencia. A todos vosotros, MUCHAS GRACIAS.

Quiero empezar personalizando los agradecimientos hacia Teresa Veciana y M<sup>a</sup> Carmen Vidal, codirectoras de esta tesis. Muchas gracias por vuestra ayuda, vuestros consejos, el esfuerzo y el tiempo que me habéis dedicado. Especialmente, me gustaría resaltar el apoyo brindado para la finalización de la Tesis.

A Abel Mariné le agradezco su propuesta de realizar un trabajo práctico en el laboratorio de aminas biógenas. De este primer contacto con el laboratorio salió una beca de colaboración y posteriormente la Tesis. Muchas gracias por la oportunidad que me brindaste, así como el interés que has mostrado en todo momento. A Sara Bover quiero agradecer el tiempo y las ganas por transmitir tanto aspectos relacionados con las aminas biógenas como, y sobretodo, aspectos relacionados con la microbiología aplicada a los alimentos.

Con Sonia Novella me inicié en el laboratorio. Ella me enseñó los misterios de las aminas biógenas y del HPLC. A ella le agradezco tanto los conocimientos que me transmitió, como las horas que hemos pasado juntas y lo más importante, su amistad. Quiero dar las gracias a aquellas personas que han compartido el laboratorio y las horas de trabajo conmigo: Malu, Marisol, Sònia B., Chus, Eva, Meri y Tommaso. Al resto de compañeros y profesores del Departamento, así como a Montse y Fernando quiero agradecerles que el trabajo del laboratorio se desarrollara bajo un clima de armonía y compañerismo.

Agradezco a Helena Colom y a José Antonio Cordero todos los consejos y ayuda en la estadística.

Quiero dar las gracias a todos los participantes del proyecto Europeo, tanto por compartir las experiencias profesionales como el tiempo en los diferentes congresos que se han ido celebrando. Y ¡cómo no! a la empresa Siro & Xavi que me ha suministrado parte de las muestras de boquerón necesarias para la realización de esta Tesis Doctoral.

Agradezco a mis compañeros de Laboratorios Kin, S. A. el apoyo que me han ofrecido tanto a nivel personal como profesional. Especialmente al Sr. Izquierdo, Enriqueta, Marina, Eva, Marta y Manel que habéis hecho que los grandes problemas parezcan mucho más pequeños y que las horas de trabajo sean llevaderas incluso en los peores momentos.

A Ruth, Susana, David, Anna, Ramón, Loida, Ismael, Montse, Oscar, Laura, Jaume, Cristina y Josep os agradezco vuestra amistad y todos los buenos ratos que hemos pasado juntos.

A la abuelita, avia y M<sup>a</sup> Luisa agradezco el enorme interés para que finalice esta tesis, por creer y confiar en mí. También quiero dar las gracias al abuelito, el avi, el padrí y la tieta por cuidarme y protegerme en todo momento.

A Pedro, Montserrat, Montse, Carmelo, Adrià, Mónica y Manel os quiero agradecer tanto la paciencia que habéis tenido como el apoyo, cariño y ánimos que me habéis dado.

Agradezco a Pedro, Eduardo, Sara y Carri que siempre que os necesito estéis ahí. Aunque seáis mis hermanos pequeños he aprendido muchísimo de vosotros y aunque a veces ha parecido lo contrario, he escuchado con muchísima atención todas la palabras y consejos que me habéis dado.

Si tuviera que enumerar todo lo que tengo que agradecer a papá y mamá, necesitaría un tomo mucho más grande que esta tesis. Muchas gracias por comprenderme, quererme, confiar en mí, a veces más que yo misma y por estar siempre a mi lado.

A la “Sofía petita” y a “Guillem” quiero agradecerles haberme hecho sentir viva mientras os he llevado dentro.

A Dani le agradezco el saberme entender cuando ni yo misma me entiendo, su apoyo y respeto por lo que hago. También toda la ayuda brindada en la realización de esta tesis: desde acompañarme a Palafolls en coche a buscar las muestras de boquerón, hasta sus enseñanzas y consejos informáticos. Gracias por estar a mi lado tanto en los buenos momentos como en los no tan buenos.

*A mi familia*



# ÍNDICE

## I. INTERÉS Y OBJETIVOS

1. INTERÉS Y OBJETIVOS .....	3
------------------------------	---

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. EL BOQUERÓN .....	9
----------------------	---

2.1. FORMAS DE COMERCIALIZACIÓN Y CONSUMO.....	11
--	----

2.1.1. Anchoas en salazón.....	11
--------------------------------	----

2.1.2. Otras formas de Consumo .....	12
--------------------------------------	----

2.2. CONSERVACIÓN.....	13
------------------------	----

3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL PESCADO.....	17
--	----

3.1. CAMBIOS POST-MORTEM EN EL PESCADO.....	19
---	----

3.1.1. Cambios sensoriales.....	19
---------------------------------	----

3.1.2. Cambios autolíticos.....	20
---------------------------------	----

3.1.3. Cambios bacteriológicos .....	22
--------------------------------------	----

3.2. MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL PESCADO .....	23
---	----

3.2.1. Métodos sensoriales .....	24
----------------------------------	----

3.2.2. Métodos físicos .....	25
------------------------------	----

3.2.3. Métodos químicos .....	27
-------------------------------	----

3.2.4. Métodos microbiológicos.....	33
-------------------------------------	----

4. EVALUACIÓN SENSORIAL .....	37
-------------------------------	----

4.1. INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS SENSORIAL .....	37
---	----

4.1.1. Propiedades sensoriales.....	38
-------------------------------------	----

4.1.2. Factores implicados en el análisis sensorial .....	40
---	----

4.1.3. Métodos de análisis sensorial .....	44
--	----

4.2.	EVALUACIÓN SENSORIAL DEL PESCADO.....	45
4.2.1.	Pescado crudo .....	45
4.2.2.	Pescado cocido.....	47
<b>5.</b>	<b>AMINAS VOLÁTILES.....</b>	<b>49</b>
5.1.	TRIMETILAMINA .....	49
5.1.1.	Niveles de N-TMA en pescado y su interés como índice higiénico - sanitario .....	52
5.1.2.	Métodos analíticos para la determinación del N-TMA .....	54
5.2.	NITRÓGENO BÁSICO VOLÁTIL TOTAL .....	58
5.2.1.	Niveles de N-BVT en pescado y su interés como índice higiénico - sanitario .....	58
5.2.2.	Métodos analíticos para la determinación del N-BVT .....	61
<b>6.</b>	<b>AMINAS BIÓGENAS.....</b>	<b>65</b>
6.1.	ORIGEN Y FORMACIÓN .....	66
6.2.	INTERÉS BIOLÓGICO .....	69
6.2.1.	Implicaciones fisiológicas de las poliaminas .....	70
6.2.2.	Implicaciones toxicológicas.....	70
6.2.3.	Implicaciones higiénicas .....	79
6.3.	AMINAS BIÓGENAS EN PESCADOS Y DERIVADOS .....	80
6.3.1.	Formación por actividad bacteriana .....	80
6.3.2.	Contenidos .....	83
6.3.3.	Aminas biógenas como índice de calidad higiénico – sanitario .....	88
6.4.	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS .....	89
 <b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>		
<b>7.</b>	<b>MUESTRAS Y MUESTREO .....</b>	<b>93</b>
7.1.	ESTUDIOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN HIELO .....	93
7.2.	ESTUDIOS DURANTE LA MADURACIÓN DE DERIVADOS DEL BOQUERÓN .....	94
7.2.1.	Anchoas maduras en sal.....	94
7.2.2.	Boquerones marinados en vinagre .....	95

<b>8. METODOLOGÍA ANALÍTICA.....</b>	<b>97</b>
8.1. ANÁLISIS SENSORIAL .....	97
8.1.1. Panel de catadores .....	97
8.1.2. Tablas sensoriales .....	97
8.2. ANÁLISIS QUÍMICO Y FÍSICO-QUÍMICO.....	98
8.2.1. Determinación de aminas volátiles .....	98
8.2.2. Determinación de aminas biógenas.....	98
8.2.3. Determinación de pH .....	102
8.2.4. Determinación del contenido acuoso .....	102
8.2.5. Determinación de las fracciones nitrogenadas .....	103
8.3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	105
8.3.1. Preparación de la muestra .....	105
8.3.2. Recuentos microbianos.....	105
8.3.3. Aislamiento e identificación de cepas .....	108
8.3.4. Determinación de la capacidad aminoácido descarboxilasa .....	110
8.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	111

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

<b>9. VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE N-TMA Y N-BVT POR ANÁLISIS DE INYECCIÓN DE FLUJO EN BOQUERÓN.....</b>	<b>115</b>
9.1. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO.....	115
9.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	116
<b>10. ANÁLISIS SENSORIAL DEL BOQUERÓN .....</b>	<b>127</b>
10.1. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO.....	127
10.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	130
<b>11. AMINAS VOLÁTILES Y BIÓGENAS COMO INDICADORES DE FRESCURA Y/O DETERIORO DEL BOQUERÓN CONSERVADO EN HIELO.....</b>	<b>145</b>
11.1. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO.....	145
11.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	146

<b>12. ACTIVIDAD AMINOÁCIDO DESCARBOXILASA DE BACTERIAS AISLADAS DEL BOQUERÓN .....</b>	<b>171</b>
12.1. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO.....	171
12.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	172
<b>13. EFECTO DE LA EVISCERACIÓN EN EL PERFIL DE AMINAS BIÓGENAS DURANTE LA MADURACIÓN DE ANCHOAS EN SAL... 181</b>	<b>181</b>
13.1. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO.....	181
13.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	182
<b>14. EVOLUCIÓN DE PARÁMETROS QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS DURANTE LA ELABORACIÓN INDUSTRIAL DE SEMICONSERVAS DE ANCHOAS EN SAL .....</b>	<b>193</b>
14.1. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO.....	193
14.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	194
<b>15. UTILIDAD DE LAS AMINAS COMO MARCADORES DE FRESCURA DE LA MATERIA PRIMA UTILIZADA EN LA ELABORACIÓN DE BOQUERONES EN VINAGRE .....</b>	<b>209</b>
15.1. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO.....	209
15.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	210
<b>16. ESTUDIO DE LA SIGNIFICACIÓN TOXICOLÓGICA DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIÓGENAS EN DERIVADOS DE BOQUERÓN.....</b>	<b>235</b>
16.1. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO.....	235
16.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	236
<b>V. CONCLUSIONES</b>	
<b>17. CONCLUSIONES.....</b>	<b>241</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	
<b>18. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>247</b>

---

# **I. INTERÉS Y OBJETIVOS**

---



# 1. INTERÉS Y OBJETIVOS

Tras la muerte del pez, tiene lugar la pérdida progresiva de su frescura y calidad. Ello se produce a través de una serie de reacciones post-mortem entre las que destacan las reacciones autodegradativas de tipo enzimático y los cambios microbiológicos. Estos procesos, que siguen una secuencia parecida en todas las especies, conducen a la aparición de olores, colores y sabores no deseados, así como a la acumulación de compuestos orgánicos y microorganismos que pueden representar un riesgo higiénico o toxicológico.

En la literatura se describen una gran variedad de métodos para la determinación de la calidad del pescado. Sin embargo, no existe ninguno que sea universal, es decir, que sea aplicable a cualquier especie de pescado, hábitat, modo de captura... La legislación europea y española establece el uso del análisis sensorial para determinar la frescura del pescado y el recurso de análisis químicos o microbiológicos cuando la evaluación sensorial plantee dudas (CEE/493/91, 1991; MSC, 1992).

Esta Tesis se enmarca en el proyecto europeo QUALIPOISS 2 (FAIR CT 97.3253) ***“The evaluation of a cheap, simple and rapid method of non-protein nitrogen determination in fish products through the processing/merchandising chain”***, cuyo objetivo fue desarrollar un método rápido, sencillo y económico para determinar el Nitrógeno de Trimetilamina y el Nitrógeno Básico Volátil Total del pescado, y que pudiera utilizarse tanto en las lonjas como en las industrias de procesado, estableciendo para ello niveles máximos de estas sustancias que permitieran su aceptación o rechazo de forma objetiva. Para poder alcanzar este objetivo se planteó un estudio comparativo entre diferentes laboratorios europeos, en el que cada grupo participante estudiaría diferentes especies de pescado de las que habitualmente se consumen en su zona de influencia.

La Tesis se centra en el estudio del boquerón (*Engraulis encrasicolus*) y en ella, el objetivo del proyecto europeo se ha ampliado al desarrollo de un método de evaluación sensorial y al estudio de las aminas biógenas y de

ciertos parámetros microbiológicos en boquerón fresco y en productos derivados del boquerón. Algunos de estos parámetros tienen, además de un interés higiénico-sanitario, importancia toxicológica como se explicará a lo largo de esta memoria.

El objetivo global de la Tesis es el estudio de la calidad del boquerón en función de los cambios sensoriales, químicos y microbiológicos, tanto durante el almacenamiento del producto no procesado como durante la elaboración de semiconservas. Para conseguir este objetivo global, se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1. **Validar técnicas de análisis por inyección de flujo para la determinación del nitrógeno de trimetilamina y del nitrógeno básico volátil total en boquerón**, y su comparación con técnicas tradicionales.
2. **Desarrollar un Quality Index Method (QIM) específico para boquerón crudo y una tabla de análisis sensorial para boquerón cocido**, siguiendo los criterios generales establecidos en la normativa de la Unión Europea para la evaluación organoléptica del pescado.
3. **Monitorizar los niveles de aminas volátiles y biógenas a lo largo del almacenamiento en hielo del boquerón** (bajo condiciones estandarizadas, pero intentando aproximarse lo máximo posible a las condiciones reales).
4. **Establecer niveles máximos de aminas volátiles y biógenas para proponer índices de rechazo del boquerón almacenado en hielo.**
5. **Estudiar el perfil microbiológico del boquerón durante el almacenamiento en hielo** y la evolución de los grupos microbianos más significativos.
6. **Valorar la capacidad aminogénica de los diferentes grupos bacterianos aislados a lo largo del almacenamiento del boquerón, mediante pruebas *in vitro*** e identificar las cepas que demuestren capacidad formadora de aminas.
7. **Analizar la influencia de la evisceración del pescado en la producción de aminas biógenas y en los recuentos de microorganismos en semiconservas de anchoas en sal.**

8. **Monitorizar la evolución de las aminas biógenas, los recuentos microbianos y otros indicadores durante el procesado industrial de semiconservas de anchoas en sal.**
9. **Determinar la capacidad de producción *in vitro* de aminas biógenas por parte de microorganismos aislados durante la maduración de semiconservas de anchoas en sal e identificar las cepas productoras.**
10. **Valorar la utilidad de las aminas volátiles y biógenas como marcadores de frescura de la materia prima utilizada en la elaboración de semiconservas de boquerones marinados en vinagre.**
11. **Conocer los contenidos de aminas biógenas en derivados de boquerón y evaluar su posible implicación en la salud del consumidor.**



---

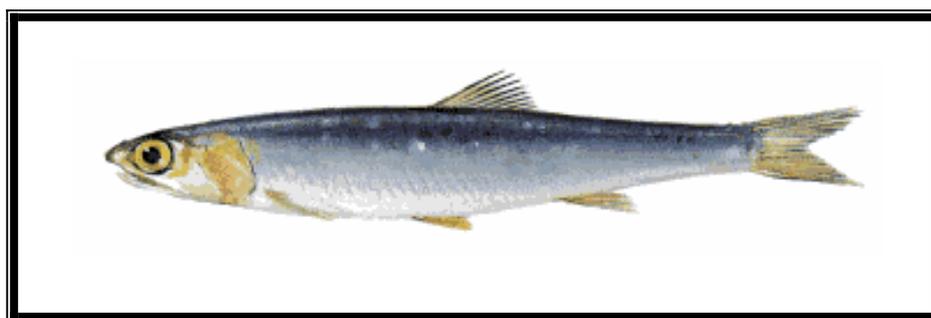
## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

---



## 2. EL BOQUERÓN

El boquerón (*Engraulis encrasicolus*) es una especie pelágica gregaria que pertenece a la familia *Engraulidae*. Se caracteriza por ser un pez pequeño, con un cuerpo muy delgado, chato, de coloración azulada-verdosa dorsalmente y plateada ventralmente. Posee fuertes mandíbulas, la superior más larga que la inferior (Figura 2.1). Normalmente mide de 12 a 13 centímetros de longitud al alcanzar la madurez, pudiendo llegar a los 20 cm de talla máxima.



**Figura 2.1.** Boquerón (*Engraulis encrasicolus*).

El boquerón presenta un ciclo de vida corto, de 3 a 4 años de longevidad y un rápido crecimiento, presentando la primera madurez sexual al término del primer año de vida. La época reproductiva se desarrolla a finales de invierno, entre los meses de abril y septiembre. Llega a poner entre 12.000 y 20.000 huevos, aunque un alto porcentaje de éstos no llegan a madurar. Su tasa de mortalidad natural es elevada, principalmente por la depredación por otros peces, aves y mamíferos marinos.

Se puede localizar en las costas mediterráneas y del Atlántico oriental, desde África a Noruega, con incursiones en el Báltico. Suele vivir en grandes bancos a más de 100 metros de profundidad, pero también se pueden dejar ver cerca de las costas cuando se acercan los meses de primavera - verano para reproducirse y desovar.

## Revisión Bibliográfica

---

Desde un punto de vista nutritivo, el boquerón es un producto muy saludable. Contiene hasta un 12% de grasa altamente insaturada. Además su carne contiene hierro, sodio, fósforo, calcio y vitaminas A y B. Las formas de consumo son muy variadas: fresco (frito, asado...), en vinagre, en salazón, en aceite, ahumado...

La tabla 2.1 resume algunos de los aspectos más característicos del boquerón.

**Tabla 2.1.** Ficha Técnica del boquerón.

<b>Nombre común:</b>	Boquerón, anchoa, bocarte
<b>Nombre científico:</b>	<i>Engraulis encrasicolus</i> (Linneaus 1758)
<b>Familia:</b>	<i>Engraulidae</i>
<b>Área de distribución:</b>	Desde 62°N hasta 19°S. En el Atlántico este, desde Bergen (Noruega) hasta Ciudad del Cabo (Sudáfrica), en el Mar Mediterráneo, Mar Negro y Mar de Azov. También se han registrado capturas en el Océano Índico y en la costa este africana (Islas Seychelles, Somalia, Isla Mauricio)
<b>Hábitat:</b>	Pelágico y costero, principalmete marino pero tolera un rango de salinidad muy amplio, por lo que suele entrar en lagunas costeras y estuarios
<b>Arte de pesca:</b>	Red de cerco, aunque también se utilizan técnicas de arrastre
<b>Talla mínima:</b>	9 cm
<b>Talla máxima:</b>	20 cm
<b>Densidad máxima:</b>	60.000 individuos / 100.000 m <sup>3</sup>
<b>Edad máxima:</b>	5 años
<b>Alimentación:</b>	Fitoplancton, zooplancton e ictioplancton
<b>Reproducción:</b>	Ponedores múltiples con un pico de puesta al año, que suele ser en los meses cálidos
<b>Huevos:</b>	Ovoides, pelágicos, con desarrollo embrionario muy rápido (24-65 horas)

El boquerón se encuentra entre las preferencias de muchos consumidores por su sabor y su precio relativamente asequible. Sus características, en cuanto a fragilidad muscular y elevada actividad metabólica, hacen que sea un producto altamente perecedero por lo que es muy importante el uso de sistemas adecuados de conservación. El desembarco anual de boquerones en Cataluña corresponde a algo más de 6 toneladas (Datos del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca de Cataluña, [www.gencat.es/darp/c/pescamar/espesca/cespes35.htm](http://www.gencat.es/darp/c/pescamar/espesca/cespes35.htm)).

## **2.1. FORMAS DE COMERCIALIZACIÓN Y CONSUMO**

Gran parte de la captura del boquerón se destina a la elaboración de anchoas mediante un proceso de salado y maduración (Cheftel, 1965), comercializándose principalmente en forma de semiconservas de anchoa en aceite vegetal, si bien existen variedades como las anchoas ahumadas o los boquerones en vinagre. Debido a que no se someten a un proceso de esterilización, el período de vida útil de estas semiconservas es de seis meses a un año, debiendo ser mantenidas en la mayoría de sus formas de preparación a temperaturas de refrigeración entre 2 °C y 8 °C.

### **2.1.1. Anchoas en salazón**

La estabilidad comercial de estas semiconservas radica en el proceso de desorción al que se somete la materia prima. Los boquerones se cubren de cloruro sódico (soluciones de elevada presión osmótica), generándose durante el proceso de anchoado dos flujos de direcciones opuestas: el cloruro sódico difunde desde la solución hacia el interior del tejido muscular del boquerón y el agua de constitución difunde desde el pescado hacia la solución salina (Pérez-Villareal y Pozo, 1992). Este proceso de desorción da lugar a una marcada reducción de la actividad de agua en el producto, dificultando el desarrollo microbiano y garantizando su estabilidad comercial (Fuselli y col., 1994). Esta fase de salado y prensado dura entre 3 meses y un año a una temperatura que oscila entre los 18 °C y los 25 °C. Cuanto mayor sea la temperatura o menor el prensado, más rápido madurarán las anchoas (Yeannes y Casales, 1995a). El proceso específico desde la captura hasta la comercialización se muestra en la figura 7.1 del capítulo 7 de esta memoria.

Existen dos formas de presentación de las anchoas en salazón: en envases de cristal sin que al producto se le haya retirado la sal y en forma de filetes parcialmente desalados y sumergidos en aceite. Para esta última presentación, el fileteado es manual: se pelan, si aún hay algún resto de piel y luego se filetean. Hay industrias conserveras que les cortan la cola para dar al producto una imagen más homogénea. Tras el fileteado se procede al secado y finalmente se realiza el empaquetado, tras una última limpieza antes de introducir los filetes en los envases con sumo cuidado para que no se rompan.

### 2.1.2. Otras formas de Consumo

Aunque tal y como se ha mencionado anteriormente, la mayor parte de la captura del boquerón está destinada a la producción de las anchoas en sal, existen otras formas de consumo:

- **Fresco:** Por las condiciones del pescado en general (alimento que se deteriora con facilidad) y particularmente del boquerón (tamaño, pescado graso...) lo ideal es consumirlo antes de 3 días desde su captura. Una vez llega a la cocina se puede preparar de diversas formas como frito, a la plancha...
- **En vinagre:** El primer paso después del lavado es el descabezado y eviscerado de los boquerones. Una vez concluída esta labor, se dejan macerar en vinagre durante unas horas si se trata de pequeñas cantidades y hasta un máximo de 15 – 20 días si son tamaños industriales. Durante este tiempo, adquieren una coloración blanquecina característica. Por último se separan los lomos, se les adiciona aceite y se empaquetan.
- **Ahumado:** La preparación de la anchoa ahumada empieza con la limpieza, el descabezado y el eviscerado manual de cada anchoa para posteriormente proceder a su salazón. Al cabo de unas horas, se desala el pescado y se hornea con humo natural (por ejemplo de haya). Una vez ahumada, se separan los dos filetes de cada anchoa y se envasan con aceite.

## 2.2. CONSERVACIÓN

El boquerón, como la mayoría de las especies de pescado, es un alimento altamente perecedero debido, principalmente, a procesos enzimáticos y bacterianos que están favorecidos por su elevado contenido en agua, aminoácidos libres y por el incremento del pH que acompaña a la alteración (Pedrosa-Menabrito y Regenstein, 1988). La velocidad de degradación del pescado dependerá de factores intrínsecos (como el tamaño del espécimen, la permeabilidad de la piel o la contaminación bacteriana en el momento de la captura) y de factores extrínsecos como la manipulación y el empleo de técnicas de conservación. Estas técnicas irán encaminadas fundamentalmente a impedir o retrasar el desarrollo bacteriano.

Entre los sistemas utilizados para la conservación del pescado, se pueden destacar (Madrid y col., 1999):

- **Aplicación de frío:** Es el principal recurso empleado para la conservación de los productos de la pesca. En función de la temperatura aplicada obtendremos productos frescos, congelados o ultracongelados.
- **Evisceración:** Ayuda a eliminar el contenido bacteriano interior, pero expone al músculo del pescado a las condiciones externas provocando la entrada de microorganismos.
- **Semiconservas:** Se estabiliza el pescado mediante un tratamiento apropiado: *Productos en salazón* (sometidos a la acción prolongada de la sal común), *ahumados* (una vez salados son sometidos a la acción del humo de madera en cámaras apropiadas), *desecados* (se les aplica aire seco u otro sistema hasta disminuir su humedad por debajo del 15%), *cocidos* (son sometidos a la acción del calor como vapor de agua o agua hirviendo...) y se mantienen en envases impermeables al agua hasta su uso. Su período de conservación es inferior al de las conservas clásicas y se deben mantener refrigerados (entre 2 °C y 8 °C).
- **Conservas:** Se introducen en envases cerrados herméticamente, junto con otros alimentos (aceite, condimentos...) y se someten a la acción del calor (normalmente 110 – 120 °C durante 20-45 minutos), con lo que se asegura la destrucción de todos los microorganismos. De esta forma las conservas se pueden guardar durante meses e incluso 1-2 años a temperatura ambiente.

- **Aplicación de atmósferas modificadas a base de CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>.** Ralentiza los procesos de descomposición y alarga el período de vida útil del pescado. Sin embargo, existe un riesgo potencial de crecimiento de *Clostridium botulinum*, ya que al inhibir la flora deteriorante también se inhibe su papel protector frente a este microorganismo.
- **Irradiación:** Consiste en exponer el producto a radiaciones de cobalto 60 o radiaciones gamma, sin que quede radioactividad residual en el producto tratado. Así, se destruyen los microorganismos presentes y se consigue un producto estable a temperatura ambiente.
- **Altas presiones:** Causan la inactivación de los microorganismos mediante cambios en la estructura de su membrana celular.
- **Adición de agentes conservadores:** Como el ácido benzoico o benzoato sódico en crustáceos.

El método más utilizado para la conservación del pescado, desde su captura hasta la llegada al consumidor, es la aplicación de frío. Según la intensidad aplicada del frío, se puede clasificar en: pescado refrigerado, pescado congelado y pescado ultracongelado (Madrid y col., 1999).

El **Pescado refrigerado** es el que desde su captura está conservado en hielo, con lo que se garantizan temperaturas que oscilan entre -1 °C y 6 °C. De esta forma el pescado se puede conservar durante varios días. El hielo debe distribuirse de manera que cubra todo el pescado, en una proporción que varía entre 1/1 y 1/4 respecto al pescado. En los casos en los que el barco aún puede tardar varios días en llegar a puerto, es frecuente depositar el pescado ya acondicionado en hielo, en una cámara refrigerada a una temperatura justo por encima del punto de congelación.

Las condiciones de refrigeración no detienen los cambios sensoriales, ni el crecimiento bacteriano, ni su actividad enzimática, pero se enlentecen dichos procesos y la consecuente aparición de los productos de degradación relacionados con el deterioro. La refrigeración es la forma más común de conservación de los boquerones frescos.

El **Pescado congelado** es aquel que se somete a la acción de un frío más intenso en cámaras especiales hasta alcanzar temperaturas en el centro de las piezas del orden de -16 °C a -25 °C, pudiendo conservarse así durante

semanas e incluso meses. La congelación conviene que sea rápida para que los cristales que se formen de hielo sean pequeños (aunque numerosos) y así no dañen al tejido celular del pescado. Contrariamente, la descongelación debe ser lenta para que las proteínas miofibrilares reabsorban bien el agua. En cuanto a la temperatura de almacenamiento es conveniente que se mantenga constante, con el fin de minimizar los cambios físicos y químicos como la deshidratación y la oxidación.

El proceso de congelación (ya sea en tierra o en el propio barco) implica las siguientes etapas: lavado, eviscerado, descabezado (si es preciso), nuevo lavado, envasado (entero, en fracciones, fileteado...), congelación y conservación a baja temperatura.

En el **Pescado ultracongelado**, la congelación por frío se acelera para que en menos de dos horas, la temperatura del centro del producto baje hasta -5 °C. Después continúa la congelación hasta alcanzar temperaturas entre -16°C y -35 °C.



### 3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL PESCADO

La palabra calidad se usa ampliamente y tiene muchos significados. En la industria pesquera, el término “calidad del pescado” se relaciona a menudo con especies costosas o con el tamaño de la pieza. Así, un pescado considerado de calidad inferior por un procesador puede referirse a un ejemplar demasiado pequeño, lo que daría lugar a bajos rendimientos y beneficios. Dentro del ámbito de la industria, la calidad se debe asociar y definir para cada tipo de producto. Un ejemplo lo encontramos en que está generalizada la idea de que la mejor calidad se encuentra en el pescado que se consume dentro de las primeras horas *post mortem*. Sin embargo, el pescado muy fresco que se encuentra en *rigor mortis* es difícil de filetear y desollar, y por lo tanto no es apropiado para ciertos derivados como los ahumados.

Para las autoridades gubernamentales, que están principalmente interesadas en posibles riesgos para la salud, buena calidad significa ausencia de agentes nocivos tales como parásitos, compuestos químicos y organismos patógenos.

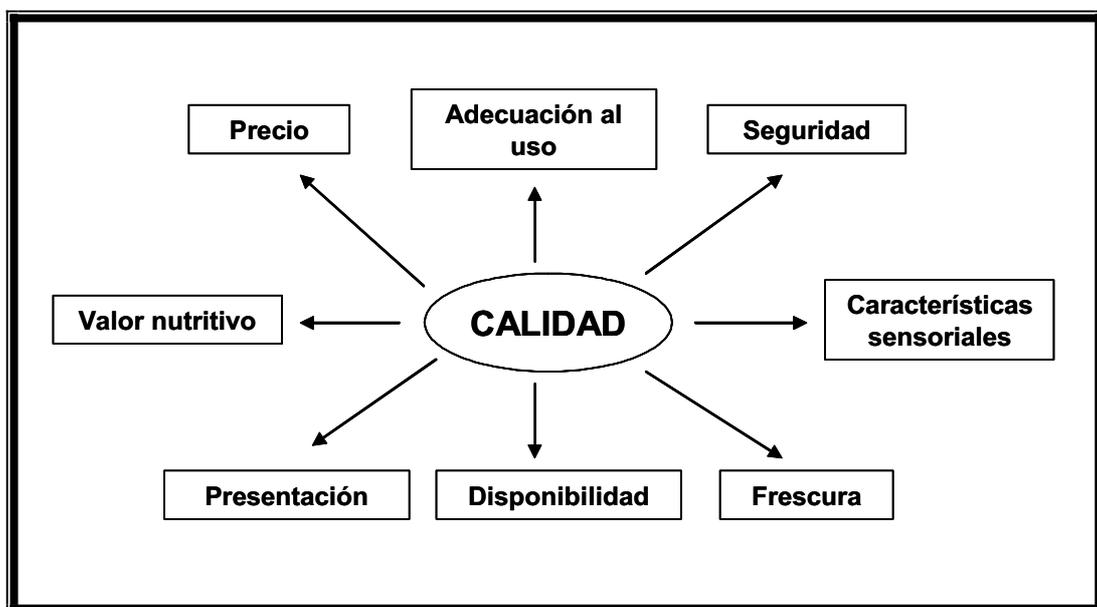
Por último, muy a menudo, calidad es sinónimo de frescura y apariencia y se refiere al grado de deterioro que ha sufrido el pescado. Como consecuencia de su composición química y del pH poco ácido de su carne, el pescado se degrada con facilidad. Se puede deteriorar por la acción de enzimas autolíticas endógenas y/o por el desarrollo de una flora de contaminación variada. La flora contaminante se asienta básicamente sobre la piel y el intestino, y se extiende y se multiplica a otros tejidos donde existen sustancias nutritivas adecuadas (sustratos de bajo peso molecular: aminoácidos, aminas volátiles) y un pH relativamente elevado que favorece el desarrollo de dicha flora. Debido a este crecimiento, aparecen compuestos volátiles (trimetilamina, amoníaco, mercaptanos...) que confieren mal olor al pescado. Además, las proteasas del propio pescado y las bacterianas provocan un reblandecimiento rápido del músculo. Por su parte los lípidos se oxidan y las hemoproteínas modifican el color de la carne (Pascual-Anderson, 2000).

La refrigeración retarda un poco la aparición de las transformaciones anteriores pero no las suprime, ya que la flora contaminante suele ser psicrótrfica (pseudomonas principalmente) y continúa desarrollándose incluso a -5 °C. Por otra parte, las lipasas que intervienen en la oxidación de los lípidos permanecen activas aún a temperaturas de congelación (Pascual-Anderson, 2000).

La alteración del pescado depende pues de distintos factores:

- **Especie:** se alteran más rápidamente los peces planos que los redondos.
- **Tamaño:** en general las piezas mayores se deterioran más lentamente.
- **Condiciones del pescado en el momento de su captura:** Una larga agonía provoca mayor consumo de glucógeno, cuya falta acelera la aparición de fenómenos de alteración.
- **Tipo de flora contaminante:** Si la contaminación corporal e intestinal del pescado es alta y la que se instaura después de su captura también es elevada, la alteración será mayor y más rápida.

Tal y como hemos visto, la calidad del pescado puede abordarse desde distintos ámbitos y por tanto existen diversos factores que contribuyen a alcanzar una determinada calidad (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Factores que contribuyen a la calidad del pescado (Ólafsdóttir y col., 1997).

### 3.1. CAMBIOS POST-MORTEM EN EL PESCADO

Tras la muerte del pescado, el músculo de éste está totalmente relajado. El pescado es blando y flexible y la textura es firme y elástica al tacto. A partir de este momento el pescado sufrirá una serie de modificaciones sensoriales, autolíticas y bacteriológicas, que conducirán finalmente al rechazo por parte del consumidor. Durante el transcurso de su deterioro las condiciones de almacenamiento del pescado serán claves para alargar o acortar el tiempo de vida comercial.

#### 3.1.1. Cambios sensoriales

Los primeros cambios sensoriales del pescado durante el almacenamiento están relacionados con la apariencia y la textura.

Tras la captura y muerte del pescado, la interrupción de la circulación sanguínea priva al músculo del aporte de oxígeno y de toda una serie de nutrientes celulares. La actividad celular del pescado después de su muerte continúa aún activa durante poco tiempo impulsada por las reservas de energía, principalmente glucógeno y ATP, que quedan en las células musculares después del forcejeo del pescado en el momento de su captura.

Cuando se agota el ATP celular y con la finalidad de obtener más energía, se inicia una glucólisis anaerobia, degradando el glucógeno a glucosa y ácido láctico, de una manera similar a la que se produce en la carne de los mamíferos. La acumulación de ácido láctico provoca un descenso en el pH del músculo y, si lo hace hasta el punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares, éstas se desnaturalizan y pierden su capacidad de retener agua, lo que origina cambios en la textura del pescado.

Otro efecto caracterizado por la ausencia del ATP miofibrilar necesario para permitir la separación de las proteínas contráctiles es la aparición del *rigor mortis* o rigidez cadavérica, contracción del músculo debido a la unión irreversible de los filamentos de actina y miosina una vez se han acabado las reservas de ATP. El estado de rigidez se mantiene durante uno o más días y luego se resuelve el *rigor*, el músculo se relaja nuevamente y recupera la flexibilidad pero no la elasticidad previa al rigor (Huss, 1995). Con el tiempo, la pérdida de las reservas de energía celular se traduce en un desequilibrio químico intracelular que activa ciertos enzimas endógenos proteolíticos,

generando rupturas de los enlaces peptídicos que provocan el ablandamiento de la estructura muscular.

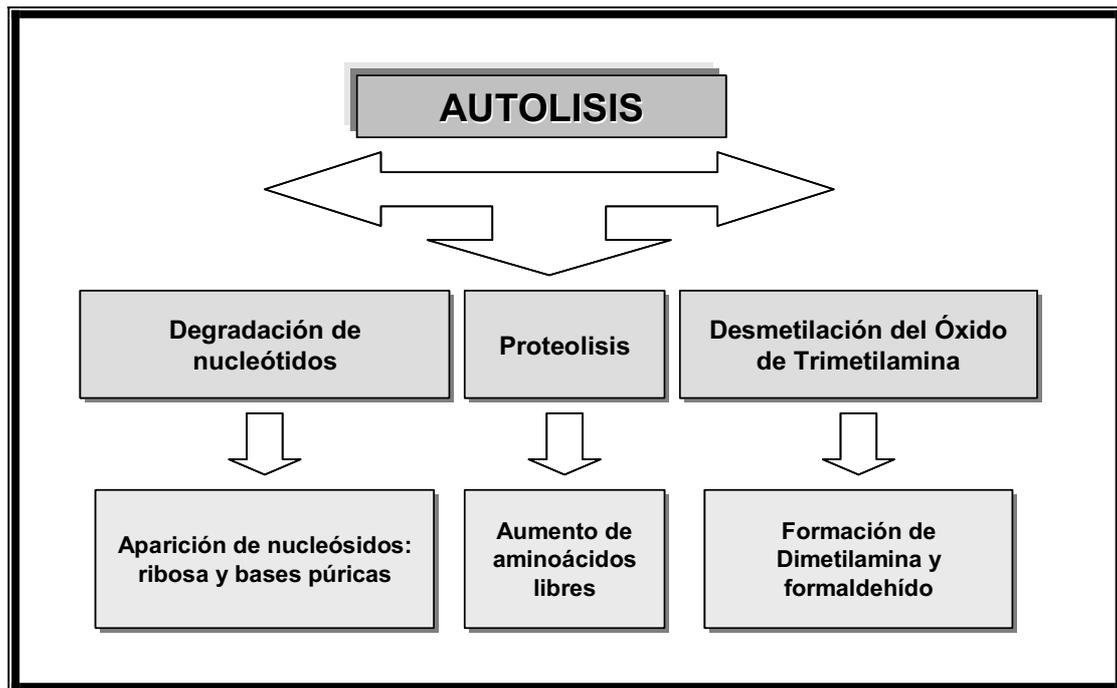
El tiempo entre el inicio y la resolución del rigor mortis depende de varios factores como la especie de pescado, talla, método de captura, manipulación, temperatura y condiciones físicas del pescado. En pescado exhausto (como las especies capturadas por arrastre) y en pescado almacenado a altas temperaturas, la fase de rigor aparecerá y pasará rápidamente. En pescados pequeños, veloces y fatigados sucede lo mismo, mientras que en pescados grandes y pescados planos tarda, en general, más tiempo. El tiempo desde la muerte hasta el final del rigor en el caso del boquerón es aproximadamente de 18 horas (Huss, 1995).

A medida que se deteriora el pescado van apareciendo cambios en su olor y sabor debido a la presencia o ausencia de la inosina monofosfato (IMP) y otros 5'-nucleótidos. La inosina es más o menos insípida mientras que la hipoxantina imparte un sabor agrio o amargo al pescado en procesos de deterioro (Spinelli, 1966). La pérdida de sabor en la carne del pescado es, por lo tanto, atribuida a la degradación de la IMP (Valle y Malle, 1998). El origen y formación de estas moléculas se tratarán en el apartado siguiente: cambios autolíticos.

Otro factor que puede producir cambios en el sabor y olor del pescado se debe a los procesos de oxidación de la fracción lipídica. En el caso de pescados grasos como el boquerón, estos cambios conducen a serios problemas de calidad, como la aparición de sabores y olores rancios. El elevado porcentaje de ácidos grasos insaturados en el pescado lo hace muy susceptible a sufrir procesos de enranciamiento. Los enlaces insaturados captan fácilmente oxígeno, viéndose favorecida esta captación por la luz, las temperaturas elevadas y la presencia de trazas de metales (Cu, Fe).

### **3.1.2. Cambios autolíticos**

Tras la instauración del rigor mortis, en el pescado se dan una serie de procesos autolíticos. Este tipo de reacciones se deben a enzimas endógenos de la carne del pescado y están caracterizadas por ser consecuencia del agotamiento de los recursos energéticos. Los cambios autolíticos son muy diversos. La figura 3.2 muestra los principales.



**Figura 3.2.** Cambios autolíticos en el pescado post-mortem.

Los primeros procesos autolíticos que ocurren en el tejido muscular del pescado se relacionan con los hidratos de carbono y los nucleótidos. Dentro del pescado, el glucógeno se concentra más en el músculo oscuro que en el músculo blanco, y por ello la actividad autolítica es mayor en el músculo rojo que en el blanco. Generalmente, coincidiendo con la proteolisis comienza la lipólisis de la grasa, lo que da lugar a la liberación de ácidos grasos, siendo muy importantes los fenómenos posteriores de autoxidación que se producen sobre ellos. Estas reacciones se suceden descomponiendo el ácido graso en pequeños fragmentos (cetonas, ácidos,...) que pueden reaccionar con otros compuestos del músculo y modificar sus características. Estas reacciones que se dan en el pescado, cobran más importancia cuanto mayor sea el contenido lipídico del mismo (Monteagudo-Torres, 2002).

La degradación de ATP tiene lugar por reacciones de defosforilación y desaminación dando lugar a adenosín difosfato (ADP), adenosín monofosfato (AMP), inosina monofosfato (IMP), inosina (HxR) e hipoxantina (Hx). Antes del comienzo del rigor mortis, el glucógeno y el ATP casi han desaparecido mientras se acumula IMP y posteriormente HxR. Cuando los niveles de IMP y HxR empiezan a disminuir, el contenido de Hx aumenta. Los procesos autolíticos descritos se producen de la misma forma en todos los pescados pero la velocidad varía mucho entre especies. Esto hace que la determinación

de nucleósidos como la hipoxantina se pueda utilizar para evaluar el grado de frescura (Huss, 1995).

Los cambios autolíticos en las proteínas son mucho menos pronunciados que los cambios vistos en los nucleótidos. Se han aislado diversas proteasas del músculo de pescado, pero han sido las catepsinas las enzimas proteolíticas mayormente descritas. Las catepsinas normalmente se encuentran empacadas en los lisosomas y se encuentran inactivas dentro del tejido vivo. Son liberadas a los fluidos celulares en caso de abuso físico o congelación y descongelación post mortem del músculo. Aunque dichas enzimas presentan, en general, una baja actividad autolítica, se cree que las catepsinas D y L son las más activas en la degradación autolítica del tejido muscular de pescado.

Los péptidos de bajo peso molecular y los aminoácidos libres producidos por la autólisis de las proteínas aceleran el crecimiento de las bacterias del deterioro. También puede ocurrir la descarboxilación de aminoácidos, produciendo aminas biógenas. Así como la degradación proteica no añade olores ni sabores significativos al pescado hasta estados muy avanzados de la alteración, la desnaturalización de las proteínas da lugar a un ablandamiento de la carne del pescado que dificulta o impide su procesamiento.

En el caso de almacenamiento en congelación, el cambio autolítico predominante es la desmetilación del óxido de trimetilamina que da lugar a dimetilamina y formaldehído de forma equimolecular. El enzima responsable es la óxido de trimetilamina desmetilasa y se encuentra unido a la membrana, volviéndose más activo cuando el tejido de la membrana se rompe por la congelación o artificialmente. El formaldehído producido induce el entrecruzamiento de las proteínas musculares ocasionando endurecimiento del músculo y pérdida de la capacidad de retener agua.

### **3.1.3. Cambios bacteriológicos**

La carne y los órganos internos del pescado sano recién capturado son generalmente estériles, pero existe flora contaminante en piel, agallas e intestino, que depende del ambiente en el que han vivido los peces y su alimentación (Pascual-Anderson, 2000). Por un lado, la piel hace de barrera para impedir la entrada de microorganismos y por otro lado, el peritoneo protege la zona intestinal. Durante la captura y manipulación del pescado

tienen lugar desgarros y roturas de tejido que permiten la colonización bacteriana del músculo por parte de la flora característica del pescado. La entrada de microorganismos dependerá de lo robusta que sea la piel y de lo gruesa que sea la capa de mucus dérmico del pescado, ya que éste ejerce una actividad inhibitoria mediante mecanismos protectores como los lisozimas. A la vez, la invasión bacteriana del pescado se ve favorecida por los cambios debidos a la autólisis, los cuales convierten la carne de pescado en un medio rápidamente utilizado por las bacterias, ya que contiene compuestos de bajo peso molecular como dipéptidos y aminoácidos libres.

La flora bacteriana inicial en pescados de agua templada está dominada por bacterias gram-negativas, bacilos psicrófilos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* y *Vibrio*. Después de una fase de demora, cuya duración depende básicamente de la temperatura, las bacterias del pescado inician un crecimiento exponencial a lo largo del deterioro alcanzando valores de  $10^8 - 10^9$  unidades formadoras de colonias (ufc)/g de carne o  $\text{cm}^2$  de piel cuando el deterioro es manifiesto. Tendrán lugar cambios cualitativos en función de las condiciones de almacenamiento. Las *Pseudomonas sp.* y *Alteromonas sp.* pueden llegar a ser los géneros dominantes en pescados de mar mantenido a bajas temperaturas (Huss, 1995).

Inicialmente, el crecimiento se da bajo condiciones aerobias utilizando como sustrato los hidratos de carbono y el lactato. En cierta manera, el crecimiento de microorganismos aerobios da lugar a la formación de microclimas anaerobios en la superficie del pescado, que favorece entonces el crecimiento de las bacterias anaerobias facultativas.

### **3.2. MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL PESCADO**

Un método de determinación de la frescura o de la calidad de un pescado, debe ser rápido, fiable, coincidente con la apreciación sensorial y, preferiblemente, aplicable a todos los alimentos marinos. Debido a la gran variedad de especies y de modificaciones bioquímicas existentes, éste es difícil de lograr. En este sentido, se han propuesto numerosos métodos de

evaluación de la frescura y calidad del pescado: sensoriales, físicos, químicos y microbiológicos. Ningún método aislado suele ser suficiente, por lo que frecuentemente se aconseja realizar al menos dos pruebas: una para determinar la pérdida de frescura, si es que se produjo, y otra para detectar el deterioro microbiano (Morales y col., 1996).

### **3.2.1. Métodos sensoriales**

Los métodos organolépticos o sensoriales utilizan los órganos de los sentidos para evaluar características del pescado como su aspecto, textura, olor, color, sabor..., valorando los cambios organolépticos desarrollados progresivamente en el pescado hasta su deterioro. Son los más utilizados en las inspecciones diarias de lonjas, puertos y mercados y en ellos se apoyan los consumidores y los inspectores de los alimentos para determinar la frescura, calidad e idoneidad de los diferentes lotes de pescado.

Los métodos sensoriales no requieren de equipos ni materiales especiales, son rápidos y permiten la valoración simultánea de más de un parámetro en diferentes muestras de pescado. Sin embargo, el resultado está sometido a las impresiones subjetivas del panel de catadores (hecho que se puede reducir mediante la aplicación de una sistemática adecuada y un entrenamiento continuado de dicho panel). Además, en el extremo en el que se intente diferenciar entre el llamado límite de frescura y un estado de alteración incipiente, se ha demostrado la necesidad de disponer de otros métodos objetivos de carácter físico o químico que permitan resolver este problema (Veciana-Nogués, 1999).

Se han desarrollado numerosos esquemas para el análisis sensorial de especies concretas de pescado (Nielsen y col., 1992; Botta, 1995; Huidobro y col., 2000; Sveinsdottir y col., 2002; Baixas-Nogueras y col., 2003). Sin embargo, en Europa el método más utilizado es un esquema no específico para una especie concreta, propuesto en enero de 1976 (CEE/103/76) y modificado 20 años después (CEE/2406/96). Las bases del análisis sensorial, los diferentes métodos existentes y su aplicación en la evaluación de la calidad del pescado, se describen en el capítulo 4 de esta memoria.

### **3.2.2. Métodos físicos**

Los métodos físicos son generalmente no destructivos, sencillos y de fácil aplicación, por lo que resultan muy útiles en la analítica de rutina y pueden utilizarse fuera del laboratorio. Sin embargo, la información que ofrecen es a menudo limitada y se suelen utilizar únicamente como complemento de otro tipo de técnica de evaluación (Veciana-Nogués, 1999).

Existen numerosos métodos físicos para la determinación de la calidad del pescado. A continuación se describen cuatro de los más utilizados.

#### **3.2.2.1. Resistencia eléctrica de la carne del pescado**

Las propiedades eléctricas de la piel y tejido muscular del pescado cambian después de su muerte. Estos cambios se traducen en una disminución gradual de la resistencia al paso de la corriente eléctrica, atribuible al deterioro de las membranas celulares (Ólafsdóttir y col., 2004).

Se han desarrollado unos instrumentos: el Torrymeter (Reino Unido), el Intellectron Fish Tester (Alemania) y el RT-Freshness Grader (Islandia) que proporcionan una lectura rápida de la resistencia al paso de la corriente eléctrica y que pueden calibrarse en términos del grado de alteración o de la vida útil que le queda al pescado antes de que sea inadecuado para el consumo humano (Morales y col., 1996). Los valores de aceptabilidad según este método, varían en función de la especie de pescado que se está analizando.

Estos aparatos son pequeños, manejables, se colocan directamente sobre el pescado sin dañar la muestra durante la prueba, dan el resultado de forma inmediata y se correlacionan bien con los métodos sensoriales, cosa que los hace muy útiles en las lonjas, salas de recepción, mercados y otros lugares de control de calidad. Sin embargo, tienen el inconveniente de que no son útiles en pescado fileteado ni congelado (Ólafsdóttir y col., 1997).

#### **3.2.2.2. Índice de refracción del humor vítreo**

Los ojos del pescado son limpios y claros en el momento de ser capturado. A medida que avanza el deterioro, los líquidos oculares se van desecando y adquiriendo cierta turbidez, hecho que hace que varíe el índice de refracción del fluido del ojo. Para realizar la medición, el líquido ocular se extrae de la

cámara anterior o posterior del ojo con la ayuda de una jeringa. La gota obtenida se deposita en un refractómetro de Abbe para efectuar la medición.

Es un método objetivo y no destructivo aplicable sobretodo a pescados magros, ya que en los grasos como el boquerón existe mayor fluctuación en los índices de refracción de referencia. Como sucede con otros métodos físicos, este método no es aplicable a productos derivados.

### **3.2.2.3. pH**

Por lo general, el pH del pescado inmediatamente después de su captura es 7. Posteriormente desciende a 6,2 – 6,5 por el acúmulo de ácido láctico y por último aumenta ligeramente debido a la formación de compuestos básicos (Huss, 1995; Pascual Anderson, 2000).

La determinación de pH se puede realizar directamente con un pHmetro sobre una masa homogénea de carne de pescado triturada, y en caso de no lograr la homogeneidad o de tratarse de una muestra excesivamente seca se recomienda hacer una dilución con agua destilada.

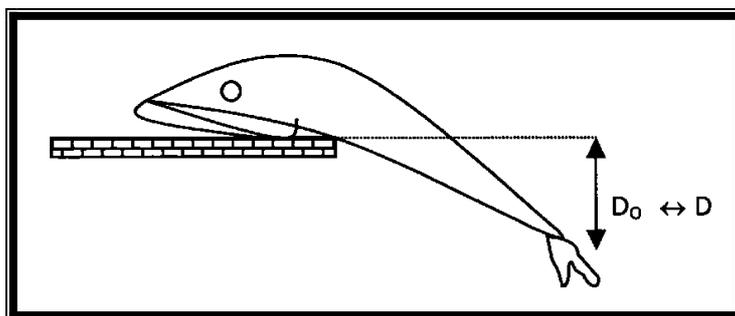
Es un método rápido que se puede aplicar *in situ*, pero presenta el inconveniente de ser destructivo. Resulta difícil relacionar un determinado valor de pH con el grado de frescura, ya que el pH final que se alcanza tras la muerte del pescado depende de las reservas glucolíticas de ese momento, algo que es muy variable ya que dependerá del estado nutricional del pescado y del tipo de captura empleada. Ruiz–Capillas y Moral (2001) proponen, a pesar de encontrar un aumento significativo del pH durante el deterioro del pescado, que se utilice este parámetro más como una guía de calidad que como un índice propiamente dicho.

### **3.2.2.4. Rigidez cadavérica**

Tal y como se ha descrito anteriormente, tras la muerte del pescado se instaura el rigor mortis o rigidez cadavérica que con el tiempo se resolverá, lo que supone que el músculo del pescado se reblandecerá. Bito y col. (1983) propusieron una valoración objetiva basada en un índice obtenido tras aplicar la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de rigidez (\%)} = (D_0 - D) / D_0 \times 100$$

Para poder obtener los datos de la fórmula, la cabeza del pescado se coloca sobre una tabla horizontal tal y como se indica en la figura 3.3. Se miden los valores  $D_0$  (distancia inicial) y  $D$  (distancia transcurrida después de un cierto tiempo).



**Figura 3.3.** Medida del índice de rigidez (Bito y col., 1983).

### 3.2.3. Métodos químicos

Los métodos químicos aportan generalmente, resultados objetivos, fiables y seguros, pero requieren en muchos casos de personal experimentado e instrumentación que, a veces, tiene un coste elevado. Es por ello, que actualmente se tiende a desarrollar métodos sencillos y de menor coste que puedan ser aplicables en el análisis rutinario.

La mayoría de los métodos químicos utilizados en la evaluación de la calidad del pescado implican el análisis de una sola sustancia o de diferentes sustancias que pertenecen a la misma familia. Por ello, para tener una idea global se considera mejor determinar más de uno de estos parámetros. Sin embargo, presentan la ventaja respecto a otro tipo de métodos, de poder ser utilizados tanto para la evaluación de la frescura del pescado sin procesar, como de la frescura del pescado utilizado como materia prima para la obtención de derivados en los que los tratamientos tecnológicos aplicados frecuentemente modifican el sabor, olor y color.

Para el análisis de los parámetros relacionados con el deterioro o la pérdida de frescura, existen técnicas de tipo general, aplicables a la mayoría de especies de pescado. Se pueden clasificar en:

- Métodos relacionados con cambios en la fracción nitrogenada básica
- Métodos basados en la medida de la degradación del ATP
- Métodos relacionados con cambios en la fracción lipídica

También se han propuesto métodos con aplicación específica a determinados grupos o especies de pescado. Así, la determinación del amoníaco evalúa el grado de deterioro de peces elasmobranquios, en los que se forman grandes cantidades de esta sustancia debido a la acción de los microorganismos al descomponer la urea (Huss, 1995). En el caso de crustáceos, la determinación del indol, producto de degradación del triptófano, se usa como alternativa al examen organoléptico, ya que se acepta que su formación es debida a una acción bacteriana previa a la congelación o a otro tipo de procesos aplicados para la obtención de sus derivados (Chang y col., 1983).

### **3.2.3.1. Compuestos nitrogenados de carácter básico**

#### **Nitrógeno básico volátil**

Tanto la actividad bacteriana, como las modificaciones bioquímicas fruto de la actividad autolítica del pescado dan lugar a una serie de compuestos nitrogenados básicos como el amoníaco, la trimetilamina (expresado como nitrógeno de trimetilamina, N-TMA), la dimetilamina (expresado como nitrógeno de dimetilamina, N-DMA) y la monometilamina, conocidas en su conjunto como Nitrógeno Básico Volátil Total (N-BVT), a los que se les considera representativos de la alteración del pescado (Hollingworth y col. 1990; Huidobro y Tejada, 1990). La determinación de N-BVT presenta una elevada correlación con el grado organoléptico de aceptación del pescado y se aplica en ensayos de rutina debido a que puede ser un método relativamente sencillo de aplicar y barato (Connell, 1995).

El componente mayoritario de la fracción del N-BVT es el N-TMA, compuesto originado por la reducción bacteriana del óxido de trimetilamina (OTMA) y al que se considera el responsable del característico “olor desagradable” del pescado. Cuando el desarrollo o la actividad bacteriana están impedidos, como es el caso de temperaturas de congelación, a partir del precursor OTMA se

puede formar N-DMA y formaldehído en cantidades equimoleculares por acción de enzimas del propio pescado (Lundstrom y Racicot, 1983). Así, el N-TMA está relacionado con el almacenamiento del pescado en refrigeración, mientras que el N-DMA con el pescado mantenido en congelación.

Se han propuesto diferentes índices para evaluar la calidad del pescado, consistentes en la adición y/o cociente de las sustancias anteriormente descritas:

- **P-ratio: N-TMA / N-BVT.** Proporciona valores relativamente similares entre diferentes especies. Malle y Poumeyrol (1989) proponen valores máximos del 30% de P-ratio para bacalao, caballa y arenque aptos para el consumo humano.
- **S-ratio: N-TMA / N-TMA + OTMA.** Evita el efecto de variabilidad estacional y variabilidad entre especies (FAO, 1969). Su uso no está muy extendido.
- **H-ratio: N-TMA + OTMA / N-BVT.** Durante el período inicial del almacenamiento tiene lugar una pérdida de OTMA que no es resultado de una reducción a N-TMA, sino que, como ocurre en el pescado congelado, el precursor es convertido en N-DMA. El valor del H-ratio, con el numerador decreciente y el denominador creciente por la producción de N-DMA, exagera el efecto con lo que podría ser la relación más sensible como índice de frescura durante los primeros días del almacenamiento (Horner, 2000).

La formación de N-TMA y de N-BVT, su aplicación como índices de calidad, así como los métodos para su determinación se detallan más ampliamente en el capítulo 5 de esta memoria.

### **Aminas Biógenas**

Las aminas biógenas son bases orgánicas de bajo peso molecular, presentes en animales, plantas y microorganismos como consecuencia de diversos procesos metabólicos. En el pescado se acepta que el origen de contenidos elevados de aminas biógenas es fruto de la actividad aminoácido descarboxilasa que presentan algunos microorganismos, y es por ello que su determinación se ha propuesto para reflejar el deterioro del pescado (Brink y col., 1990; Halász y col., 1994).

Las aminas biógenas son termoresistentes, por lo que su determinación permite ampliar la evaluación de la calidad del pescado a derivados en los que su elaboración comporta tratamientos térmicos. Entre otros aspectos, el interés de la determinación de las aminas biógenas se centra en la necesidad de controlar el contenido de algunas de ellas (como la histamina) ya que se han descrito problemas toxicológicos relacionados con el consumo de pescado que presentaba contenidos elevados de estas sustancias (Mariné-Font, 1995b; Lehane y Olley, 2000).

El origen y formación de las aminas biógenas, su interés, los factores influyentes en su acumulación en el pescado y los métodos para su determinación, se desarrollan ampliamente en el capítulo 6 de esta memoria.

### **3.2.3.2. Métodos basados en la medida de la degradación del ATP**

En la mayoría de las especies de pescado, la degradación del ATP sigue la secuencia especificada en la figura 3.4, aunque la velocidad en la que se dan estos cambios, es muy variable. Inmediatamente después de la muerte del pescado, el ATP se degrada rápidamente a IMP (inosina monofosfato) mediante la formación de ADP y AMP por la actividad de enzimas endógenos. La posterior degradación del IMP a inosina e hipoxantina (Hx) es más lenta (Ólafsdóttir y col., 1997).

En el último paso de la secuencia, participan tanto enzimas autolíticos como enzimas de origen bacteriano. Es por ello que la metabolización de inosina a Hx presenta mayor variabilidad entre especies que las reacciones que le preceden. En función de esta velocidad, se han clasificado las especies en (Ehira y Uchiyama, 1986):

- **Especies formadoras de inosina:** boquerón, atún, esturión... Se acumula inosina debido a la baja actividad de los enzimas que catalizan la transformación a Hx.
- **Especies formadoras de hipoxantina:** platija, rodaballo...
- **Especies de tipo intermedio:** salmón, congrio...

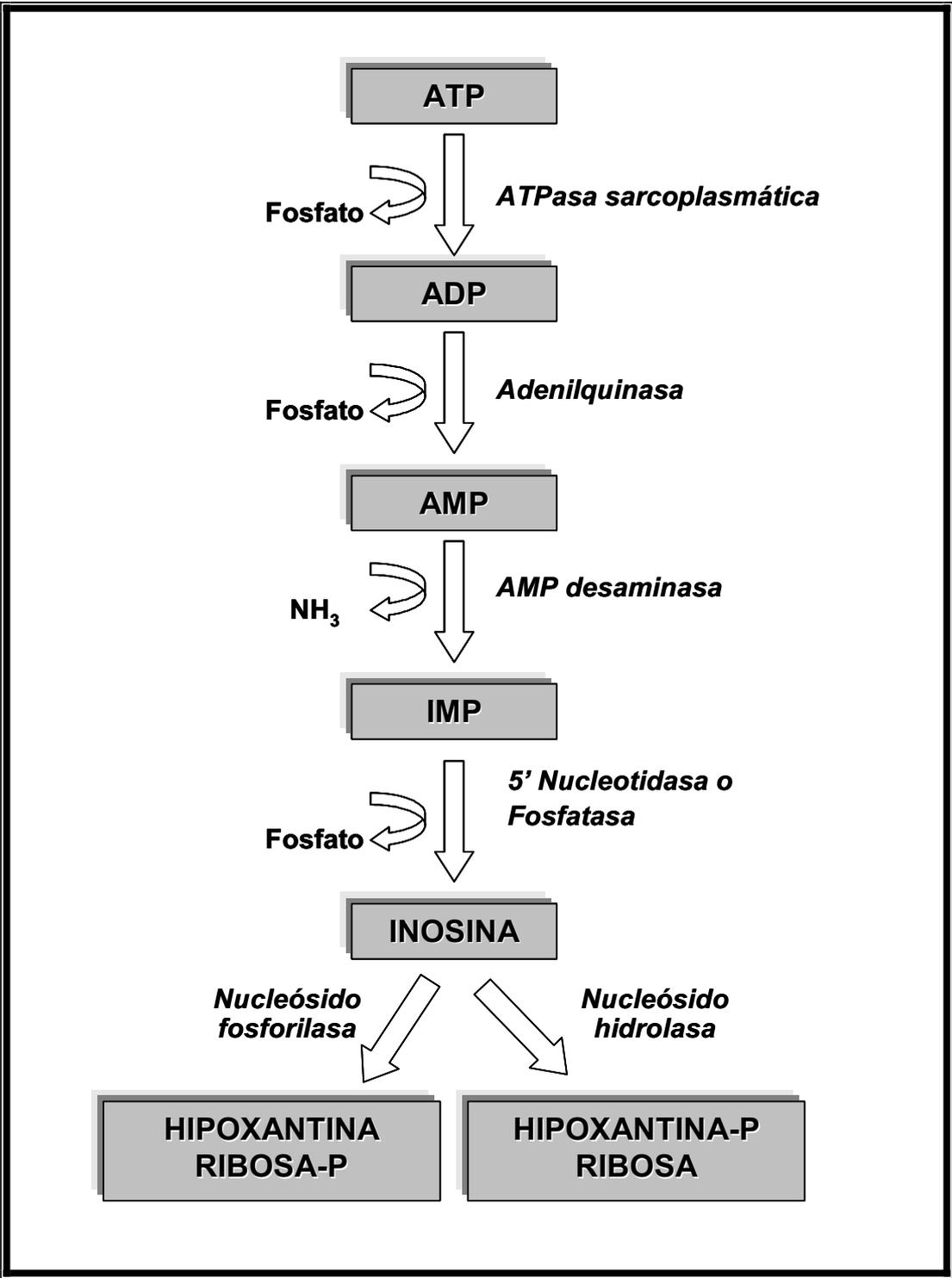


Figura 3.4. Secuencia de degradación del ATP.

La determinación del ATP y sus metabolitos presenta una doble ventaja. Por un lado permite evaluar la pérdida de frescura previa a la proliferación bacteriana (Huss, 1995). Por otro, la Hx es un metabolito termoestable, con lo que su análisis puede proporcionar información acerca del pescado fresco, refrigerado y en conserva (Burns y Ke, 1985).

En 1959, Saito y col. pusieron a punto una técnica para la determinación cuantitativa de los derivados del ATP. Definieron el índice K, según la siguiente expresión:

$$K = \frac{\text{Hx} + \text{Inosina}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP} + \text{IMP} + \text{Hx} + \text{Inosina}} \times 100$$

El índice K es un valor relativo que mide la proporción entre compuestos defosforilados con respecto al total de ATP y sus metabolitos en una misma muestra. Los valores obtenidos tras la aplicación del índice K permiten clasificar el pescado en:

- **K < 20 %**: pescado muy fresco, apto incluso para su consumo crudo.
- **20 < K < 40**: pescado que se puede considerar fresco, pero que debe cocerse antes de ser consumido.
- **K > 40 %**: pescado no fresco, no apto para el consumo humano.

Se han desarrollado otros índices para el análisis de la calidad del pescado basados en la formación de los metabolitos de degradación del ATP: el *índice G* (Burns y Ke, 1985) en el que se da más importancia a la formación de inosina o el *índice H* (Luang y col., 1992) basado en la Hx, pero su uso no está tan extendido como el del índice K.

### 3.2.3.3. Métodos relacionados con cambios en la fracción lipídica

Estos métodos tienen, en general, poca importancia en la evaluación del pescado fresco debido a que en la mayoría de los casos, el pescado se

considera no apto para el consumo humano (la proliferación bacteriana está muy avanzada) antes de que las modificaciones de la fracción lipídica sean evidentes. Por el contrario, resultan índices útiles para la evaluación del pescado congelado ya que la congelación inhibe el crecimiento microbiano, pero no evita totalmente ni las modificaciones químicas, ni las debidas a los enzimas del propio pescado.

El fenómeno de rancidez es más evidente en pescados grasos como la sardina, el boquerón o el atún que en pescados magros. Los lípidos del pescado (altamente insaturados) reaccionan con el oxígeno dando lugar a peróxidos, compuestos inodoros e insípidos. Estos peróxidos pueden posteriormente volverse a oxidar dando lugar a aldehídos y cetonas, que confieren al pescado olores y sabores desagradables (Huss, 1995).

Se dispone de ensayos para medir ambas fases de la oxidación de lípidos. El valor de peróxidos da una medida de la primera etapa. Es útil para seguir la evolución del proceso a lo largo del tiempo y aunque Connell (1995) indicó que valores superiores a 10-20 (las unidades son ml de tiosulfato de sodio 0,002 N requeridos para valorar el yodo liberado por 1 g de grasa extraída del pescado) indican que el pescado probablemente huele o tenga gusto a rancio, valores inferiores pueden ser indicativos tanto de un bajo grado de rancidez como de estados muy avanzados de deterioro. De igual forma, la segunda etapa se puede valorar mediante la prueba del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). Valores de TBA superiores a 1-2 (micromoles de malonaldehído presente en 1 g de grasa) son indicativos de rancidez organoléptica.

#### **3.2.4. Métodos microbiológicos**

La finalidad de los métodos microbiológicos es ofrecer información sobre la calidad higiénica durante la manipulación, elaboración o almacenamiento del producto, así como de la posible presencia de microorganismos de importancia para la salud pública (Huss, 1995; Morales, 1996).

La actividad de los microorganismos es el principal factor que limita la durabilidad del pescado fresco. Para el análisis microbiológico rutinario del pescado se utilizan habitualmente dos tipos de métodos: los que hacen un recuento del número total de microorganismos presentes en el pescado y los que se basan en el recuento de un grupo concreto. Así, la legislación española propone como límites máximos para que el pescado sea apto para el consumo humano, valores de  $10^6$  ufc / g de bacterias mesófilas o  $10^3$  ufc / g de enterobacterias (MSC, 1991).

En los últimos años está adquiriendo importancia el uso de técnicas para el análisis de *Microorganismo Específicos del Deterioro* (MED). Entre estos microorganismos, destaca *Shewanella putrefaciens*, bacteria que produce sulfhídrico en algunos pescados mantenidos en refrigeración en condiciones anaerobias y *Photobacterium phosphoreum*, bacteria identificada como MED en pescado conservado en atmósferas modificadas (Connell, 1995; Ólafsdóttir y col., 1997). Parece ser, que la correlación entre los MED y la frescura del pescado es mejor que entre los recuentos totales del pescado y su frescura (Dalgaard, 1995).

Un inconveniente de los métodos microbiológicos tradicionales es que normalmente requieren entre 24 horas y 3 días para la obtención de resultados, hecho que limita su utilización. Es por ello, que se han propuesto métodos rápidos, basados generalmente en medidas indirectas de tipo fisicoquímico que permiten ahorrar tiempo en la obtención de resultados. Estos métodos rápidos incluyen los basados en técnicas de impedimetría, microcalorimetría, turbidimetría, radiometría, epifluorescencia directa sobre filtro, bioluminiscencia, el ensayo de la actividad aminopeptidásica ligada a la pared celular y diversos métodos inmunológicos y genéticos (González y col., 1994a y 1994b). Sin embargo, ninguno de ellos ha tenido aún una aceptación general en la determinación de la frescura del pescado, unos por excesivamente costosos, otros por requerir personal especializado y, en otros casos, por no haberse demostrado su eficacia.

Aún con las limitaciones anteriormente comentadas de coste y tiempo de los métodos microbiológicos, tal y como ya se ha comentado, la determinación de bacterias mesófilas totales y de enterobacterias se recomienda en la legislación vigente (RD 1437/1992), junto con determinaciones químicas y físicas, en los casos en los que existan dudas con el análisis sensorial. Ésto señala que ante la variedad de métodos propuestos para estimar la frescura y calidad del pescado, el método ideal está aún por desarrollar, ya que éste dependerá de

muchos factores y cada situación puede requerir un análisis diferente según la especie de pescado, hábitat, modo de captura... Muchos de los métodos desarrollados se han desechado como métodos rutinarios de análisis y otros resultan ineficaces en determinadas circunstancias. De ahí que para determinar la frescura y calidad del pescado, se recomiende el empleo conjunto de varios métodos de análisis. En este sentido, sería interesante desarrollar nuevos métodos que fueran más rápidos, sencillos y baratos y que pudieran utilizarse tanto en las lonjas como en las industrias de procesado del pescado. Mientras tanto, la inspección organoléptica sigue siendo el método más utilizado en las labores rutinarias de inspección del pescado, tanto en lonjas como en mercados y comercios.



## **4. EVALUACIÓN SENSORIAL**

### **4.1. INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS SENSORIAL**

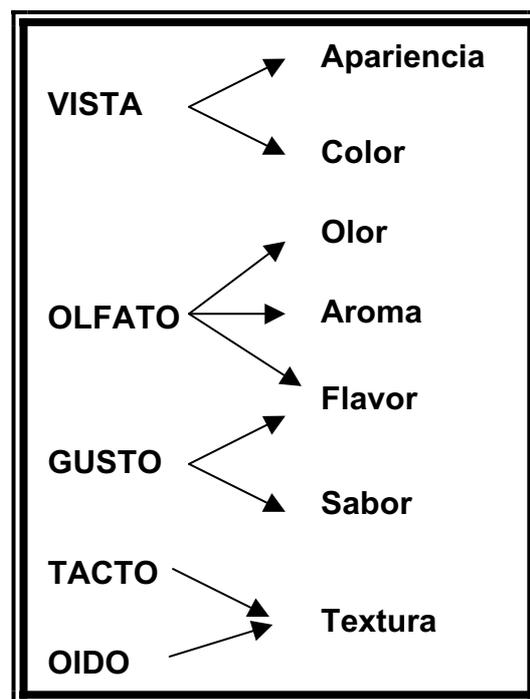
El análisis o evaluación sensorial, se puede definir como el análisis de los alimentos a través de los sentidos. Desde la antigüedad se ha utilizado la valoración sensorial para aceptar o rechazar los alimentos, así como para asignarle un determinado valor comercial. Presenta dos grandes ventajas: la rapidez y la sencillez. Sin embargo, las sensaciones que motivan al rechazo o aceptación varían con el tiempo y el momento que se perciben, dependiendo tanto de la persona como del entorno. Para que el análisis sensorial se pueda realizar con un grado importante de fiabilidad, será necesario objetivar y normalizar los términos y las condiciones que puedan influir en las determinaciones. Teniendo esto en cuenta, Sancho y col. (1999) definieron de forma más estricta el análisis sensorial como el examen de los caracteres organolépticos de un producto mediante los sentidos, obteniendo datos cuantificables y objetivables.

La evaluación sensorial tiene múltiples aplicaciones en alimentos. Puede ser utilizada para el desarrollo de productos o para la mejora de los ya existentes, con el fin de efectuar cambios en el proceso, reducir costes mediante la selección de un nuevo ingrediente, efectuar el control de calidad, determinar la estabilidad durante las distintas condiciones de almacenamiento y su vida útil, determinar graduaciones de calidad, la aceptación, preferencia y opiniones del consumidor.

### 4.1.1. Propiedades sensoriales

(Anzaldúa-Morales, 1994; Sancho y col., 1999)

Las propiedades sensoriales son los atributos de los alimentos que se detectan por medio de uno o más sentidos. La figura 4.1 muestra de forma esquemática la relación de los sentidos y las propiedades sensoriales más significativas. Básicamente, se pueden dividir en tres grupos no netamente diferenciados, los de apariencia, los de flavor y los de textura.



*Figura 4.1. Participación de los sentidos en las distintas percepciones sensoriales.*

#### 4.1.1.1. Atributos de apariencia

**APARIENCIA.** Es el atributo que nos da una valoración inicial global del alimento. Frecuentemente es el que determina su aceptación o el rechazo. Al analizar la apariencia, se evalúan a la vez otras propiedades más concretas como son el color, la forma, el tamaño, el brillo...

**COLOR.** Es la cualidad de la sensación provocada en la retina de un observador por las ondas luminosas de  $\lambda$  entre 380-760 nm. El color resulta de la interacción de la luz en la retina y un componente físico que depende de determinadas características de la luz:

- El *tono* está determinado por el valor exacto de la longitud de onda de la luz reflejada.

- *La intensidad* depende de la concentración de las sustancias colorantes dentro del alimento.
- *El brillo* depende de la cantidad de luz reflejada por el cuerpo, en comparación con la luz que incide sobre él.

La medición del color puede efectuarse usando escalas de color. Estas pueden consistir en ejemplos típicos de alimentos, mostrando toda la gama de colores que pueden presentarse o usando fotografías. Se ha de tener en cuenta que el color puede interferir significativamente con otras propiedades sensoriales como el sabor y la textura.

#### **4.1.1.2. Atributos de flavor**

**OLOR.** Es la percepción por medio de la nariz de sustancias volátiles liberadas por los alimentos. La percepción de un olor no es constante, sino que tiende a disminuir con rapidez, como si hubiera una adaptación a éste. Por ello, las pruebas para la medición del olor han de ser rápidas, para no dar tiempo a que los catadores pierdan la capacidad de evaluarlo. Actualmente se están desarrollando unas narices electrónicas para el análisis y monitorización de los olores que desprende el pescado como consecuencia de su degradación. Se basan en una cabina cerrada, para que no existan interferencia con partículas del medio, donde se encuentran sensores electroquímicos concretos (CO, H<sub>2</sub>S, SO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>) capaces de determinar sustancias volátiles que se desprenden del pescado y le confieren un olor peculiar (Ólafsdóttir y col., 2004).

**AROMA.** Esta propiedad consiste en la percepción de las sustancias olorosas o aromáticas de un alimento después de haberse puesto en la boca. Dichas sustancias se disuelven en la mucosa del paladar y la faringe, y llegan a los centros sensores del olfato. Por tanto, las sensaciones se perciben en el órgano olfativo por vía retronasal (vía indirecta) durante la degustación. Ya que el aroma no es detectado por la nariz sino en la boca, ésta puede quedar insensibilizada a los aromas y sabores por el consumo de tabaco o alimentos picantes o muy condimentados.

**SABOR.** Se percibe principalmente en la lengua, aunque también en la cavidad bucal (paladar, pared posterior de la faringe y la epiglotis). Los cuatro sabores fundamentales son el ácido, dulce, salado y amargo.

**FLAVOR.** Este atributo es muy complejo, ya que combina las tres propiedades anteriores el olor, el aroma y el sabor. Se puede definir como el conjunto

complejo de propiedades olfativas y gustativas percibidas en la degustación y que pueden estar influidas por otras propiedades como las térmicas y las de textura. En la valoración del flavor, se une un cierto componente psíquico que relaciona todas estas sensaciones dando lugar a percepciones agradables o desagradables del conjunto.

### **4.1.1.3. La textura**

La textura es la propiedad sensorial de los alimentos detectada por los sentidos del tacto, la vista y el oído y que se manifiesta cuando un alimento sufre una deformación. En relación con la textura, el tacto nos dará información sobre la dureza, la viscosidad o la consistencia del alimento. La vista nos proporcionará datos referentes al grado de rugosidad o resequedad presente. El oído nos ofrecerá información sobre el crujido.

La textura de un alimento no es una característica de éste, sino que este término engloba varias características o propiedades de textura entre las cuales se encuentra la tersura, la fibrosidad, la elasticidad, la masticabilidad o la flexibilidad.

### **4.1.2. Factores implicados en el análisis sensorial**

La correcta realización del análisis sensorial supone la disponibilidad de una serie de personas entrenadas que constituirán el panel de cata. Para que los catadores puedan realizar correctamente el análisis deberán contar con un vocabulario claro y conciso, con la muestra a evaluar y con unos medios materiales adecuados (la sala de cata).

#### **4.1.2.1. Los catadores**

La selección y entrenamiento de las personas que formarán parte del panel de catadores son factores básicos de los que dependen en gran parte el éxito y la validez de las pruebas sensoriales.

No existe un acuerdo sobre el número mínimo de catadores que deben integrar un equipo sensorial, pero en general varía entre 6 y 24. Este número suele depender del tipo de prueba a realizar, del nivel de entrenamiento exigido, de

los requisitos para que los resultados sean significativos y de la existencia o no de financiación de los mismos (Bárcenas y col., 2000).

Anzaldúa-Morales (1994) recomienda considerar como criterios principales para escoger a los jueces o catadores la habilidad, la disponibilidad y el interés. Este autor señala que la disponibilidad de los integrantes del grupo sensorial es frecuentemente un factor crítico, más importante incluso que la habilidad. El procedimiento de selección debe ser específico para el tipo de producto a analizar y debe guardar estrecha relación con la prueba para la que se hace la selección (Bárcenas y col., 2000). Es importante seleccionar a personas que sean consumidores habituales del producto a evaluar o, en el caso de productos nuevos, que sean consumidores potenciales de dicho alimento.

El equipo de jueces sensoriales debe ser entrenado con el fin de que la respuesta obtenida sea lo más precisa y exacta posible (Piggott, 1995). El entrenamiento tiene la finalidad de desarrollar la habilidad para detectar, reconocer y describir un determinado estímulo sensorial. Por ello, a los catadores se les explica tanto las propiedades del alimento a evaluar como el esquema que van a utilizar en su evaluación. Así, en el análisis descriptivo, es habitual llevar a cabo tres tipos de sesiones con los panelistas: sesiones preliminares donde se expone el uso de diferentes métodos y sus posibles modificaciones, sesiones de entrenamiento donde se pretende familiarizar a los catadores con la técnica a utilizar en el alimento concreto a evaluar y sesiones de prueba donde se ponen en práctica las técnicas aprendidas (Carbonell y col., 2002). Antes de hacer la cata, los jueces o catadores deben evitar el uso de alcohol, tabaco, los alimentos con especias y el café.

#### **4.1.2.2. El vocabulario en el análisis sensorial**

El vocabulario ideal consiste en una lista de términos que describan de un modo exacto y preciso las características requeridas en el análisis, que sean fácilmente comprensibles para los catadores y que éstos las interpreten de forma similar, que puedan ser definidos mediante la utilización de una referencia o estándar, y en caso de utilizarse para un informe técnico, que éste pueda ser interpretado por aquellos individuos que lo examinen. Sin embargo, en la práctica esto no resulta fácil y algunos de estos requisitos pueden llegar incluso a parecer contradictorios (Bárcenas y col., 2000).

Un problema que suele presentarse durante el desarrollo de los términos descriptivos es la generación de un número demasiado elevado de éstos.

Sauvegeot (1993) indicó la importancia que puede tener la fatiga sensorial en la evaluación de los distintos alimentos, por lo que es común que en una etapa temprana del desarrollo de la lista, se reduzca este número mediante la discusión entre los miembros del panel de catadores. De esta forma, Sawyer y col. (1988) llegaron a una lista compuesta por 27 atributos para la descripción de productos de la pesca a partir de un número inicial de 153 términos.

Otro aspecto a tener en cuenta a la hora de seleccionar los términos es el poder establecer si se trata de atributos descriptores (descripción de un producto o especificación de sus características organolépticas) o discriminadores (comparación de muestras de un mismo tipo de producto, comprobar las diferencias por cambio de ingredientes o condiciones de almacenamiento) (Bárcenas y col., 2000).

### **4.1.2.3. La sala de cata**

Se pueden encontrar diseños variados para salas de catas con distintas posibilidades de equipamientos, de accesorios y comodidades, cuya finalidad no es otra que crear un clima confortable y facilitar los instrumentos necesarios para obtener la mayor seguridad en los resultados de los ensayos.

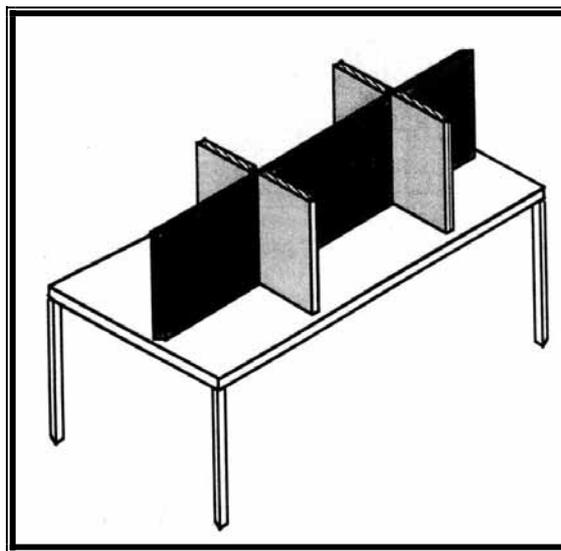
La sala en la que se llevará a cabo el análisis sensorial, debe reunir las siguientes condiciones:

- Debe ser un lugar tranquilo, confortable, decorado con discreción donde el catador no se distraiga y pueda concentrarse en su trabajo.
- Es recomendable que en la sala exista una ligera presión positiva de aire que impida la entrada de olores o aromas de las salas adyacentes.
- Es muy conveniente que la preparación de las muestras se realice en un área separada de la de cata. Con ello se evita la persistencia de olores y que los catadores vean o presuman aspectos de las muestras, que puedan predisponer sus valoraciones o inducir a falsas decisiones.

En función de la disponibilidad de espacio y frecuencia de los ensayos, puede utilizarse un laboratorio para la preparación de las muestras y hacer el análisis en una sala en la que se disponga de una mesa amplia con separaciones desmontables (Figura 4.2) que aislen a los catadores. Con ello se evitan no sólo los comentarios de cualquier tipo, sino también la inducción a prejuicios. El

material de la mesa y de las separaciones debe ser de fácil limpieza y de colores agradables (blanco neutro o gris claro). Sobre dicha mesa, se colocan:

- Las muestras
- El cuestionario
- Un vaso de agua potable sin olor ni sabor para que los catadores hagan enjuagues entre muestra y muestra
- Un recipiente para escupir el agua y las muestras que no se deseen tragar



**Figura 4.2.** *Improvisación de un área para pruebas sensoriales.*

Otros aspectos importantes en las salas de catas son la iluminación y la temperatura. La iluminación debe ser uniforme, suficiente pero no intensa y no debe influir en la apariencia del producto a probar. La temperatura debe ser lo más constante posible y debe estar comprendida entre 18 – 23 °C (Anzaldúa-Morales, 1994).

#### **4.1.2.4. La muestra**

Las muestras deben ser evaluadas en las mismas condiciones. Si los alimentos a evaluar requieren una preparación culinaria, se ha de establecer el tiempo de cocción, la cantidad de agua a añadir, el tiempo y condiciones de descongelación... con el objetivo de evitar que al realizar la cata haya condiciones dispares.

Las muestras deben servirse a la temperatura a la que suelen ser consumidas normalmente. En el caso de que el alimento se pueda resecar o cambiar de calidad durante la retención previa a la cata, deben tomarse precauciones para que estos cambios sean mínimos y uniformes en todas las muestras del mismo producto.

Las evaluaciones sensoriales no deben hacerse a horas muy cercanas a las de las comidas. Se recomienda como horarios adecuados entre las 11 de la mañana y la 1 de la tarde (en países como España donde se come después del mediodía) y las 5 y las 6 de la tarde (Anzaldúa-Morales, 1994).

La cantidad de muestra que debe darse a cada catador dependerá, casi siempre, de la disponibilidad y del número de catadores. En los alimentos que se presentan como una unidad pequeña que puede comerse de un bocado, la muestra debe ser una unidad. En el caso de alimentos grandes o a granel, pueden darse al juez muestras de 25 g. En el caso de alimentos líquidos, se recomienda que la muestra sea de al menos una cucharada (15 ml), mientras que cuando se dan a probar bebidas, pueden presentarse a los jueces muestras de 50 ml. El número de muestras a evaluar en una sesión no debe causar fatiga sensorial a los catadores.

La codificación de cada muestra no debe proporcionar al catador ninguna información sobre la identidad de la misma o del tratamiento que ha sufrido. Por ello, suelen utilizarse codificaciones de tres números o letras al azar para su identificación.

### **4.1.3. Métodos de análisis sensorial**

El tipo de pruebas a realizar en el análisis sensorial depende de la finalidad perseguida. Básicamente, se pueden dividir en tres grandes grupos. Dos de ellos consisten en pruebas objetivas: pruebas discriminativas y pruebas descriptivas. El tercer grupo, lo constituyen las pruebas subjetivas de aceptación. Las pruebas discriminativas son usadas para evaluar si existen diferencias entre las muestras, las descriptivas se emplean para determinar la naturaleza o intensidad de las diferencias. Las pruebas de aceptación están basadas en la medición de preferencias. La figura 4.3 esquematiza la principal diferencia entre ellas, así como algunos ejemplos de los 3 tipos de pruebas.

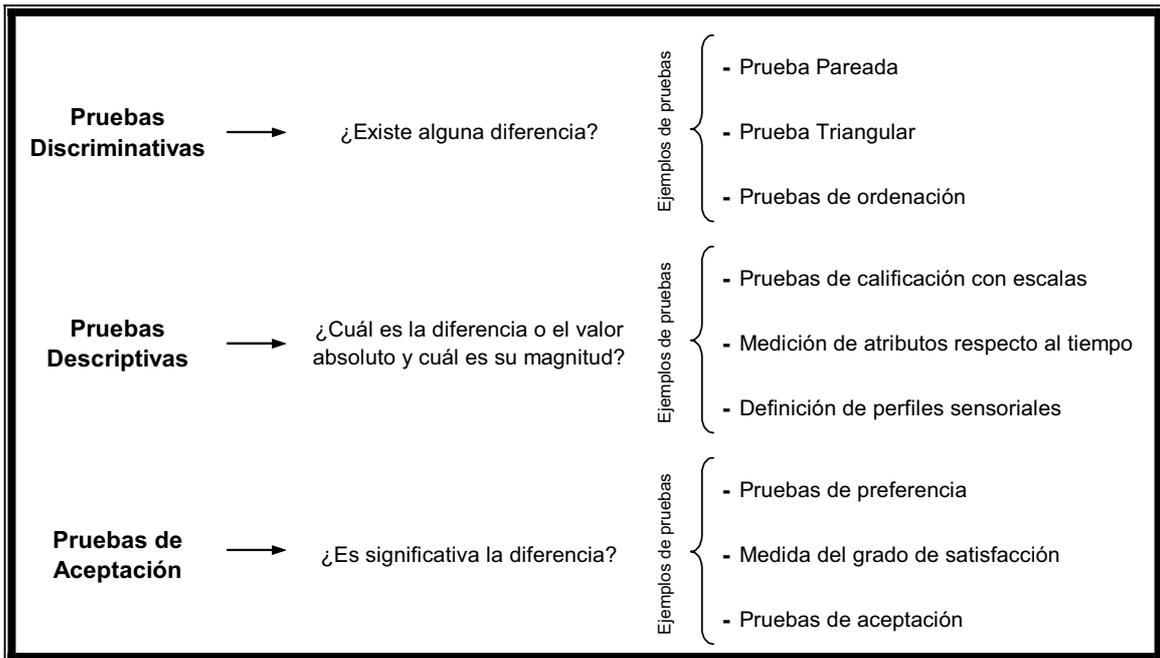


Figura 4.3. Métodos de análisis sensorial.

## 4.2. EVALUACIÓN SENSORIAL DEL PESCADO

### 4.2.1. Pescado crudo

Durante los últimos 50 años, se han desarrollado muchos esquemas para el análisis sensorial del pescado crudo. El primer método moderno y detallado, fue desarrollado en la Torry Research Station (Aberdeen, Reino Unido). La idea fundamental era que cada parámetro de calidad fuera independiente de otros parámetros. Posteriormente, la evaluación fue modificada agrupando las características descriptivas para ser expresadas en forma de puntuación. Hoy en día en Europa, el método más comúnmente usado para la evaluación de la calidad en el servicio de inspección y en la industria pesquera es el esquema de la UE, introducido en 1976 (CEE/103/76) y actualizado en 1996 (CEE/2406/96). Este esquema clasifica el pescado en diferentes categorías en función de un valor numérico obtenido tras la inspección organoléptica:

- E (extra), para pescado fresco
- A, para pescado menos fresco, pero sin contaminación bacteriana.

- B, para pescado que presenta contaminación bacteriana pero todavía es apto para el consumo humano
- C, para pescado no apto para el consumo humano, que debe ser decomisado y destruido, de forma que se asegure que no sea comercializado de nuevo

Aunque el esquema es aceptado en los países de la Unión Europea, existen algunas discrepancias dado que se utilizan parámetros generales y por tanto, no tienen en cuenta las diferencias entre especies. Para poder superar estas discrepancias, una de las alternativas existentes es el Método de Índice de Calidad o *Quality Index Method* (QIM).

El método QIM está basado en la evaluación de los parámetros sensoriales significativos del pescado crudo (piel, ojos, branquias...) utilizando un sistema de puntuación para cada parámetro (generalmente de 0 a 3, máximo 4). Ninguna muestra puede ser rechazada basándose en un único criterio, ya que se tienen en cuenta varios atributos simultáneamente. Por tanto, la puntuación total del QIM no se ve influenciada por pequeñas diferencias en las puntuaciones para un único atributo. Cuanto más baja sea la puntuación, más fresco es el pescado. Para puntuar los atributos, el evaluador cuenta con la descripción del mismo y frecuentemente con fotografías que muestran como dicho atributo se va deteriorando.

Dos de las ventajas más relevantes del QIM es que resulta específico para cada especie de pescado y describe de forma más objetiva y precisa los cambios más significativos detectados durante el almacenamiento (Botta, 1995). Existe una correlación lineal entre la calidad sensorial del pescado (expresada como una puntuación de deméritos) y su duración en hielo, lo cual hace posible predecir el tiempo de vida remanente del pescado en hielo (Alasalvar y col., 2002; Lougovois y col., 2003). Esto puede ser de utilidad para los comerciantes de pescado, ya que así podrán saber cuánto tiempo permanecerá aceptable su compra para la venta. Por tanto, el beneficio principal del QIM consiste en que el método proporciona al usuario una medida fiable y estandarizada de la frescura de un producto.

Debido a la importancia que está adquiriendo el desarrollo de métodos QIM dentro del análisis sensorial, en los últimos años se han celebrado diferentes congresos y se han subvencionado proyectos europeos donde el desarrollo y

aplicación de estos esquemas tiene especial relevancia. Entre ellos se puede destacar el *First joint trans atlantic fisheries technology conference* (33 Wefta Meeting, 2003), the *first open conference for presenting research results from the integrated project SEAFOODplus* (2004) o el *Seafood Quality Identification project* (2004). Además, el Danish Institute for Fisheries Research ha elaborado un programa de software (<http://www.qim-eurofish.com>) con el que se puede determinar, basándose en el método QIM, la frescura de 12 especies de pescado: bacalao, solla, eglefino, abadejo, gallineta nórdica, lenguado, camarón de groenlandia, perca oceánica, rémol, rodaballo, limanda y salmón. La tabla 4.1 muestra algunos ejemplos de esquemas QIM desarrollados para diferentes especies de pescado.

**Tabla 4.1.** QIM desarrollados para diferentes especies de pescado.

Espece de pescado	Referencia
Arenque	Jonsdottir , 1992
Boquerón	Nielsen y col., 1992
Bacalao	Larsen y col., 1992
Bacalao (congelado)	Warm y col., 1998
Dorada	Huidobro y col., 2000
Lubina	Alasalvar y col., 2002
Salmón	Sveinsdottir y col., 2002
Merluza	Baixas-Nogueras y col., 2003

#### 4.2.2. Pescado cocido

El análisis sensorial del pescado cocido, puede ofrecer información de algunos atributos como el olor o el flavor, que juegan un papel importante en la frescura y pueden ser modificados e incluso perdidos durante la cocción. De hecho, este análisis es el que mejor se correlaciona con el criterio de calidad del consumidor.

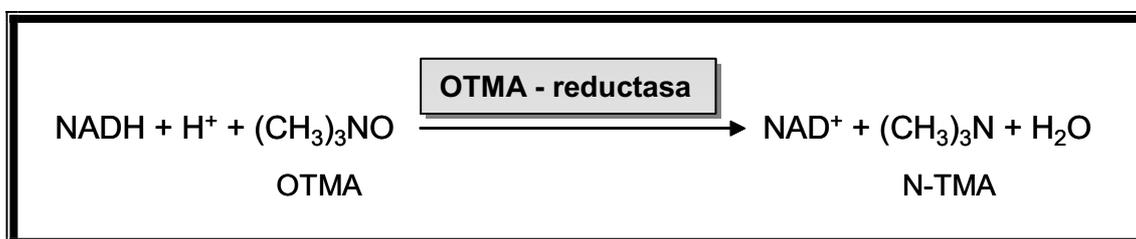
Los métodos más comúnmente utilizados para la evaluación del pescado cocido son los esquemas de la Torry (Torry Research Station, 1989; Regenstein and Regenstein, 1991). Estos esquemas utilizan una escala que va del 10 (pescado fresco) al 3 (pescado deteriorado). El olor y el sabor, siguen

unas pautas definidas según se altera el pescado, aunque existen diferencias entre las especies, al menos durante las etapas iniciales del deterioro (Ranken, 1993).

## 5. AMINAS VOLÁTILES

### 5.1. TRIMETILAMINA

La trimetilamina (expresado como nitrógeno de trimetilamina, N-TMA) es un compuesto básico volátil que no se encuentra en el pescado vivo. En pescado fresco, se encuentra en cantidades muy pequeñas y se va acumulando durante el deterioro como resultado, principalmente, de la reducción bacteriana del óxido de trimetilamina (OTMA), mediante el enzima OTMA - reductasa (Figura 5.1). Esto significa que el análisis del N-TMA no da ninguna información acerca de los primeros cambios autolíticos o del grado de frescura, pero sí acerca de los cambios posteriores o del grado de deterioro, cuando el pescado alcanza un cierto grado de colonización bacteriana (Huss, 1995). Soudan (1965) señaló que pHs entre 7,2 – 7,4 son los óptimos para la reducción del OTMA.



*Figura 5.1. Reducción de la OTMA por la OTMA-reductasa.*

El OTMA forma parte de la fracción nitrogenada no proteica. Se han propuesto diferentes hipótesis respecto a la función del OTMA, pero la más ampliamente aceptada es la que atribuye a dicho compuesto un papel importante en los procesos de osmoregulación (Stenberg y col., 1984). Ello explica que presente contenidos mucho mayores en las especies de agua salada que en las de agua dulce.

Como se ha comentado en capítulos anteriores, el músculo de un pescado recién capturado es generalmente estéril, pero existe flora contaminante en piel, agallas e intestino, según el ambiente en que hayan vivido los peces y su alimentación. Tras la captura y durante el almacenamiento, los

microorganismos presentes en el pescado y los enzimas que secretan, invaden el músculo y reaccionan con la mezcla de sustancias presentes, provocando cambios en los compuestos odoríferos y de sabor. Al principio se forman compuestos con notas ácidas, grasas y frutales. Más tarde aparecen los amargos y sulfurosos y por último, en la putrefacción, son característicos los amoniacales y fecales. El OTMA y su derivado N-TMA, juntamente con las sustancias grasas del pescado, dan lugar al conocido “olor a pescado” que es un indicador del deterioro bacteriano del mismo (Krzymien y Elías, 1990). Debido a que dicho olor provoca el rechazo del pescado por parte del consumidor, existen diversos trabajos donde se estudia la correlación entre el N-TMA y el rechazo orgánoléptico (Fernández-Salguero y Mackie, 1987; Civera y col., 1993; Civera y col., 1995).

La flora contaminante habitual del pescado pertenece a varios géneros, sobre todo psicrófilos: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Alteromonas*, *Moraxella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Serratia*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Vibrio*, *Clostridium*, mohos y levaduras (Shewan, 1961, Pascual-Anderson, 2000). Las bacterias entran en fase exponencial de crecimiento casi inmediatamente después de la muerte del pez. Esto también ocurre cuando el pescado es colocado en hielo, probablemente porque la microflora se encuentra adaptada a las bajas temperaturas. No todos los géneros de microorganismos presentes en el pescado son responsables de los olores y sabores desagradables asociados con el deterioro, pero sí la presencia de Microorganismos Específicos del Deterioro (MED) productores de H<sub>2</sub>S y reductores de OTMA. Durante el almacenamiento en frío, el porcentaje de las MED normalmente aumenta. A menudo estas bacterias tienen un tiempo de reproducción corto a temperaturas de enfriamiento, y el OTMA de la carne del pescado actúa como un estimulante selectivo de crecimiento (Huss, 1995).

*Shewanella putrefaciens* ha sido identificada como la MED del pescado de aguas templadas almacenado aeróbicamente en hielo (Gram y col., 1987). Si el producto se empaqueta al vacío, en presencia de CO<sub>2</sub>, es *Photobacterium phosphoreum* el responsable del deterioro (Dalgaard y col., 1997). Ciertas *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Alteromonas* y *Aeromonas spp.* también han sido identificadas como MED (Shewan, 1977; Gram y col., 1987).

La multiplicación de la flora bacteriana inicial, se inicia en condiciones aerobias. Los microorganismos colonizadores del pescado utilizan los hidratos de carbono y el lactato como sustratos dadores de energía y el oxígeno como agente oxidante. Ringø y col. (1984) demostraron que la cisteína se utiliza

como sustrato en el ciclo de Krebs cuando los electrones son transferidos al OTMA, de este modo la formación de H<sub>2</sub>S y N-TMA son, hasta cierto punto, reacciones vinculadas.

Contrariamente al deterioro en hielo por *S. putrefaciens* y al deterioro a temperatura ambiente por *Vibrionaceae* dominados por la producción de H<sub>2</sub>S y N-TMA, el deterioro causado por *Pseudomonas spp.* está caracterizado por la ausencia de estos compuestos (Gram y col., 1990). Aunque *Pseudomonas spp.* produce compuestos volátiles como aldehídos y cetonas, se desconoce, el compuesto responsable de los olores desagradables originados por estas bacterias. La tabla 5.1 muestra los compuestos típicos del deterioro producidos por algunos MED durante el almacenamiento de pescado.

**Tabla 5.1.** Compuestos típicos del deterioro producidos durante el almacenamiento aeróbico del pescado tanto a temperatura ambiente como en hielo.

Microorganismos Específicos del Deterioro	Compuestos típicos del deterioro
<i>Shewanella putrefaciens</i>	N-TMA, H <sub>2</sub> S, CH <sub>3</sub> SH, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S, Hipoxantina
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	N-TMA, Hipoxantina
<i>Pseudomonas spp.</i>	Cetonas, aldehídos, ésteres, sulfuros no- H <sub>2</sub> S
<i>Vibrionaceae</i>	N-TMA, H <sub>2</sub> S
<i>Anaerobios deteriorantes</i>	NH <sub>3</sub> , ácidos: acético, butírico y propiónico

Además de la actividad OTMA-reductasa ligada a los enzimas bacterianos, se ha detectado esta actividad en cantidades muy bajas en enzimas del propio pescado localizadas en el sistema digestivo y en tejido renal. Esto podría adquirir cierta importancia en el almacenamiento de productos a baja temperatura, cuando el crecimiento bacteriano se encuentra inhibido.

Existe una tercera vía de formación del N-TMA a partir de la descomposición térmica del OTMA, sin que en este caso intervenga ningún enzima ni bacteriano ni del propio pescado. Se puede dar en la elaboración de derivados de pescado que conllevan tratamientos térmicos más o menos intensos. Se ha descrito el aumento de N-TMA en la elaboración de conservas de atún (Gallardo y col., 1984) y cuando se aplican temperaturas inferiores a los 100 °C, como en el caso del pescado ahumado (Beltrán, 1990).

### **5.1.1. Niveles de N-TMA en pescado y su interés como índice higiénico - sanitario**

El contenido de N-TMA a lo largo del deterioro, presenta gran variabilidad entre las diferentes especies marinas principalmente por las diferencias en el contenido inicial de OTMA que presentan en su músculo (Rodríguez y col., 1997). En general, los contenidos mayores se encuentran en pescados elasmobranquios y los menores en peces planos y pelágicos. Según Tokunaga (1970), los peces pelágicos tienen su mayor concentración de OTMA en el músculo oscuro mientras que los demersales, peces de carne blanca, tienen el contenido más alto en el músculo blanco.

El contenido de N-TMA también muestra diferencias dentro de una misma especie según el modo de conservación y almacenamiento. Así pues, durante el almacenamiento aerobio se forman cantidades mayores de N-TMA que por ejemplo en el envasado al vacío o el almacenamiento en agua de mar refrigerada (Huss, 1995). Otras técnicas más recientes para alargar la vida útil del producto pesquero desde un punto de vista microbiológico, como son el envasado en atmósferas modificadas, la irradiación y las altas presiones, disminuyen la formación de este compuesto y retardan el rechazo del producto por parte del consumidor (Alur y col., 1991; Dalgaard y col., 1993; Pastoriza y col., 1996; Hurtado y col., 2000). La tabla 5.2 muestra algunos ejemplos de los contenidos de N-TMA para pescados y derivados descritos en la bibliografía.

Tras un período de latencia, los niveles de N-TMA aumentan siguiendo el perfil de una curva exponencial (Veciana-Nogués y col., 1997), lo que concuerda con el comportamiento del crecimiento bacteriano. Este hecho ha llevado a algunos autores a establecer correlaciones entre los niveles de N-TMA y el recuento total de microorganismos (Wong y Gill, 1987; Wong y col., 1988; Pastoriza y col., 1996) y a proponer la determinación del N-TMA como método objetivo para evaluar la calidad higiénico - sanitaria del pescado de aguas saladas (Dyer, 1959; Castell y col., 1973).

Tradicionalmente, el pescado con niveles inferiores a 1 mg N-TMA/100 g se ha considerado de excelente calidad (Castell y col., 1958), mientras que el límite de aceptabilidad para el consumo humano se encuentra, para la mayoría de especies, entre 10-15 mg N-TMA/100 g en pescado almacenado aeróbicamente (Connell, 1995). Debe señalarse que estos valores son sólo aplicables a pescado conservado en hielo, ya que durante el almacenamiento a elevadas temperaturas se forman cantidades mayores (Ababouch y col., 1996; Baixas-Nogueras y col., 2001).

**Tabla 5.2.** Contenidos de N-TMA descritos en la bibliografía para diferentes especies de pescado.

Referencia	Niveles de N-TMA (mg/100g)	Especie de Pescado
Mackie y Thompson, 1974	nd <sup>a</sup> - 5	Bacalao <sup>b</sup>
Gallardo y col., 1984	0,67 - 0,91	Bonito fresco <sup>b</sup>
	2,21 - 2,95	Bonito cocido <sup>b</sup>
	2,09 - 3,56	Bonito en conserva
Teskeredzic y Pfeifer, 1987	1,00 - 1,53	Trucha arco iris <sup>b</sup>
Civera y col., 1995	0,25 - 1,90	Dorada <sup>b</sup>
Ababouch y col., 1996	nd - 15,00	Sardina <sup>c</sup>
Rodríguez y col., 1997a	2,39 - 8,03	Sardina enlatada
	7,72 - 7,92	Caballa enlatada
	1,99 - 2,03	Atún enlatado
Rodríguez y col., 1997b	2,40 - 12,00	Sardina <sup>b</sup>
Veciana-Nogués y col., 1997	nd - 6	Atún <sup>b</sup>
Rey-Mansilla y col., 1999	0,10 - 7,30	Pescadilla <sup>b</sup>
Koutsoumanis y Nychas, 1999	nd <sup>a</sup>	Boga <sup>b</sup>
Mendes y col., 1999	8,00 - 30,00	Sardina en sal
Pacheco-Aguilar y col., 2000	0,33 - 1,62	Sardina <sup>b</sup>
Baixas-Nogueras y col., 2001	nd - 40	Merluza <sup>b</sup>
Shakila y col., 2003	4,50 - 45,00	Caballa <sup>c</sup>
	1,00 - 30,00	Emperador <sup>c</sup>
Góköglü y col., 2004	0,33 - 1,67	Sardina marinada

<sup>a</sup>nd: no detectado

<sup>b</sup> pescado almacenado a 0 °C

<sup>c</sup> pescado almacenado a temperatura ambiente

Sin embargo, tal como se ha mencionado anteriormente, la utilización del N-TMA como índice higiénico-sanitario presenta limitaciones ya que no aporta información sobre los cambios autolíticos que suceden en el pescado en la etapa previa a la colonización bacteriana (Ryder y col., 1993). Además, presenta gran variabilidad entre las diferentes especies marinas (Rodríguez y col., 1997). Así pues, será necesario establecer límites distintos en función de la especie de pescado. De este modo, Sikorsky y col. (1990) señalaron que algunos pescados no alcanzan los 5 mg N-TMA/100g durante el

almacenamiento, probablemente, tal y como indicó Huss (1995) por el bajo contenido en O-TMA como es el caso del pescado pelágico.

Gallardo y col. (1984), teniendo en cuenta que se forma N-TMA a causa de los tratamientos térmicos, proponen establecer un límite superior a los anteriormente citados para evaluar, en el producto acabado, la calidad de las materias primas empleadas en la elaboración de las conservas de atún.

### **5.1.2. Métodos analíticos para la determinación del N-TMA**

La mayoría de los métodos analíticos propuestos para el análisis del N-TMA, se inician con una etapa de desproteización que implica una homogeneización en ácido perclórico o tricloroacético. La volatilización de las aminos presentes en las muestras requiere que éstas sean neutralizadas a pH 7 inmediatamente antes del análisis. Cuando deban ser almacenadas por extensos períodos de tiempo antes del análisis deben permanecer en su forma ácida dentro de contenedores sellados (Huss, 1995).

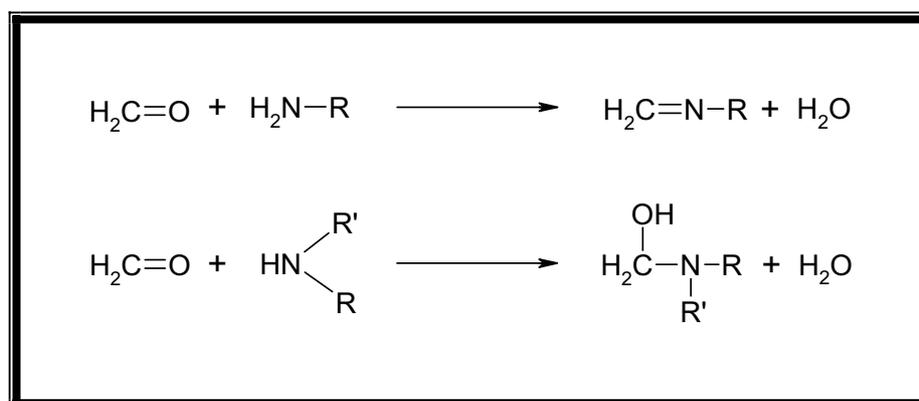
Existen muchos métodos y modificaciones de los mismos para la estimación del N-TMA. Entre ellos destacan los de microdifusión, colorimétricos, por electrodos específicos, enzimáticos, cromatográficos y por inyección de flujo.

#### **5.1.2.1. Métodos por Microdifusión y Destilación**

El primer método aplicado a la determinación del N-TMA fue el de microdifusión de Conway (Conway y Byrne, 1933), que posteriormente fue modificado por Beatty y Gibbons (1937).

Se basa en la adición de, primero, formaldehído y posteriormente álcali al jugo de pescado. La función del formaldehído es reaccionar con las aminos primarias y secundarias dando lugar a compuestos no volátiles (Figura 5.2), intentando así, eliminar su interferencia. Aunque es un método simple, no costoso, bastante exacto y reproducible, los autores señalan algunas desventajas como la necesidad de una limpieza cuidadosa de los aparatos y de exactitud en la valoración como factores esenciales. De hecho, el método de Conway se utiliza para la determinación del nitrógeno básico volátil total y sólo sería aplicable al N-TMA asumiendo que la mayoría de la fracción volátil

corresponde a este compuesto (Pérez-Villarreal y Howgate, 1987), supuesto que no siempre es asumible.



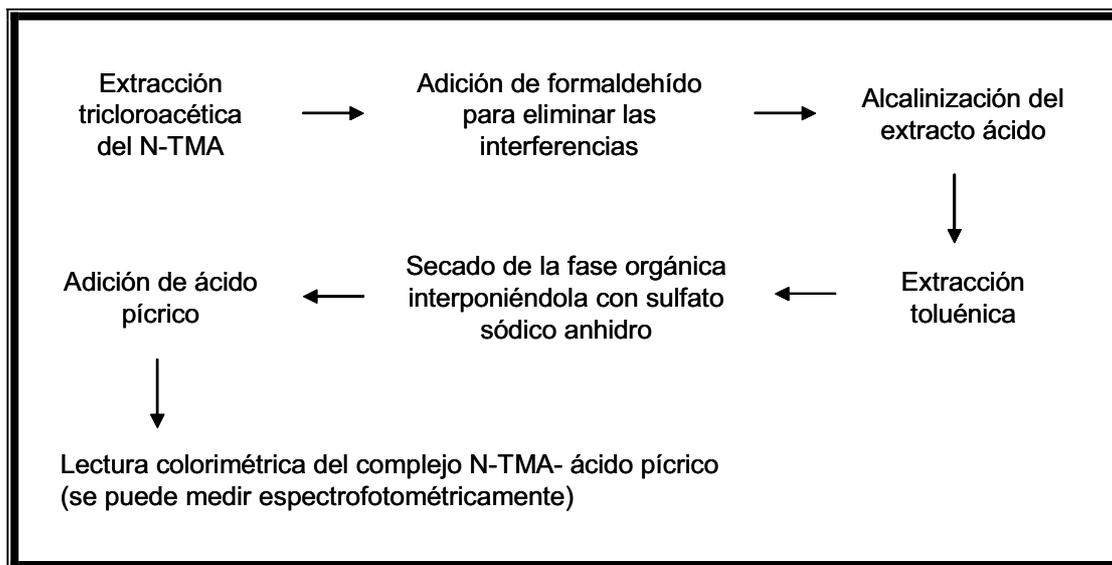
**Figura 5.2.** Bloqueo de aminas primarias y secundarias mediante la adición de formaldehído (Malle y Tao, 1989).

A partir del método de Beatty y Gibson, Malle y Tao (1983) proponen una modificación, en la que la separación del N-TMA y su posterior recogida sobre ácido para la valoración final se realiza mediante una destilación (y no una difusión). Aunque no presenta ventajas en cuanto a la especificidad, resulta un método más rápido.

### 5.1.2.2. Métodos Colorimétricos

El método de Dyer (1945) y sus modificaciones son probablemente las técnicas más utilizadas para la determinación del N-TMA en pescados. La figura 5.3 muestra de forma esquemática las fases del método oficial de la AOAC (1990) para la determinación del N-TMA en pescados y derivados. Dicho método se fundamenta en el anteriormente citado de Dyer.

Se han buscado modificaciones sobre el método original de Dyer, con el fin de mejorar su especificidad. Así, Tozawa y col. (1971) cambiaron el agente alcalinizante, sustituyendo el carbonato potásico por hidróxido potásico, de modo que se minimizaba la interferencia de la dimetilamina, aunque no se eliminaba en su totalidad.



**Figura 5.3.** Etapas para la determinación del N-TMA en pescados y derivados, según el método oficial de la AOAC.

#### 5.1.2.3. Métodos por Electrodoes específicos para N-TMA

Chang y Chang describieron el uso de un electrodo específico para el  $\text{NH}_3$ , modificado para la determinación de N-TMA. Según, Lundstrom y Racicot (1983), el inconveniente de este electrodo es que no está exento de las interferencias del amoníaco, la dimetilamina y otras aminas. Sin embargo, en el 2000, Ellis y col. demostraron, en un estudio en el que colaboraron 9 laboratorios, que el uso de un electrodo específico para el  $\text{NH}_3$  en la determinación de bases volátiles presenta una gran precisión entre distintas especies de pescados con distintos niveles de analito.

#### 5.1.2.4. Métodos Enzimáticos

Wong y Gill (1987) proponen un método rápido y de fácil aplicabilidad para el análisis rutinario del N-TMA del pescado fuera del laboratorio. Es una técnica de carácter enzimático que resulta más específica que los métodos citados anteriormente. Sin embargo, este método sólo es aplicable con fines semicuantitativos.

#### **5.1.2.5. Métodos cromatográficos**

Los métodos cromatográficos intentan solventar tanto el problema de las interferencias (permiten la separación del N-TMA de otros compuestos semejantes) como el de la sensibilidad, siendo posible la cuantificación de N-TMA a niveles muy bajos. Aunque se han descrito métodos de Cromatografía de Alta Eficacia (Gill y Thompson, 1984; Malle y Valle, 1996), está más extendida la Cromatografía de Gases (Veciana-Nogués y col., 1996; Baixas-Nogueras y col., 2001).

La alta volatilidad de las aminas alifáticas de cadena corta (N-TMA, dimetilamina y monometilamina básicamente) hace que en su separación sea menos crítica la aplicación de una determinada temperatura y que tenga, sin embargo, gran importancia la retención de estos compuestos por parte de la columna. Es por ello que se suelen utilizar las columnas de relleno, las cuales permiten una buena separación sobre todo por su retención en la columna debida a fenómenos de adsorción. Estas columnas llevan un soporte de sílice, más o menos modificado para evitar una retención demasiado fuerte de los compuestos amínicos y la consiguiente formación de colas.

#### **5.1.2.6. Análisis por Inyección de Flujo (FIA)**

Los métodos de FIA, descritos por primera vez por Ruzicka y Hansen en 1975, se han desarrollado en los últimos años, mostrando niveles muy aceptables de reproducibilidad y repetibilidad (Sadok y col., 1996; Ruíz-Capillas y col., 2000; Baixas-Nogueras y col., 2001). Su objetivo inicial era mejorar la dispersión de la muestra, así como promover la mezcla entre la muestra y los reactivos.

Las ventajas que presentan son:

- Velocidades rápidas de análisis, pudiendo ser analizadas entre 100 y 300 muestras/hora
- Mejores tiempos de respuesta, siendo normalmente menos de 1 minuto el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la respuesta del detector
- Tiempos de puesta en marcha y de parada más rápidos que otros métodos anteriormente citados

Por lo general, una bomba peristáltica empuja las soluciones que están contenidas en el interior de un tubo de plástico. El flujo es continuo y libre de

pulsaciones. El caudal se controla mediante la velocidad del motor y el diámetro interno del tubo. Los inyectores y detectores en el FIA son similares, en cuanto al tipo y a los requisitos de funcionamiento, a los utilizados en Cromatografía Líquida de Alta Eficacia. El tamaño de muestra más comúnmente utilizado se encuentra entre 10 – 30  $\mu$ l.

El FIA es una técnica sencilla, de bajo coste y rápida que, según Meyer y Oehlenschlaeger (1996), ofrece las mismas ventajas que el análisis sensorial. León y col. (1994) usaron el FIA para automatizar el método 974.14 de la AOAC para la determinación de N-TMA en pescado, logrando reducir considerablemente el volumen de la muestra y el tiempo de análisis.

## **5.2. NITRÓGENO BÁSICO VOLÁTIL TOTAL**

La determinación de bases volátiles fue una de las primeras pruebas químicas aplicadas a la evaluación del pescado y durante mucho tiempo se ha considerado representativa del grado de alteración de los productos del mar (Hollingworth y col., 1990; Huidobro y Tejada, 1990).

Con el término general de nitrógeno básico volátil total (N-BVT) se incluye la medición de N-TMA (producida por el deterioro bacteriano), dimetilamina (producida por enzimas autolíticas durante el almacenamiento en congelación), amoníaco (producido por desaminación de aminoácidos y catabolitos de nucleótidos) y otros compuestos nitrogenados básicos volátiles asociados con el deterioro de los productos pesqueros (Huss, 1995). Su determinación expresa cuantitativamente el contenido de bases volátiles de bajo peso molecular.

### **5.2.1. Niveles de N-BVT en pescado y su interés como índice higiénico - sanitario**

Se han sugerido diversas cifras de N-BVT relacionadas con la calidad del pescado. Así Billon y col. (1979) clasificaron el pescado estableciendo tres categorías:

- **Clase I**, N-BVT < 30 mg/100 g

- **Clase II**, 30 mg/100 g < N-BVT < 40 mg/100 g
- **Clase III**, N-BVT > 40 mg/100 g. Un pescado que presentase estas cantidades, no sería apto para el consumo humano

El Centro de Inspección y Comercio Exterior sugirió en 1986 unas cifras para el rechazo del pescado, en función de sus niveles de N-BVT, que varían según el tipo de proceso aplicado al pescado:

- **Pescado fresco:**
  - *Escualos*: 50 – 70 mg/100 g
  - *Resto de las especies*: 23 – 30 mg/100 g
- **Ahumados y salazones:** Hasta 80 mg/100 g
- **Conservas:**
  - *Buena calidad*: 40 –50 mg/100 g
  - *Corrientes*: 50 – 60 mg/100 g
  - *Mediocres*: 60 – 70 mg/100 g
- **Crustáceos:**
  - *Buena calidad*: < 30 mg/100 g
  - *Corrientes*: 30 – 40 mg/100 g
  - *Mediocres*: 40 – 60 mg/100 g

Posteriormente, en 1995, la Unión Europea estableció un límite máximo tolerable de 30 – 35 mg N-BVT/ 100 g para algunas especies de las familias *Merlucciidae*, *Gadidae* y el *Salmo salar*, por encima del cual se considera que el pescado no es apto para el consumo humano (CEE/149/95).

El hecho de que con el N-BVT se determine más de una sustancia, puede hacer creer que tiene gran validez como índice indicativo de descomposición. Sin embargo, a pesar de que su análisis es relativamente sencillo de realizar, debido a que algunos de sus compuestos se originan en estados muy avanzados del proceso degradativo (Burgess y col., 1979), algunos autores ponen en duda su validez como índice de frescura y lo proponen como medida o índice de deterioro. De hecho no existe una correlación proporcional entre el

contenido de N-BVT y el tiempo de almacenamiento, ya que se mantiene más o menos constante durante los primeros días de almacenamiento, aumentando notablemente su concentración cuando el producto ya está en el límite de aceptabilidad organoléptica (Pastoriza y col., 1998; Anastasio y col., 1999).

Una de las limitaciones del uso del N-BVT como índice de frescura o deterioro, es el hecho de que presenta niveles variables en función de la especie, estación del año, hábitat, procesado... por lo que se tendrían que establecer los niveles de aceptabilidad individualizados para las diferentes familias o especies marinas. Ejemplos de dichas variaciones, se pueden observar en la tabla 5.3.

**Tabla 5.3.** Contenidos de N-BVT descritos en la bibliografía para diferentes especies de pescado.

Referencia	Niveles de N-BVT (mg/100g)	Especie de Pescado
Huss y Larsen, 1979	12,00 - 70,00	Arenque envasado al vacío
Gallardo y col., 1984	23,39 - 27,30	Bonito fresco <sup>a</sup>
	30,24 - 32,21	Bonito cocido <sup>a</sup>
	40,15 - 47,93	Bonito en conserva
Civera y col., 1995	18,50 - 30,00	Dorada <sup>a</sup>
Sotelo y col., 1995	18,50 - 57,00	Merluza <sup>a</sup>
Ababouch y col., 1996	10,00 - 55,00	Sardina <sup>a</sup>
	15,00 - 100,00	Sardina <sup>b</sup>
Rodríguez y col., 1997a	49,09 - 51,44	Sardina enlatada
	56,89 - 57,65	Caballa enlatada
	42,82 - 44,26	Atún enlatado
Rodríguez y col., 1997b	25,00 - 50,00	Sardina <sup>a</sup>
Hernández-Herrero y col., 1999b	24,05 - 35,64	Anchoa en sal
Sakila y col., 2003	9,00 - 55,00	Caballa <sup>b</sup>
	5,00 - 102,00	Emperador <sup>b</sup>
Góköglü y col., 2004	9,28 - 28,90	Sardina marinada

<sup>a</sup> pescado almacenado a 0 °C

<sup>b</sup> pescado almacenado a temperatura ambiente

## **5.2.2. Métodos analíticos para la determinación del N-BVT**

Para la determinación del N-BVT, tradicionalmente se han utilizado métodos basados en la microdifusión o en la destilación. Más recientemente, se han propuesto otros métodos basados en el análisis por inyección de flujo.

### **5.2.2.1. Métodos por Microdifusión**

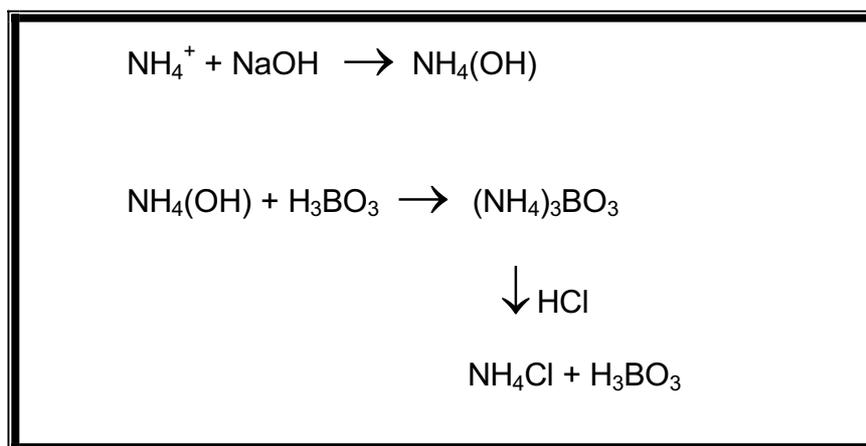
Los métodos de microdifusión se fundamentan en el método descrito por Conway en 1962. Consiste en la adición de carbonato potásico a un extracto de jugo de pescado desproteinizado, situado en uno de los compartimentos de la célula de Conway. Con ello se liberará el N-BVT, que será recogido sobre una disolución de ácido bórico que se encuentra en el compartimento continuo de la célula.

La microdifusión presenta la ventaja de poder trabajar a temperaturas relativamente bajas, con lo que se minimiza cualquier posible efecto de hidrólisis de proteínas y la subsiguiente liberación de amoníaco. El inconveniente de este método radica en su larga duración, ya que son necesarias al menos 12 horas para que se produzca totalmente la difusión. Por ello no es una técnica útil en análisis rutinarios (Gallardo y col., 1979).

### **5.2.2.2. Métodos por Destilación**

Los métodos por destilación son los más ampliamente utilizados. Se basan en la destilación de los componentes básicos en medio alcalino, para que de este modo queden retenidos los aldehídos, las cetonas y/o los alcoholes de carácter volátil. El destilado se recoge sobre agua o sobre un ácido y se determina el contenido de N-BVT mediante una volumetría.

La unión Europea, propuso en 1995 un método de Destilación por corriente de vapor de agua para la determinación del N-BVT (CEE/149/95). La figura 5.4 esquematiza las diferentes etapas del proceso. Aunque la determinación del N-BVT del extracto del pescado es más rápida que en el caso de los métodos por microdifusión, todavía presenta el inconveniente de la necesidad de un instrumental específico que implica su realización en un laboratorio.



**Figura 5.4.** Etapas para la determinación del N-BVT en pescados, según el método propuesto por la Unión Europea (CEE/149/95).

### 5.2.2.3. Métodos de Análisis por Inyección de Flujo (FIA)

De acuerdo con la creciente necesidad de trasladar las determinaciones de frescura a lugares como la lonja, el mercado o los puertos, se han desarrollado métodos alternativos a los de microdifusión o destilación. Así en 1987, Wekell y col. describieron un método por FIA para el análisis del N-BVT. Este método, ha sufrido numerosas modificaciones y adaptaciones. Así, Hollingworth y col. (1994) lo adaptaron para la determinación del N-BVT del halibut, Ruíz-Capillas y col. (2000) para el rape, la raya y el bacalao y Baixas-Nogueras y col. (2001b) para la merluza.

Las ventajas de los métodos por FIA son su rapidez, simplicidad y bajo coste. Además ya existe un prototipo de equipo FIA elaborado por los participantes islandeses del proyecto europeo en el que se enmarca esta tesis doctoral, que permite la determinación del N-BVT, así como la de N-TMA, *in situ* una vez obtenido el extracto ácido de la muestra (Figura 5.5).



**Figura 5.5.** Prototipo islandés de FIA para el análisis de muestras in situ.



## 6. AMINAS BIÓGENAS

Las aminas biógenas son compuestos orgánicos nitrogenados de carácter básico y de bajo peso molecular, presentes en animales, plantas y microorganismos como consecuencia de procesos metabólicos (Brink y col., 1990; Halász y col. 1994). Bajo la definición de aminas biógenas se agrupan diversos compuestos que tienen en común su origen biótico y la presencia de, al menos, un grupo amino.

La figura 6.1 muestra la estructura química de las principales aminas biógenas.

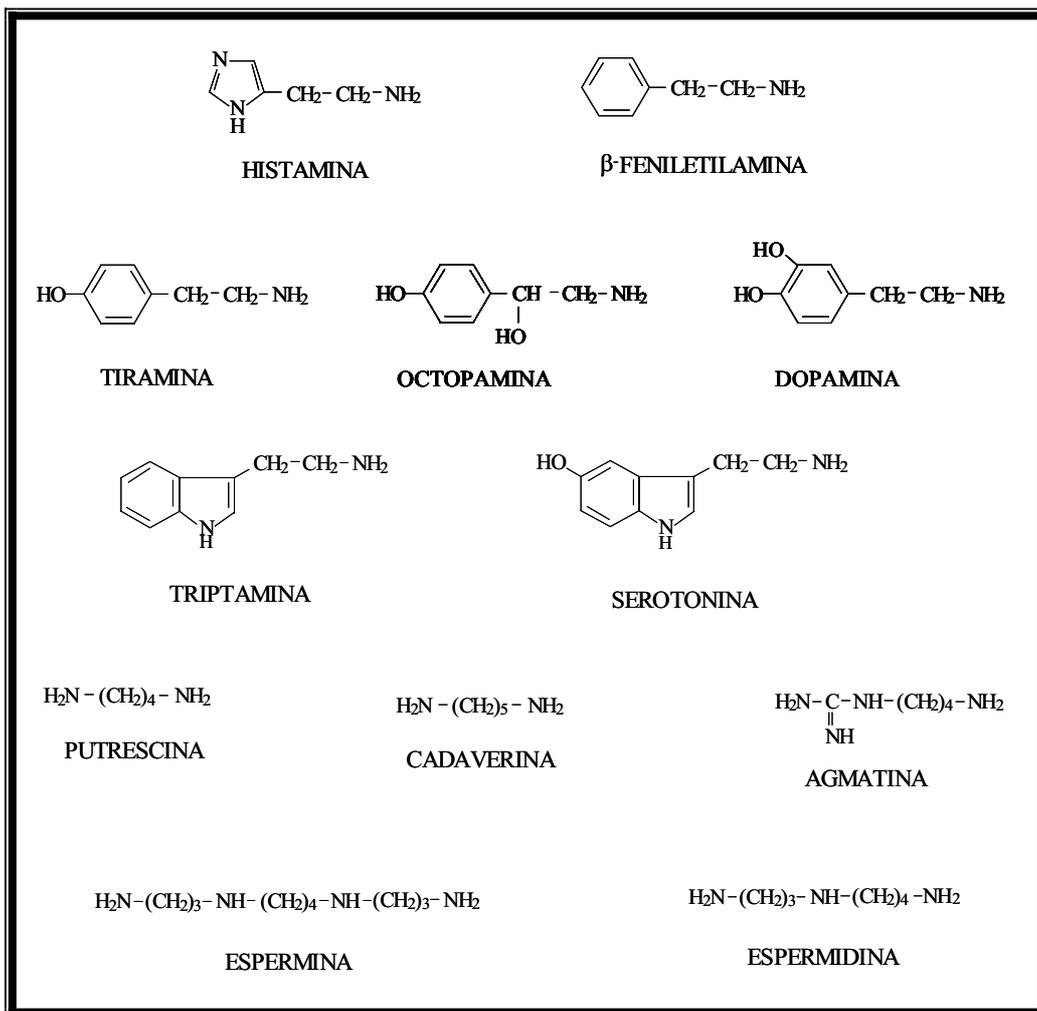


Figura 6.1. Estructura química de las aminas biógenas.

Mariné-Font y col. (1995a) clasificaron las aminas biógenas que más frecuentemente se encuentran en los alimentos, en base a su estructura química. Establecieron tres grandes grupos:

- **Aminas aromáticas:** histamina,  $\beta$ -feniletilamina, tiramina, octopamina, dopamina, serotonina y triptamina
- **Diaminas alifáticas:** putrescina y cadaverina
- **Poliaminas alifáticas:** agmatina, espermina y espermidina

### 6.1. ORIGEN Y FORMACIÓN

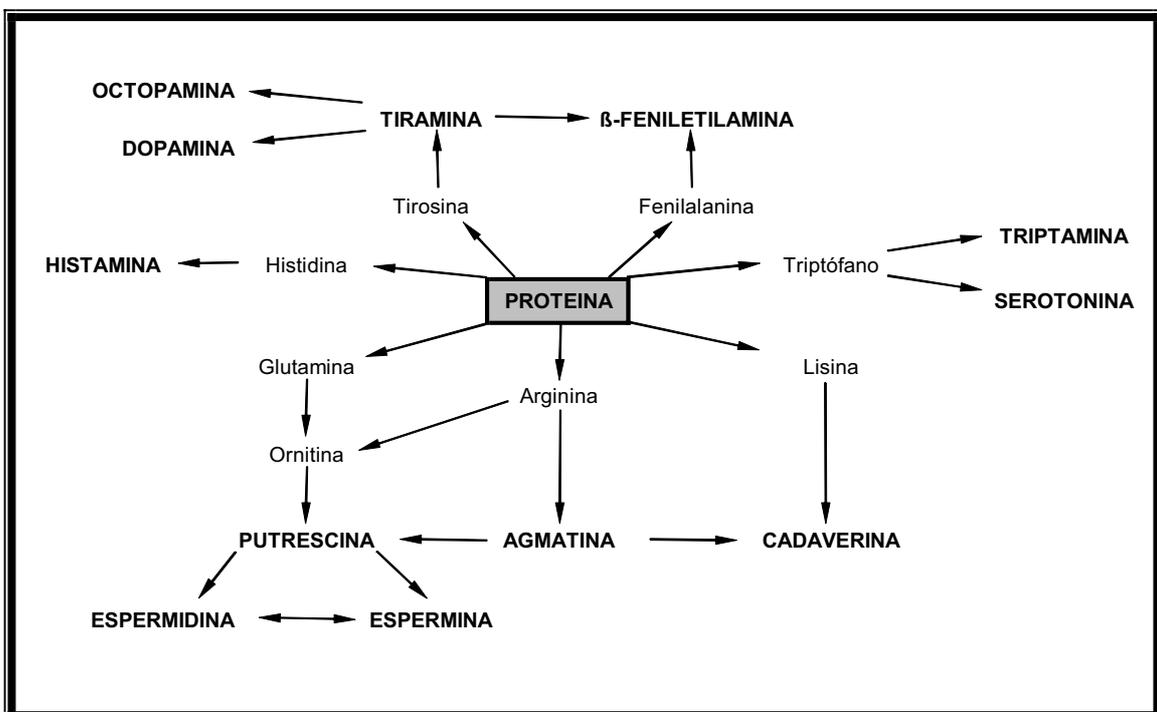
Las aminas biógenas se pueden encontrar en una amplia gama de alimentos, tanto de origen animal como vegetal. Debido a ello, inicialmente se consideró que todas las aminas biógenas eran componentes naturales de éstos. Al estar presentes en medios biológicos muy diversos, es difícil establecer un mecanismo de formación común para todas ellas.

Bárdócz (1995) distingue claramente entre dos grupos de aminas, en función de si su origen es biogénico o natural (fisiológico):

- **Aminas biógenas**, se forman por la descarboxilación microbiana de los aminoácidos precursores. Dentro de este grupo se encuentran las aminas aromáticas tiramina,  $\beta$ -feniletilamina, histamina y triptamina, resultantes de la descarboxilación de la tirosina, fenilalanina, histidina y triptófano respectivamente. Los enzimas responsables de la biosíntesis de estas aminas son de origen microbiano y, en general, específicos para cada aminoácido. No obstante, como consecuencia de la similitud estructural del substrato, en determinadas condiciones los enzimas descarboxiladores podrían actuar sobre aminoácidos diferentes. Éste es el caso de los enzimas responsables de la descarboxilación de la tirosina, que parece que pueden actuar también, aunque de manera más débil, sobre la fenilalanina (Joosten, 1987).
- **Aminas naturales**, de origen fisiológico. Se forman como consecuencia de los procesos metabólicos celulares normales de los seres vivos. Por tanto, su presencia en los alimentos sería de origen endógeno. Dentro de este grupo se incluyen las diaminas putrescina y cadaverina y las poliaminas espermina, espermidina y agmatina. Algunas de estas

aminas, como la putrescina, la cadaverina y la agmatina, también se pueden formar como consecuencia de la actividad descarboxiladora de los microorganismos (Bardócz, 1995; Bardócz, 1999). Por ello, puede resultar difícil en algunos casos, la interpretación del significado de sus contenidos en los alimentos.

La figura 6.2 esquematiza las rutas biosintéticas de las aminas biógenas. Aunque la síntesis de las aminas naturales sigue rutas bastante más complejas que las de las aminas biógenas, las primeras etapas también incluyen reacciones de descarboxilación aminoacídica.



**Figura 6.2.** Formación de las aminas biógenas a partir de los aminoácidos precursores.

Para la biosíntesis de las poliaminas son necesarios dos precursores primarios: la ornitina y la metionina. El primero es un aminoácido que no se encuentra de forma natural en las proteínas sino que es un producto del metabolismo de otros aminoácidos como la arginina o la glutamina (Brink y col., 1990). Mediante la acción del enzima ornitina-descarboxilasa se forma la putrescina, que es un primer intermediario de la cadena biosintética de las poliaminas y, a su vez, puede actuar como el substrato limitante. La metionina constituye el

segundo precursor. Éste debe ser convertido en S-adenosil-L-metionina, el cual por descarboxilación proporciona grupos propilamino que se adicionan de manera consecutiva a la putrescina (mediante la acción de los enzimas espermina y espermidina sintetas) para la síntesis de la espermina y la espermidina. Estas poliaminas pueden además retroconvertirse gracias a enzimas acetiltransferasas. En plantas y microorganismos existe una ruta alternativa para la síntesis de putrescina a partir de la agmatina, producto de la descarboxilación de la arginina (Smith, 1980).

La cadaverina se sintetiza por acción de la lisina-descarboxilasa sobre la lisina. Pero este aminoácido precursor también puede ser descarboxilado por la ornitina-descarboxilasa si la concentración de ornitina en el medio es alta y la de lisina baja (Bardócz, 1995).

En general, en los alimentos proteicos como el pescado, o con un cierto contenido de aminoácidos, y que se hayan expuesto a condiciones que permitan el desarrollo y la actividad microbiana, puede esperarse la formación de aminas biógenas que se han de sumar a las que ya estén presentes fisiológicamente en el alimento de forma natural. No obstante, diversos estudios sobre aminas biógenas en los alimentos demuestran que no existe realmente un origen común para todas ellas, ni factores o normas constantes que determinen su aparición. El contenido final de las distintas aminas dependerá de múltiples variables entre las que se incluyen la naturaleza del producto, los microorganismos que se desarrollen en él y las condiciones a las que se ha sometido el alimento.

Es posible establecer una clasificación de los alimentos en función del significado que se le pueda atribuir a los contenidos de aminas biógenas (Mariné-Font y col., 1995a):

- **Alimentos fermentados y/o madurados en los que para su elaboración se requiere la acción de ciertos microorganismos.** En este grupo se incluyen los productos lácteos fermentados (quesos), las bebidas alcohólicas fermentadas (vinos, cervezas...), los productos cárnicos crudos-curados (embutidos) y otros alimentos como las anchoas. La formación de aminas biógenas en estos productos puede asociarse a una acción microbiana deseada (fermentativa). Pero, también cabe la posibilidad que estos productos sufran algún tipo de contaminación durante su elaboración o almacenamiento, que provoque una producción añadida de aminas biógenas, alcanzándose

unos niveles superiores a los esperados en un proceso realizado en condiciones óptimas desde el punto de vista higiénico.

- **Alimentos que por sus características propias de composición presentan una relativa facilidad para sufrir procesos de descomposición y/o deterioro.** A este grupo pertenecen el pescado y la carne. La acumulación de aminas biógenas se debería a la acción aminoácido descarboxilasa de los microorganismos relacionados con el proceso de deterioro.
  
- **Alimentos que contienen ciertas cantidades de aminas biógenas preformadas.** Dentro de este grupo encontramos alimentos en cuya composición intervienen vísceras o sangre, y algunos productos vegetales como el plátano, la piña, el tomate, el aguacate... La presencia de aminas biógenas no se atribuye a una actividad bacteriana.

## **6.2. INTERÉS BIOLÓGICO**

Las tiramina, histamina,  $\beta$ -feniletilamina, serotonina y triptamina son aminas biógenas que presentan un importante papel en la actividad fisiológica humana como la regulación de la temperatura corporal, el pH estomacal... incluso pueden influir en la actividad cerebral (Brink y col., 1990; Bardócz, 1995). Sin embargo, el interés del estudio de las aminas biógenas en los alimentos radica en las posibles implicaciones toxicológicas de estos microcomponentes para la salud humana, así como su significación desde un punto de vista higiénico-sanitario y tecnológico. Así, la presencia de cantidades relativamente elevadas de aminas biógenas en alimentos puede indicar defectos higiénicos en algún momento de la cadena de producción o manipulación, que pueden suponer un riesgo toxicológico para determinados consumidores.

### **6.2.1. Implicaciones fisiológicas de las poliaminas**

Las poliaminas participan en diversas etapas de la síntesis del DNA, RNA y proteínas. Consecuentemente, ejercen un papel esencial en el crecimiento, proliferación y diferenciación celular. Por este motivo, se ha atribuido a las poliaminas un cierto papel o una relación con los procesos cancerígenos (Bardócz, 1995).

Además, las poliaminas ejercen funciones fisiológicas específicas como mediadores de la acción de hormonas y de factores de crecimiento (Bardócz y col., 1993 y 1995). Por su naturaleza policatiónica interaccionan de forma inespecífica con estructuras celulares cargadas negativamente. Estas características confieren a las poliaminas la capacidad de estabilizar la estructura de biomoléculas y membranas fosfolípídicas celulares, protegiéndolas del estrés oxidativo y actuando, por tanto, como antioxidantes (Bardócz, 1993 y 1995).

El interés de las poliaminas en la dieta depende del estado fisiológico o patológico del individuo. Así, se deberían limitar en personas afectadas de patologías cancerosas. Por el contrario, se recomendaría su consumo en pacientes en recuperación de un proceso traumático (cirugía mayor, quemaduras...), así como en recién nacidos para favorecer la maduración del sistema intestinal e inmunitario (Bardócz 1993, 1995).

### **6.2.2. Implicaciones toxicológicas**

Las aminas biógenas ingeridas con los alimentos presentan, en principio, efectos tóxicos poco importantes, ya que nuestro organismo es capaz de metabolizarlas a nivel del tracto gastrointestinal (por fijación a mucoproteínas y degradación mediante enzimas intestinales) y a nivel hepático (Cabanis, 1985). Sin embargo, en determinados casos, estos mecanismos pueden resultar insuficientes debido a que el individuo presenta una actividad enzimática reducida (ya sea por causas hereditarias o por patologías adquiridas), en situaciones de un elevado aporte de aminas biógenas o porque se ingieren conjuntamente alimentos con aminas biógenas y fármacos inhibidores del enzima monoamino-oxidasa (MAO), responsable de la metabolización de algunas aminas biógenas en el organismo (Mariné-Font y col., 1995a; Veciana-Nogués y Vidal-Carou, 2000).

Los efectos tóxicos que se pueden dar como consecuencia de la ingesta de las aminas biógenas se pueden clasificar en *efectos tóxicos directos*, como las intoxicaciones histamínicas y las migrañas de origen alimentario, y en *efectos tóxicos indirectos*, como los producidos por las interacciones entre los IMAO y determinados alimentos (ricos en aminas biógenas). Además, también se han descrito *efectos de evolución crónica* debidos a la generación de nitrosaminas.

Durante mucho tiempo, la histamina y la tiramina han sido las aminas biógenas más relacionadas con problemas toxicológicos, especialmente la histamina debido a que es el principal agente causal de la intoxicación histamínica, desorden frecuentemente asociado al consumo de pescado en condiciones higiénico-sanitarias deficientes. En la actualidad, se acepta que el papel toxicológico de las aminas anteriormente citadas es potenciado por otras aminas debido a la saturación de los sistemas enzimáticos intestinales de oxidación de aminas (Taylor, 1986).

En la tabla 6.1, se muestra de forma resumida la implicación de las aminas más importantes en cada uno de los efectos toxicológicos relacionados con las aminas biógenas en los alimentos.

**Tabla 6.1.** Problemas toxicológicos asociados al consumo de alimentos con contenidos elevados de aminas biógenas (Mariné-Font y col., 1995b).

AMINAS BIÓGENAS	INTOXICACIÓN HISTAMÍNICA	MIGRAÑAS	INTERACCIÓN CON IMAO	FORMACIÓN NITROSAMINAS	OTROS EFECTOS
HISTAMINA	+++	++	+++	+	Toxicidad Hepática
TIRAMINA	+	+++	+++	+	Neurológicos
B-FENILETILAMINA	+	++	+++	+	Neurológicos
SEROTONINA	-	-	+++	+	Gástricos y cardíacos
TRIPTAMINA	+	-	+	+	
PUTRESCINA	+	-	-	+	
CADAVÉRINA	+	-	-	+	

### 6.2.2.1. Intoxicación histamínica

La intoxicación histamínica es una intoxicación alimentaria producida por la ingestión de alimentos con cantidades elevadas de histamina (Taylor, 1986). Se trata del trastorno asociado a las aminas biógenas más ampliamente

estudiado, especialmente en relación con el consumo de pescado, ya que durante mucho tiempo fue atribuido exclusivamente al consumo de pescados de las familias *Scomberesocidae* y *Scombridae* (atún, caballa, arenques...). Es por ello, que a este trastorno se le denominaba “envenenamiento por escómbridos” o “escombrototoxicosis”. Sin embargo, también se han dado casos de este tipo de trastorno por el consumo de otras especies de pescado, así como de otros alimentos como quesos, vinos y productos cárnicos, con lo que los nombres anteriormente citados, no serían los más adecuados. En 1985, Taylor denominó al trastorno provocado por la histamina de los alimentos “Intoxicación histamínica”. Es una denominación más genérica que pretende recoger también la importancia de la susceptibilidad o sensibilidad individual, atribuyendo a la actividad enzimática reducida de las Monoamino-oxidasa (MAO) y Diamino-oxidasa (DAO) la responsabilidad de la intolerancia alimentaria (Veciana-Nogués y Vidal-Carou., 2000).

La información de la que se dispone sobre la incidencia de este trastorno en la población es relativamente escasa. Esta falta de información en muchos casos se ve acentuada por el hecho de ser un trastorno frecuentemente mal diagnosticado que se incluye dentro de las llamadas “falsas alergias alimentarias” debido a la similitud de los síntomas y del tratamiento farmacológico que se aplica (antihistamínicos).

Los síntomas más frecuentes son provocados sobre el sistema cardiovascular y están implicados los receptores específicos de las membranas celulares H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> (Morrow y col., 1991; Stratton y col., 1991). La sintomatología característica, está recogida en la tabla 6.2.

**Tabla 6.2.** Síntomas más frecuentes de las intoxicaciones histamínicas (Stratton y col., 1991).

MANIFESTACIONES	SÍNTOMAS
GASTROINTESTINALES	Náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal y digestión pesada
NEUROLÓGICOS	Cefalea
CIRCULATORIOS	Hipotensión y palpitaciones
CUTÁNEOS	Erupción, rubor, prurito, ardor, picor, urticaria, edemas e inflamación local

No existe un acuerdo sobre la dosis mínima de histamina que puede producir efectos tóxicos en la población general, puesto que hay una gran variabilidad interindividual en la respuesta del organismo. Normalmente, se trata de un trastorno leve y de corta duración en individuos sanos, pero las personas alérgicas o más sensibles pueden sufrir manifestaciones más severas. Así, los niveles tóxicos de histamina descritos por diferentes autores, como responsables de desencadenar la intoxicación, oscilan entre 30-250 mg (Stockey, 1996). La diferencia de toxicidad, se podría explicar por la presencia de potenciadores de la acción tóxica de la histamina, como son otras aminas biógenas, el alcohol etílico y algunos fármacos (Taylor, 1986; Stratton y col., 1991).

El efecto potenciador de la toxicidad de la histamina por parte de otras aminas biógenas, radica en la acción de éstas sobre el sistema de metabolización de la histamina, al inhibir los enzimas encargados de su destrucción en el organismo (Pechanek y col., 1983). La histamina es inactivada por dos vías catabólicas básicas:

- **1ª Vía de metabolización (enzima N-metiltransferasa, HMT).** La HMT (que se encuentra distribuida en hígado, colon, bazo, pulmón, intestino delgado, estómago y riñón) metila el nitrógeno imidazólico de la molécula formando N-metilhistamina. Para ello requiere la presencia de S-adenosilmetionina como donador de grupos metilo. A continuación, la N-metilhistamina se oxida por el enzima MAO dando lugar a N-metilimidazolacético que se elimina por la orina. (Taylor, 1986).
- **2ª Vía de metabolización.** Inicialmente se degrada la histamina a imidazolacetaldehído por acción del enzima DAO. Posteriormente, por acción de la xantinoxidasa se transforma en ácido imidazolacético que finalmente se convierte en su ribósido, que también es eliminado por la orina (Summer y Taylor, 1989). La DAO únicamente se encuentra en el intestino delgado (Taylor, 1986).

Las principales aminas biógenas potenciadoras de la acción tóxica de la histamina son la tiramina, que puede inhibir la MAO y la triptamina y la serotonina que inhiben la DAO (Voigt y Eitenmiller, 1977). Al darse una inhibición parcial de los sistemas de destoxificación, se produce un aumento de la absorción de la histamina, así como de la vida media de esta amina en la circulación sanguínea (Taylor y Summer, 1986). Existe una segunda explicación, y es la existencia de una competencia entre la histamina y las

diaminas por los lugares de unión con la mucina intestinal, de forma que al unirse las diaminas a la mucina de manera preferente, hay una absorción mayor de la histamina (Taylor, 1986).

Se ha señalado que el alcohol etílico puede aumentar la capacidad tóxica de la histamina (y otras aminas biógenas) por el hecho de que puede favorecer su absorción en el tracto intestinal o disminuir su degradación al inhibir la MAO intestinal (Stockey, 1996). Si bien no existen disposiciones legislativas que limiten la presencia de histamina en bebidas alcohólicas, se ha recomendado por parte de diferentes expertos no superar cifras de entre 2 mg/l y 10 mg/l según el país (Vidal-Carou y Bover-Cid, 2001).

Diversos fármacos también pueden potenciar la acción tóxica de la histamina. El fármaco más relacionado es la isoniacida, un potente inhibidor de la DAO empleado para el tratamiento de la tuberculosis (Senayake y col., 1978). Otros medicamentos prescritos como antidepresivos y para el tratamiento de la malaria, también pueden inhibir los enzimas responsables del metabolismo de la histamina (Stratton y col., 1991).

Desde una perspectiva legal, sólo se han fijado límites tolerables para la histamina en pescados y en productos derivados. Así, la FDA (Food and Drug Administration) propuso en 1992 como nivel máximo un valor medio de 100 mg/kg en atún (Pan y James, 1985). Posteriormente, este límite fue rebajado a 50 mg/kg y se extendió a otros tipos de pescado relacionados con brotes de intoxicación histamínica (FDA, 1995). La Unión Europea reglamenta, para los pescados de las familias de los escómbridos y clupeidos, un límite más elevado: un valor promedio máximo de 100 mg/kg en un grupo de nueve muestras de pescado fresco o enlatado, y ninguna muestra debe presentar un contenido superior a 200 mg/kg. Los derivados madurados en salmuera pueden presentar un contenido histamínico superior pero sin superar el doble de los valores indicados anteriormente (CEE/493/91).

### ***6.2.2.2. Migrañas de origen alimentario***

La migraña se define como un tipo de cefalea caracterizada por episodios dolorosos recurrentes, típicamente hemicraneales, que pueden presentarse acompañados de náuseas, vómitos, alteraciones visuales y neurológicas, estreñimiento y depresión (Leira y Rodríguez, 1996). Vaughan, en 1994 señaló

la existencia de una relación entre la ingesta de algunos alimentos y la aparición de migraña. Entre los alimentos que se han descrito con mayor frecuencia como desencadenantes de estas migrañas y que pueden eventualmente presentar cantidades elevadas de aminas biógenas se encuentran el chocolate, los quesos, los embutidos, las bebidas alcohólicas y el café (Leira y Rodríguez, 1996).

Existen diversas teorías e hipótesis que intentan explicar la aparición de migrañas después del consumo de determinados alimentos, así como el establecimiento de los agentes causales de éstas. Entre ellos se encuentran algunas aminas biógenas como la tiramina (que podría ser la responsable del 30% de las migrañas), y la  $\beta$ -feniletilamina, la cual, según estudios realizados, parece ser incluso más crítica que la tiramina, ya que son necesarias dosis inferiores de  $\beta$ -feniletilamina que de tiramina para desencadenar reacciones adversas (Lüthy y Schlatter, 1983). Estas dos aminas se han descrito como posibles agentes inductores de migrañas, debido a la acción vasopresora directa o indirecta que ejercen sobre los vasos sanguíneos cerebrales.

A pesar de la realización de diversos estudios clínicos controlados, no se conoce con exactitud la relación entre la ingestión de alimentos y la inducción de un ataque migrañoso, ni la amina responsable y su dosis tóxica. Probablemente, los múltiples factores que intervienen en este trastorno, contribuyen significativamente a la dificultad de establecer dichas relaciones.

### **6.2.2.3. Interacciones entre medicamentos IMAO y las aminas biógenas de los alimentos**

Las aminas biógenas pueden provocar efectos tóxicos por mecanismos indirectos entre los que destacan las interacciones entre las aminas y los medicamentos inhibidores del enzima monoamino-oxidasa (IMAO), fármacos antidepresivos que tienen la capacidad de bloquear la acción del enzima responsable de la degradación fisiológica de las aminas.

En un principio, estas crisis se conocían como “síndrome del queso”, ya que aparecieron por primera vez en pacientes tratados con tranilcipromina, tras el consumo de quesos que contenían un elevado contenido de tiramina (Mariné-Font y col., 1995a y 1995b). La importancia de estas interacciones en el pasado, ha contribuido a la limitación del uso de estos medicamentos e incluso

a la retirada de un gran número de ellos, sustituyéndolos por otros de actividad terapéutica similar pero con mecanismos de acción diferente.

La gravedad de los síntomas provocados por la interacción entre aminas biógenas y estos medicamentos es muy variable, pudiendo aparecer desde cefalea, vómitos, fiebre, sudoración y fotofobia hasta hemorragias intracraneales que pueden derivar a consecuencias mortales. Se presentan en forma de ataques entre media hora y dos horas después de la ingesta de alimentos ricos en aminas biógenas.

Las aminas aromáticas (catecolaminas, serotonina y otras aminas) son substratos tanto endógenos como exógenos (si se ingieren con los alimentos) de las enzimas monoamino-oxidasas (MAO). Las diaminas y poliaminas sólo pueden ser substratos de las MAO cuando sus grupos amino se encuentran separados por siete o más grupos metilo (Unzeta y col., 1989). Existen dos tipos de isoenzimas: MAO tipo A y MAO tipo B, diferenciados según su especificidad para el substrato y su sensibilidad frente a determinados inhibidores. La serotonina, la noradrenalina y la adrenalina son preferentemente metabolizados por la MAO-A, mientras que la  $\beta$ -feniletilamina lo es por la MAO-B. Ambos isoenzimas pueden metabolizar la tiramina, la dopamina y la triptamina (Unzeta y col., 1989).

Los fármacos IMAO clásicos provocan un bloqueo enzimático irreversible y no selectivo sobre los dos isoenzimas, lo que da lugar a un acúmulo de aminas biógenas en el organismo que pueden ocasionar los efectos tóxicos antes descritos. Actualmente se han desarrollado IMAO selectivos que bloquean sólo uno de los isoenzimas de forma reversible y que por tanto requieren dosis más elevadas de aminas para que se produzca la interacción (Volz y col., 1996). La mayoría de este tipo de fármacos son inhibidores específicos de la MAO-A, debido a la facilidad de diseño en comparación con los específicos de la MAO-B. Los IMAO irreversibles sólo se utilizan en depresiones atípicas o acompañadas de ansiedad intensa que no mejoran con la administración de otros antidepresivos de primera elección como los antidepresivos tricíclicos. El prospecto de los medicamentos IMAO, advierte de su interacción con alimentos ricos en aminas, especificando que los encurtidos de pescado y las salazones (donde están incluidos los derivados del boquerón) son alimentos de riesgo. La tabla 6.3 muestra las especialidades farmacéuticas con actividad IMAO actualmente disponibles en España (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2005).

**Tabla 6.3.** Especialidades farmacéuticas con sustancias IMAO.

<b>Especialidad</b>	<b>Principio activo</b>	<b>Tipo</b>	<b>Indicaciones</b>
Parnate®	Tranilcipromina	Inhibidor irreversible no selectivo (clásico)	Depresión, pánico y neurosis fóbica
Manerix® Moclobemida Teva®	Moclobemida	Inhibidor irreversible selectivo para MAO-A	Depresión
Plurimen® Selegilina Davur® Selegilina Profas®	Selegilina	Inhibidor reversible selectivo para MAO-B	Parkinson

La cantidad de tiramina necesaria para provocar la interacción depende del tipo de IMAO. Se estima que entre 6 y 10 mg de tiramina producen un efecto presor notable y entre 10 y 25 mg pueden llevar a provocar crisis hipertensivas agudas graves (McCabe, 1986), en el caso de los IMAO clásicos (irreversibles). Aunque la tiramina es la amina biógena que se ha relacionado más frecuentemente con este tipo de interacción, también otras aminas aromáticas pueden dar lugar a la aparición de crisis hipertensivas en pacientes sometidos a tratamientos con IMAO (Mariné y col., 1986).

Es difícil establecer las dosis tóxicas de aminas biógenas ya que no todos los pacientes tratados con IMAO que han ingerido alimentos ricos en aminas biógenas han presentado una sintomatología bien definida y aún presentándola, no ha sido de la misma intensidad. Estas diferencias se pueden atribuir a características interindividuales (edad, sexo, capacidad metabólica...), variables en el tratamiento, así como la naturaleza de los alimentos ingeridos y su contenido en aminas biógenas (Mariné y col., 1995b). Sin embargo, dada la importancia de las posibles consecuencias de la interacción, se aconseja a los pacientes tratados con IMAO que limiten e incluso eviten el consumo de alimentos susceptibles de presentar contenidos significativos de tiramina, así como de otras aminas vasopresoras. La tabla 6.4 muestra ejemplos de alimentos con aportes elevados o bajos de tiramina y por lo tanto, aconsejables o no en pacientes tratados con medicamentos IMAO.

**Tabla 6.4.** Recomendaciones para una dieta baja en tiramina destinada a pacientes tratados con medicamentos IMAO (adaptada de McCabe, 1986 y Lippmann y Nash, 1990).

ALIMENTOS A EVITAR
Quesos (excepto los frescos)
Embutidos curados
Carnes en salazón y extractos de carne
Conservas y semiconservas de pescado: arenque, caballa, salmón ahumado y en escabeche, sardinas y atún
Hígado y productos derivados como patés
Churcut (col fermentada)
Vino, cerveza y otras bebidas alcoholicas fermentadas como vermut y sidra
Chocolate y productos derivados
Extractos de levadura

ALIMENTOS PERMITIDOS
Carne y pescado fresco
Huevos
Leche fresca
Legumbres y féculas
Frutas y verduras
Bebidas refrescantes
Galletas y postres

### 6.2.2.4. Formación de Nitrosaminas

Las aminos biógenas, especialmente la putrescina y la cadaverina pueden reaccionar con los nitritos dando lugar a nitrosaminas, compuestos de reconocida capacidad cancerígena. Esta reacción puede darse durante el procesado de los alimentos, de forma que se ingerirían las nitrosaminas ya formadas (un ejemplo sería la elaboración de embutidos, donde se incluye la adición de nitritos y nitratos por cuestiones sanitarias y para estabilizar el color), o bien, el individuo podría ingerir nitritos y aminos biógenas con los alimentos y la reacción se produciría a nivel gastrointestinal (Scanlan, 1995).

El mecanismo de nitrosación es complejo, la reacción principal es la incorporación del ácido nitroso o ión nitrito sobre una amina secundaria. Las aminos terciarias sólo pueden formar nitrosaminas previa conversión a grupos amínicos secundarios, mientras que las primarias dan lugar a compuestos nitrosados no estables (Scanlan, 1995).

Las poliaminas y diaminas son las aminas biógenas que más se han relacionado con la formación de nitrosaminas vía ciclación a aminas secundarias (Scanlan, 1975; Brink y col., 1990). También las aminas aromáticas con grupos amino primarios pueden dar lugar a este tipo de compuestos después de una serie de reacciones que comprenden diazotación, desaminación, dimerización y nitrosación. En el caso del pescado, además de las aminas biógenas, existe el riesgo potencial de formación de nitrosaminas a partir de derivados del óxido de trimetilamina (N-DMA).

### **6.2.3. Implicaciones higiénicas**

Las poliaminas pueden considerarse microcomponentes normales de algunos alimentos, puesto que están ligadas al metabolismo de las células animales y vegetales. Sin embargo, una presencia relativamente elevada de otras aminas como la histamina, cadaverina y putrescina en algunos alimentos procesados, podría reflejar el uso de materias primas en estado higiénico-sanitario deficiente y/o la existencia de microorganismos contaminantes durante las etapas del procesado o almacenamiento (Mariné-Font y col., 1995b).

Las aminas biógenas son termoestables. Esta característica las hace útiles para evaluar el estado higiénico-sanitario de los alimentos que han sufrido un tratamiento térmico ya que mientras los microorganismos desaparecen con el tratamiento, las aminas formadas gracias a la actividad descarboxilasa de éstos, aún pueden ser determinadas.

En el caso concreto del pescado, la determinación de las aminas biógenas se ha propuesto para la evaluación del estado higiénico – sanitario de la materia prima de derivados (Mietz y Karmas, 1977; Veciana-Nogués y col., 1997a). Se han descrito niveles altos de aminas biógenas en muestras de mercado y en la mayoría de los casos, su formación ha estado ligada a un almacenamiento incorrecto o al uso de materia prima de baja calidad.

El control de las aminas biógenas debe abarcar tanto las materias primas como cada uno de los puntos del procesado y del producto acabado. El perfil de formación de aminas biógenas puede ayudar a valorar los efectos y la eficacia de las normas de higiene aplicadas en la elaboración y manipulación de ciertos alimentos, así como a determinar las fuentes de contaminación más probables.

### **6.3. AMINAS BIÓGENAS EN PESCADOS Y DERIVADOS**

Los contenidos de aminas biógenas en pescado fresco son muy bajos. Sin embargo, a medida que avanza su deterioro, aumenta el contenido de éstas debido a la descarboxilación mediante enzimas bacterianas de los correspondientes aminoácidos precursores (Halász y col., 1994).

Para que se formen las aminas biógenas, además de microorganismos, es necesaria la existencia de unas condiciones favorables de disponibilidad de substrato y del cofactor de la reacción (piridoxal 5'-fosfato), así como unas condiciones ambientales de pH, actividad de agua y presencia de nutrientes, que favorezcan el crecimiento de los microorganismos y la expresión de la actividad microbiana responsable de la descarboxilación de los aminoácidos precursores (Brink y col., 1990).

En el pescado, la flora microbiana puede avanzar rápidamente desde la piel o el tracto digestivo hasta el interior del músculo debido a la alta actividad de agua, la laxitud de sus tejidos y la elevada proporción de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular. Ésto hace que en este tipo de alimento se den las condiciones propicias para la formación de aminas biógenas.

#### **6.3.1. Formación por actividad bacteriana**

La composición de la flora del pescado es muy variable en función de la zona geográfica donde vive, del método de pesca, de la temperatura del agua, del tipo de alimentación y de la manipulación y condiciones de almacenamiento tras la captura. Sin embargo, la flora microbiana habitual de estos animales (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Vibrio* y *Bacillus*) no posee en general una elevada actividad aminoácido descarboxilasa. Esta actividad se ha relacionado con microorganismos que provienen de contaminaciones externas, principalmente con psicrófilos Gram- como las enterobacterias y las pseudomonas y bacterias Gram+ como las bacterias del ácido láctico (Huss, 1995; Pascual-Anderson, 2000). Es por ello, que salvo derivados como las anchoas que requieren para su obtención procesos fermentativos, la presencia de aminas biógenas en pescado debe considerarse como “no deseada” siendo la higiene probablemente el factor más importante que condiciona su formación en el pescado.

La capacidad para producir una u otra amina, se relaciona en general con familias o géneros bacterianos concretos. Así, las enterobacterias se han descrito como grandes formadoras de histamina en pescado (Chen y col., 1989; Beutling, 1996). Dentro de esta familia, los géneros *Proteus* (Du y col., 2002) y *Klebsiella* (Hernández-Herrero y col., 1999a) son los que más se han relacionado con la capacidad de descarboxilación de la histidina. Este grupo bacteriano también se ha caracterizado por su capacidad de producir las diaminas putrescina y cadaverina (Lakshmanan y col., 2002).

Se han aislado pseudomonas capaces de descarboxilar histidina, lisina y ornitina. Así Lakshmanan y col. (2002b) aislaron pseudomonas de sardinas en sal capaces de producir cadaverina y putrescina, mientras que Du y col. (2002) aislaron de atún, bacterias pertenecientes a esta familia capaces de producir histamina. Otros trabajos confirman estas capacidades descarboxiladoras de las pseudomonas (Ben-Gigerey y col., 1999; Hernández-Herrero y col., 1999a, Koutsoumanis y col., 1999b).

Las bacterias del ácido láctico se han descrito principalmente como formadoras de tiramina. Muchas cepas tienen además la capacidad de formar histamina, putrescina y cadaverina en pequeñas cantidades (Straub y col., 1995; Dapkevicius y col., 2000).

En la actualidad se acepta que tanto la capacidad como la intensidad con la que los microorganismos pueden producir una o varias aminas biógenas está relacionada con la cepa más que con el género ya que dentro de un mismo género y especie pueden haber cepas formadoras y no formadoras. Éstas deben desarrollarse bajo condiciones favorables para poder expresar la capacidad aminoácido descarboxilasa.

#### **6.3.1.1. Factores que influyen en la formación de aminas biógenas**

La presencia de aminas biógenas en pescados y derivados debe atribuirse (excepto para espermina y spermidina) a la acción microbiana presente en los alimentos sobre la fracción proteica de éstos. Para ello, a parte de la presencia de microorganismos con capacidad para descarboxilar los aminoácidos precursores, deben darse una serie de factores propicios para la formación de las aminas (Brink y col., 1990; Halász y col., 1994):

- **La cinética de crecimiento de los microorganismos.** En general, la máxima producción de aminas biógenas se observa al final de la fase de

crecimiento exponencial, aunque puede haber diferencias en función de la amina considerada (Gale, 1946).

- **La disponibilidad de cantidades suficientes de aminoácidos precursores.** En general, en pescado fresco la fracción aminoacídica libre es poco importante, pero ésta aumenta a medida que transcurre el deterioro debido primero al proceso de autólisis que sufre el pescado y, posteriormente, por la acción proteolítica de la flora bacteriana contaminante. Las bacterias descarboxilan inicialmente los aminoácidos libres y en fases de descomposición más avanzadas, los liberan a partir de las proteínas.

Las enzimas aminoácido descarboxilasa son inducibles por la presencia de concentraciones elevadas de sustrato (Gale, 1946). En este sentido se ha señalado que las cepas proteolíticas podrían presentar un mayor potencial para formar aminas (Bover-Cid y col., 1999b).

- **La presencia de una adecuada concentración del cofactor de la reacción de descarboxilación: el piridoxal 5' – fosfato.** La actividad de la mayoría de enzimas descarboxilasa está condicionada por la presencia de un cofactor enzimático de la reacción de descarboxilación: el piridoxal 5'-fosfato (también llamado cod Descarboxilasa). La excepción está en las histidina-decarboxilasa de las bacterias Gram + (bacterias del ácido láctico, micrococos, clostridium...) cuya estructura química contiene un residuo piruvilo unido covalentemente a la molécula que actúa como el piridoxal 5'-fosfato y que por tanto no dependen de la presencia del cofactor (Cundell y col., 1991).
- **Condiciones ambientales favorables para el crecimiento de estos microorganismos, la síntesis y la actividad de sus descarboxilasas.** Múltiples factores ambientales pueden influir sobre la actividad aminogénica de los microorganismos, entre ellos destacan la actividad de agua, el pH y la temperatura. La actividad de agua está directamente relacionada con el crecimiento de los microorganismos. El pescado fresco es un alimento que presenta una elevada actividad de agua, lo que favorece el crecimiento bacteriano y hace que este producto sea altamente perecedero. De hecho, muchos métodos empleados para conservar el pescado se basan, entre otros factores, en una disminución de esta actividad (Banwart, 1982).

Con gran frecuencia se ha planteado que la producción de aminas biógenas es un importante mecanismo de defensa de los microorganismos frente a las

condiciones ácidas del medio en el que se desarrollan (Abee y Wouters, 1999). Así, valores bajos de pH parecen estimular la producción de aminas, aunque un medio excesivamente ácido puede inhibir tanto el crecimiento de los microorganismos como su actividad aminogénica (Maijala, 1994). El pH del medio influye en el crecimiento de los microorganismos y en la efectividad de sus sistemas enzimáticos. Silla-Santos (1996) señaló que el pH óptimo para que se produzca una mayor actividad aminoácido descarboxilasa se encuentra entre 4,0 – 5,5.

El efecto de la temperatura en la producción de aminas biógenas ha sido ampliamente estudiado (Ababouch y col., 1996; Koutsoumanis y Nychas, 1999b; Baixas-Nogueras y col., 2001a). Influye en varios factores relacionados con la formación de aminas biógenas como en el crecimiento bacteriano, la inducción de la actividad aminoácido descarboxilasa y en la actividad enzimática en general.

Es necesario señalar que los posibles factores que afectan la capacidad aminoácido descarboxilasa de los microorganismos han sido descritos en estudios realizados sobre cepas específicas de determinadas especies bajo condiciones controladas *in vitro*. Los resultados y conclusiones derivados no siempre se pueden aplicar a otras cepas de la misma especie e incluso puede ocurrir que no sean concordantes con lo observado en condiciones reales (*in vivo*), dada la diversidad de factores que influyen en la síntesis y actividad de los enzimas descarboxilasa microbianos.

### **6.3.2. Contenidos**

En general, en alimentos ricos en proteínas o aminoácidos como el pescado y sometidos a condiciones que permiten y/o favorecen el desarrollo de una actividad microbiana (como el almacenamiento o la fermentación), la presencia de ciertos contenidos de aminas biógenas puede considerarse casi inevitable. Asimismo, que se encuentre una u otra amina biógena dependerá del tipo de producto en cuestión, de los microorganismos que se desarrollen y sobre todo de las condiciones a los que se somete el producto.

### 6.3.2.1. *Pescado fresco o almacenado*

El **pescado fresco**, debería presentar cantidades nulas o insignificantes de aminas biógenas (a excepción de las poliaminas fisiológicas), ya que asumiendo su origen bacteriano y la baja capacidad formadora de la flora saprófita del pescado, su presencia se relacionaría con una manipulación no adecuada. Sin embargo, se pueden encontrar espermina y espermidina, puesto que son poliaminas fisiológicas que se encuentran de forma natural en los tejidos musculares de los animales y su formación no está directamente vinculada a reacciones de descarboxilación aminoacídica (Bardócz, 1995).

Son numerosos los trabajos en los que se estudia la formación de aminas biógenas a lo largo del proceso de almacenamiento y/o deterioro del pescado. La tabla 6.5 recoge algunos ejemplos. De ella se puede deducir que además del tipo de pescado y la presencia de una flora microbiana proteolítica y/o con capacidad para descarboxilar aminoácidos, un factor esencial en la acumulación de aminas biógenas es la **temperatura de almacenamiento**. Aunque el pescado destinado a consumo humano no suele estar a temperatura ambiente, en países cálidos y en casos de rotura de la cadena de frío pueden alcanzarse temperaturas próximas a los 20 °C. En general, cuanto más elevada es la temperatura de almacenamiento, más intensa es la producción de aminas biógenas, a excepción de las poliaminas fisiológicas, cuyo comportamiento es independiente de la temperatura.

Está ampliamente aceptado que los niveles de espermidina y espermina se mantienen constantes o incluso tienden a descender durante el almacenamiento (Mietz y Karmas, 1978). Esta disminución es atribuible al hecho de que las poliaminas pueden ser utilizadas por los microorganismos como fuente de nitrógeno (Bardócz, 1995), aunque también podría deberse a reacciones de desaminación (Halász y col., 1994).

A la toxicidad debida a la presencia de niveles elevados de algunas aminas, debe sumarse el papel potenciador de la toxicidad de algunas de ellas como la putrescina y la cadaverina (aminas bastante frecuentes en pescado tal y como muestra la tabla 6.5) sobre la histamina.

En estados avanzados de descomposición del pescado se han descrito descensos en los niveles de histamina, atribuibles a la acción de histaminasas bacterianas (Schulze y Zimmerman, 1982). Nontradip y col. (1992) también observaron este efecto para la cadaverina.

**Tabla 6.5.** Estudios de formación de aminas biógenas durante el almacenamiento o deterioro de pescados mantenidos a diferentes temperaturas.

Referencia	Especie de Pescado	Tª de almacenamiento	Conclusiones más relevantes
Okuzumi y col., 1990	Caballa	5 °C	Formación de HI, PU y CA
		30 °C	Formación de HI, PU y CA
Ababouch y col., 1996	Sardina	Hielo	No hay formación de HI
		Tª ambiente	Formación de HI
Mackie y col., 1997	Caballa	Hielo	No hay formación de AB
	Arenque	10 °C	Formación de CA
Veciana-Nogués y col., 1997a	Atún	Hielo	No hay formación de AB
		10 °C	Formación de HI y CA
		10 °C	Formación de HI y CA
Koutsoumanis y Nychas, 1999b	Dorada	0 °	No hay formación de AB
		8 °C	Ligera formación de CA
		15 °C	Formación de HI, PU y CA
Rodríguez y col., 1999	Trucha	Hielo	Ligera formación de PU y CA
Baixas-Nogueras y col., 2001a	Merluza	- 20 °C	No hay formación de AB
		8 - 10 °C	Formación de HI, PU y CA
		18 - 20 °C	Formación de HI, PU y CA
Du y col., 2002	Atún	0 °	Ligera formación de HI
		8 °C	Ligera formación de PU y CA.
		10 °C	Formación de HI, PU y CA
		22 °C	Formación de HI, PU y CA
Chytiri y col., 2004	Trucha	Hielo	Formación de PU
Paleologos y col., 2004	Perca	Hielo	Ligera formación de PU, CA y TI
Yongsawatdigul y col., 2004	Boquerón procedente de India	35 °C	Formación de HI, TI, PU y CA

<sup>a</sup>HI: histamina; PU: putrescina; CA: cadaverina; TI: tiramina, AB: aminas biógenas

### **6.3.2.2. Conservas y semiconservas de pescado**

Tanto las conservas como las semiconservas de pescado pueden presentar contenidos elevados de aminas biógenas (Tabla 6.6). Las semiconservas se restringen en pacientes tratados con medicamentos IMAO. Murray y col. describieron en 1982 un brote de intoxicación histamínica atribuido al consumo de semiconservas de anchoas. Sin embargo, las semiconservas han sido menos relacionadas con la aparición de problemas toxicológicos que las conservas.

Varios trabajos han estudiado el origen de la formación de aminas biógenas tanto en conservas como en semiconservas, llegando a la conclusión de que el origen de la formación de aminas biógenas se debe a:

- **Conservas** (Karnop, 1988; Raguene, 1994)
  - Materia prima de mala calidad
  - La elaboración se efectúa en condiciones no adecuadas
  - Ligera descomposición térmica en la etapa de esterilización
  - Inadecuada conservación una vez la lata está abierta para ser consumida
  
- **Semiconservas** (Schulze y Zimmermann, 1982; Karnop, 1988; Veciana-Nogués y col., 1989; Rodríguez-Jerez, 1993; Gökoglu, 2003)
  - Materia prima de mala calidad
  - Tiempos de conservación demasiado largos o rotura de la cadena de frío
  - Formación por parte de bacterias o de actividades enzimáticas remanentes, puesto que se trata de productos no totalmente estabilizados

**Tabla 6.6.** *Contenidos de aminas biógenas (ppm) en conservas y semiconservas de pescado.*

<b>Referencia</b>	<b>Conserva / Semiconserva</b>	<b>Contenidos Aminas Biógenas</b>
Fernandez-Salguero y Mackie, 1987b	Atún enlatado	HI: ND - 5 <sup>a</sup> PU: ND - 5 CA: ND - 15
Veciana-Nogués y col., 1989	Anchoas en sal	HI: 7,7 - 219 TI: 14,3 - 66
Veciana-Nogués y col., 1997b	Boquerones en vinagre	HI: 3,9 - 600 PU: 2,3 - 7,6 CA: 23,1 - 38,3 TI: 1,9 - 1500 AG: 0,8 - 58
Jørgensen y col., 2000	Salmón ahumado	HI: ND - 320 PU: 1 - 415 CA: 25 - 443 TI: 53 - 366 AG: 1 - 360
Mah y col., 2002	Anchoas saladas y fermentadas	HI: 155 - 579 PU: 92 - 241 CA: ND - 665 TI: 63 - 244
	Arenques salados y fermentados	HI: ND - 11 PU: ND - 22
	Bacalao salado y fermentado	PU: ND - 46 TI: ND-14
Karaçam, 2002	Anchoas en sal	HI: ND - 210
Gökoglu, 2003	Sardinas en vinagre	HI: 8,40- 88 PU: 71,31 - 1564 CA: 13,28 - 87 TI: 6,07 - 400

<sup>a</sup>ND: No Detectado; HI: histamina; PU: putrescina; CA: cadaverina; TI: tiramina, AG: agmatina

### **6.3.3. Aminas biógenas como índice de calidad higiénico – sanitario**

Paralelamente al estudio de la formación de aminas biógenas durante los procesos de deterioro del pescado, algunos autores han realizado seguimientos microbiológicos y organolépticos (Mietz y Karmas, 1977; Veciana-Nogués y col., 1997a; Chytiri y col., 2004; Paleologos y col., 2004). La aparición de las aminas es generalmente anterior a la aparición de signos organolépticos de deterioro, de aquí que se sugiera el uso de ciertas aminas biógenas como índices químicos objetivos para valorar la frescura y/o deterioro del pescado.

Así, Mietz y Karmas (1977) sugirieron, para valorar la frescura del pescado, el cálculo de un índice de aminas biógenas (IAB) que consistía en la relación entre la suma de las concentraciones de histamina, cadaverina y putrescina (cuya formación es cuantitativamente importante durante el almacenamiento) y, en el denominador, la suma de las poliaminas fisiológicas (cuyos niveles se mantienen constantes o incluso disminuyen a lo largo del deterioro). Hay autores que señalan que el uso de una sola amina es más adecuado para esta función indicadora, mientras que otros proponen la suma de dos o tres aminas distintas (principalmente las diaminas y la histamina) (Tabla 6.7).

El uso de las aminas biógenas como indicadores del deterioro no se encuentra libre de controversia. La producción de aminas depende de múltiples factores que no se mantienen constantes en los distintos estudios publicados. Así, el tipo de poblaciones microbianas puede modificar el perfil de aminas formadas, existiendo también la posibilidad de que los microorganismos responsables de la alteración no presenten la capacidad de formar aminas. También cabe destacar la dificultad de establecer unos niveles de aminas a partir de los cuales se pueda considerar que el producto es o no aceptable. Todo ello justifica parte de la relativa disparidad de los valores numéricos asignados a los diferentes índices.

Desde un punto de vista práctico, la relativa sencillez y sobre todo la rapidez con la que se pueden analizar las aminas biógenas (en comparación con las determinaciones microbiológicas), además de la existencia de algunas metodologías analíticas muy simplificadas y económicas (como por ejemplo un *test strip* para la determinación rápida de diaminas descrito en Hall y col., 1999), son aspectos a favor del uso de estas sustancias como índices químicos objetivos de la frescura o calidad higiénica del pescado.

**Tabla 6.7.** Índices de aminas biógenas (IAB) propuestos para evaluar el estado higiénico-sanitario del pescado.

Referencia	Especie de Pescado	IAB <sup>a</sup>	Límites
Mietz y Karmas, 1977	Atún enlatado	$\frac{HI + CA + PU}{1 + EM + ED}$	0 - 1 mg/kg fresco 1 - 10 mg/kg descomposición inicial > 10 descomposición avanzada
Stede y Stockemer, 1986	Pescado blanco (gallineta, eglefino, bacalao y solla)	CA + PU	< 50 mg / kg aceptable
Yamanaka y col., 1989	Salmónidos	CA	< 1 mg/kg fresco 1 - 10 mg/kg descomposición inicial > 10 descomposición avanzada
CEE/493/91, 1991	Escómbridos y Clupeidos	HI	< 100 mg / kg aceptable
	Escómbridos y Clupeidos en sal	HI	< 200 mg / kg aceptable
Staruszkiewicz, 1992	Derivados de pescado	CA	< 5 mg / kg aceptable
Veciana-Nogués y col., 1997a	Atún	CA + PU + TI + HI	< 50 mg / kg aceptable
Krizek y col., 2002	Carpa	PU	< 20 mg / kg aceptable
Chytiri y col., 2004	Trucha	PU	< 13 - 14 mg / kg aceptable

<sup>a</sup>HI: histamina; PU: putrescina; CA: cadaverina; TI: tiramina, EM: espermina; ED: espermidina

## 6.4. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS

Hasta el momento, se han desarrollado diversos métodos para la determinación y cuantificación de las aminas biógenas (Figura 6.3). Los métodos biológicos, ópticos y enzimáticos son bastante laboriosos, requieren en general mucho tiempo para eliminar las interferencias de otras sustancias y sólo permiten el análisis de una sola amina biógena, generalmente la histamina o la tiramina. Actualmente, los métodos más aplicados al análisis de las aminas biógenas son los de cromatografía líquida de alta eficacia, que además de presentar, en general, una mayor precisión, exactitud y especificidad que los anteriores, permiten el análisis simultáneo de varias aminas.

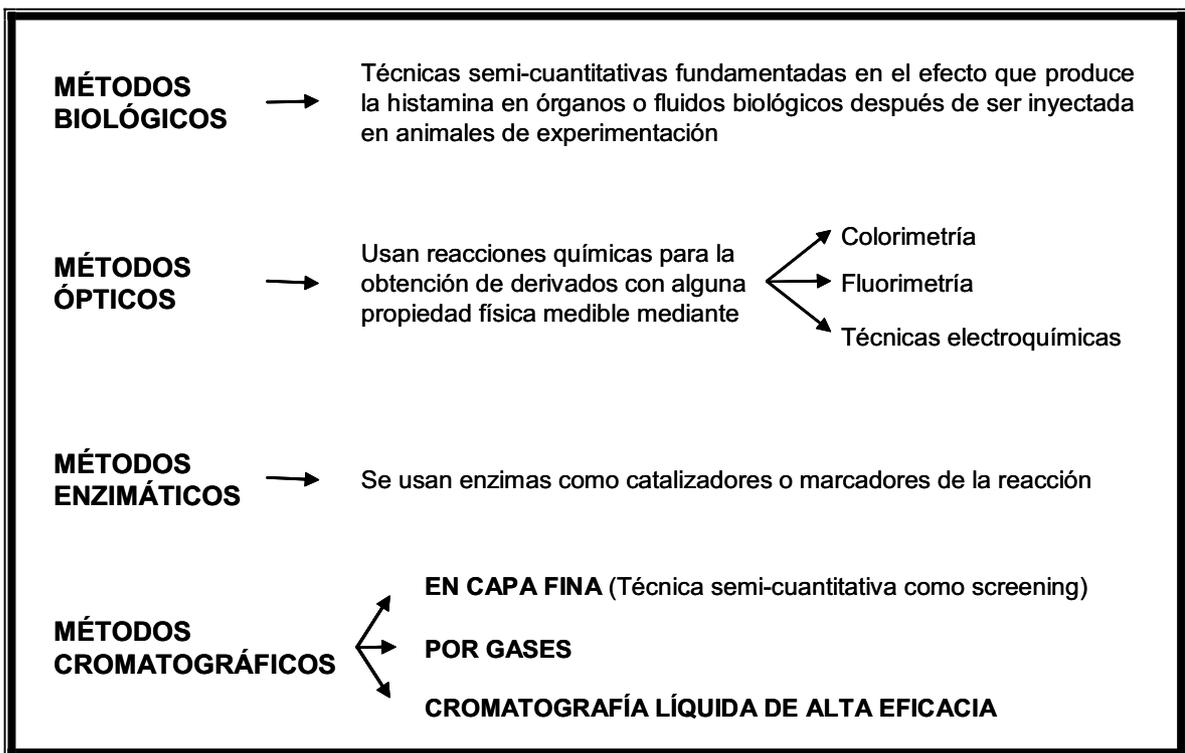


Figura 6.3. Métodos de análisis de aminas biógenas.

---

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

---



## **7. MUESTRAS Y MUESTREO**

### **7.1. ESTUDIOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN HIELO**

Las muestras fueron adquiridas en un supermercado de Barcelona que ofreció garantías de que el boquerón había sido capturado en el Mediterráneo la misma madrugada del día de la adquisición. El peso y tamaño del pescado osciló entre 16 – 22 g y 12 – 17 cm. Las muestras (en hielo) recién llegadas de la lonja se transportaron lo más rápidamente posible al laboratorio, donde el pescado fue almacenado en cajas de poroespan entre capas de hielo y dentro de una nevera a temperatura de 4 °C. Para el muestreo, se tomaron boquerones al azar de las diferentes cajas durante todo el período de almacenamiento. En general, las muestras se analizaron al llegar al laboratorio y posteriormente con una periodicidad de 2 – 3 días. El hielo fue reemplazado diariamente. Todos los estudios, se llevaron a cabo entre los meses de mayo y septiembre, coincidiendo con la época de captura de los boquerones.

El grado de frescura se estudió mediante diferentes técnicas: sensoriales (crudo y cocido), químicas y físico-químicas (pH, aminas volátiles, aminas biógenas) y microbiológicas (mesófilos, psicrófilos, enterobacterias, pseudomonas, cocos gram+ catalasa+, bacterias del ácido láctico y enterococos). Para evitar que la manipulación del boquerón pudiese comportar contaminaciones externas, los primeros análisis que se realizaron de los anteriormente citados, fueron los microbiológicos. Para ello, se utilizó el músculo de 3-4 boquerones.

Con el fin de conseguir una muestra homogénea y lo más representativa posible para las determinaciones físicas y físico-químicas, el boquerón fue descabezado y eviscerado, y el músculo (procedente de unos 15-20 pescados) se trituró en una picadora doméstica (Moulinex) hasta conseguir una masa fina y pastosa, a partir de la cual se llevaron a cabo todas las determinaciones analíticas. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

Para el análisis sensorial del pescado crudo se separó un boquerón por panelista. En el caso del pescado cocido, las muestras previamente se hubieron de acondicionar. Se colocó el pescado sin vísceras ni cabeza en un recipiente adecuado y se tapó con un film de plástico agujereado. Se cocinó durante 1 minuto a 150 W en un horno microondas. Todas las muestras se sirvieron tapadas y calientes a los panelistas. En cada punto de muestreo, los panelistas contaron con un boquerón control (adquirido el mismo día en el que realizaban el análisis sensorial).

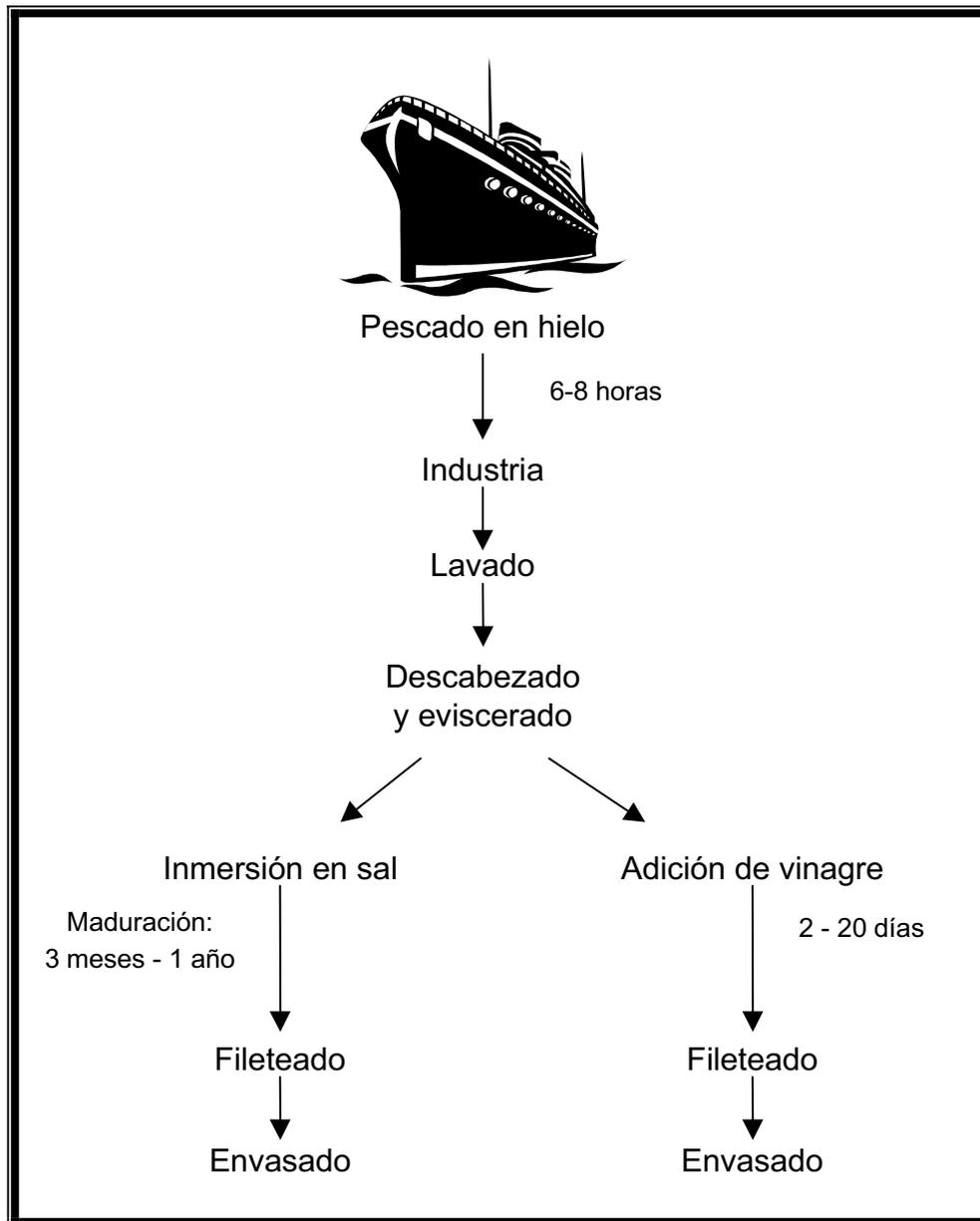
## **7.2. ESTUDIOS DURANTE LA MADURACIÓN DE DERIVADOS DEL BOQUERÓN**

### **7.2.1. Anchoas maduras en sal**

Los productos anchoados, basándose en las características de su proceso de fabricación, se incluyen dentro de la categoría de semiconservas. A diferencia de las conservas, se trata de un producto no sometido a ningún tratamiento térmico. Su estabilidad comercial se basa en el proceso de desorción al que se somete la materia prima en soluciones de elevada presión osmótica por su contenido en cloruro sódico, generándose durante el proceso de anchoado dos flujos de direcciones opuestas: el cloruro sódico difunde desde la solución hasta el interior del tejido muscular del boquerón y el agua de constitución difunde desde el pescado hacia la solución salina (Vieites y col., 1995).

Una industria pesquera situada en la costa Mediterránea, proporcionó muestras de las diferentes etapas del proceso de maduración de las anchoas en sal. La figura 7.1 muestra de forma esquemática el proceso de anchoado seguido. Durante la maduración del producto se analizaron las aminas volátiles, aminas biógenas, pH, contenido en agua, grado de proteolisis y parámetros microbiológicos.

Cuando llegan a las industrias pesqueras grandes cantidades de pescado y el boquerón no puede ser descabezado y eviscerado inmediatamente, una práctica común es la inmersión del pescado en sal justo a su llegada a la industria y una posterior evisceración y descabezado poco tiempo después. Se ha estudiado si existen diferencias en la formación de aminas biógenas y parámetros microbiológicos en ambas condiciones.



*Figura 7.1. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de las anchoas en sal y marinado del boquerón en vinagre.*

### 7.2.2. Boquerones marinados en vinagre

Los boquerones marinados en vinagre, igual como en el caso de las anchoas en sal, no se someten a ningún tratamiento térmico, y por tanto se trata de semiconservas.

Las muestras utilizadas para los estudios de este producto procedieron de una industria pesquera (fabricación industrial) y también se llevó a cabo un estudio a escala de laboratorio para estudiar la evolución de diferentes parámetros si se partía de materia prima defectuosa. A escala industrial, la empresa suministradora siguió las etapas representadas en la figura 7.1. A escala de

## ***Material y Métodos***

---

laboratorio, el boquerón crudo fue adquirido en un supermercado y se simuló el proceso industrial. La materia prima adquirida se dividió en dos lotes: en el primero se inició el proceso de marinado al llegar al laboratorio y en el segundo, el marinado se inició 10-12 horas después de haber almacenado los boquerones a temperatura ambiente. En todos los casos se analizaron las aminas volátiles y las biógenas del boquerón y del vinagre.

## **8. METODOLOGÍA ANALÍTICA**

### **8.1. ANÁLISIS SENSORIAL**

#### **8.1.1. Panel de catadores**

Un grupo de 8-10 personas del Departamento de Nutrición y Bromatología, fue entrenado específicamente para la evaluación sensorial del boquerón crudo y cocido. Para ello, se llevaron a cabo tres tipos de sesiones:

- *Sesiones preliminares* donde se comentaron los métodos disponibles (tablas sensoriales), el porqué de sus modificaciones y la necesidad de elaborar unos esquemas sensoriales nuevos específicos para el boquerón tanto crudo como cocido.
- *Sesiones de entrenamiento* cuyo objetivo fue familiarizar al panel de catadores con los nuevos esquemas sensoriales.
- *Sesiones de aplicación* donde se pusieron en práctica los nuevos esquemas elaborados.

#### **8.1.2. Tablas sensoriales**

Para el análisis sensorial del pescado crudo, se elaboró un esquema *Quality Index Method* especialmente diseñado para el boquerón. Los parámetros analizados con dicho esquema fueron: apariencia general, ojos, branquias, abdomen y carne. Se desarrolló también un esquema para el análisis sensorial del boquerón cocido donde los atributos que se analizaban fueron el olor, el sabor-suculencia y la textura.

Ambos esquemas, se presentan en el capítulo 10 de la presente memoria, ya que constituyen una de las aportaciones de la tesis.

## **8.2. ANÁLISIS QUÍMICO Y FÍSICO-QUÍMICO**

### **8.2.1. Determinación de aminas volátiles**

La determinación de trimetilamina y nitrógeno básico volátil total se efectuó mediante una técnica de análisis por inyección de flujo y difusión de gas (FIGD). Los resultados de validación de esta técnica en boquerón, así como la comparación con otros métodos de reconocida validez se detallan en el capítulo 9 correspondiente a resultados y discusión, ya que constituyen una de las aportaciones metodológicas de esta tesis.

### **8.2.2. Determinación de aminas biógenas**

#### **8.2.2.1. Fundamento del método**

La determinación de las aminas biógenas se realizó mediante el método de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE) propuesto por Veciana-Nogués y col. (1995). Respecto a este método, se introdujeron algunas modificaciones que se describen posteriormente (apartado 8.2.2.3).

El método cromatográfico aplicado conlleva la formación de pares iónicos entre las aminas biógenas y el octanosulfonato sódico presente en la fase móvil. De esta forma, las aminas pueden separarse como compuestos neutros ya que las cargas eléctricas quedan neutralizadas. La separación de las 13 aminas biógenas se realiza mediante una columna de fase reversa (fase estacionaria), la posterior derivatización post-columna de las aminas con *orto*-ftalaldehído y la inmediata detección fluorimétrica de los derivados formados. La identificación de cada amina se realiza por comparación del tiempo de retención con el de las correspondientes soluciones patrón.

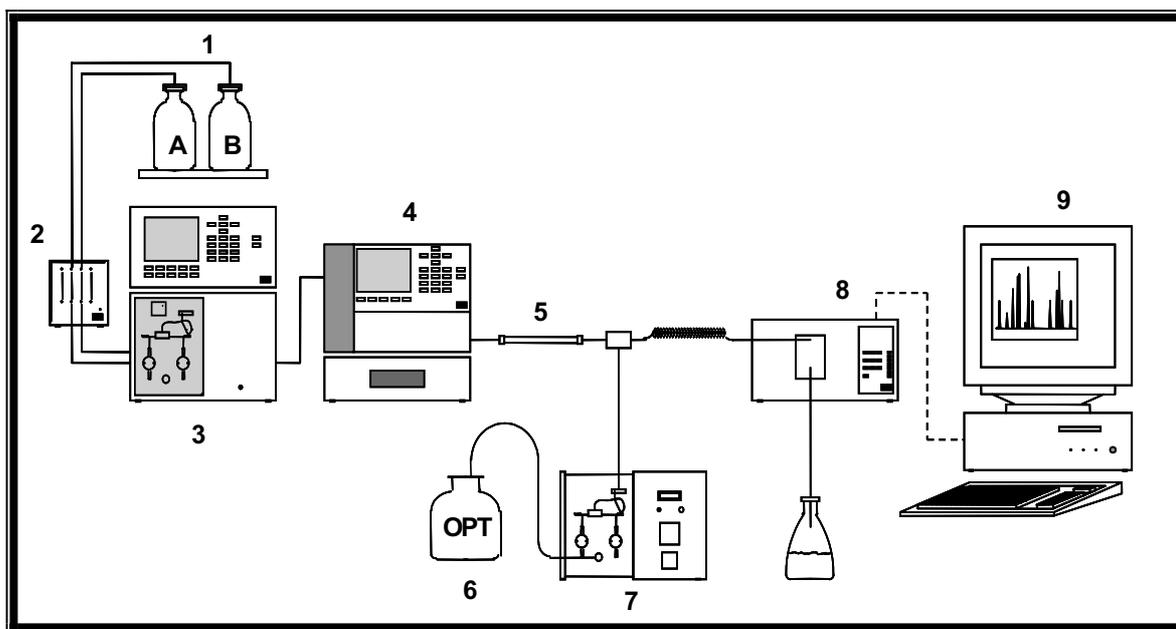
#### **8.2.2.2. Extracción de la muestra**

Previamente a la determinación de las aminas, éstas deben ser extraídas de la muestra. Para ello, entre 5 y 10 g de muestra homogeneizada se interponen con una alícuota de 7 ml de ácido perclórico 0,6N (Panreac). Tras 20 minutos de agitación, se centrifuga a 10000 rpm durante otros 20 minutos, se filtra el sobrenadante y el residuo sólido se extrae dos veces más, siguiendo el mismo procedimiento. Los tres extractos perclóricos obtenidos se reúnen y se ajusta el volumen final a 25 o 50 ml, en función del contenido de aminas biógenas de la muestra. El extracto final se filtra a través de un filtro de tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore) y se inyectan 10  $\mu\text{l}$  en el sistema cromatográfico.

**8.2.2.3. Procedimiento y condiciones cromatográficas**

El método utilizado permite la separación simultánea de 12 aminas biógenas (octopamina, dopamina, tiramina, putrescina, serotonina, cadaverina, histamina, agmatina,  $\beta$ -feniletilamina, espermidina, triptamina y espermina) en un tiempo inferior a 60 minutos.

La figura 8.1 muestra el esquema del equipo cromatográfico utilizado (Waters Cromatografía, S. A.). A diferencia del método original propuesto por Veciana-Nogués y col. (1995), para este trabajo se usó un desgasificador de membrana por vacío, que estabilizó y mejoró el comportamiento de la línea de base, puesto que redujo la formación de aire que suele darse al mezclar los eluyentes de la fase móvil de polaridad diferente. Del mismo modo, se utilizó un sistema de control de temperatura de la columna, que permitió la obtención de tiempos de retención de las aminas más constantes entre los análisis efectuados en días diferentes.



**Figura 8.1.** Esquema del sistema cromatográfico utilizado para la determinación de aminas biógenas.

1: Fase móvil; 2: Desgasificador (Waters); 3: Bomba cuaternaria (Waters 600E); 4: Autoinyector (Waters 717 Plus); 5: Columna; 6: Reactivo derivatizante; 7: Bomba post-columna (Waters 510); 8: Detector fluorimétrico (Waters 474); 9: Sistema de control y tratamiento de datos (Waters Millennium<sup>32</sup>)

Las condiciones cromatográficas utilizadas se describen a continuación. La **fase móvil** está constituida por dos eluyentes de distinta polaridad. El eluyente A es una solución reguladora de pH de acetato sódico 0,1 M (Panreac) y octanosulfonato sódico 10 mM (Merck), ajustada a pH 5,20 con ácido acético glacial (Sharlau). El eluyente B consta de la mezcla de una solución reguladora de pH de acetato sódico 0,2 M y octanosulfonato sódico 10 mM, ajustada a pH 4,50 con acetonitrilo grado CLAE (SDS), en una proporción 6,60:3,40. Antes de su utilización los eluyentes deben filtrarse a través de un filtro de tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore) y desgasificarse con ultrasonidos. La tabla 8.1 muestra el gradiente de elución programado a un flujo constante de 1 ml/min.

**Tabla 8.1.** Programa de elución cromatográfica para la determinación de aminas biógenas.

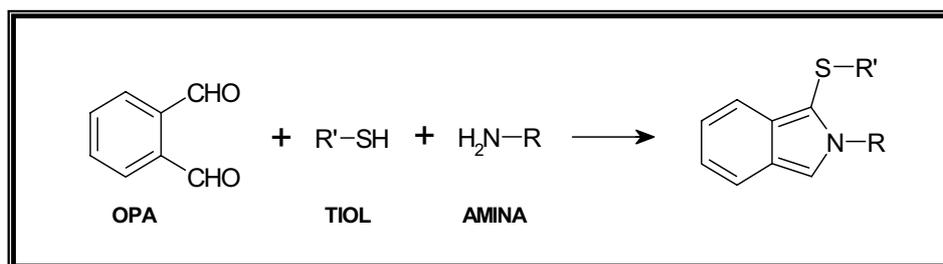
Período	Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)	Curva <sup>(1)</sup>
Elución	0,0	80	20	-
	33,0	50	50	10
	44,0	40	60	9
	48,0	20	80	4
Retorno y equilibrio	50,0	80	20	6
	53,0	80	20	11

<sup>(1)</sup>: curvas que describen el perfil de modificación de la composición de la fase móvil en el intervalo de tiempo especificado. De la 1 a la 5 son curvas logarítmicas, la 6 es una recta de pendiente 1, y de la 7 a la 11 son curvas exponenciales cada vez más pronunciadas.

La **fase estacionaria** es una columna de fase reversa Nova-Pack C<sub>18</sub> de 3,9 x 15 cm y de diámetro de partícula de 4  $\mu\text{m}$  (Waters Cromatografía, S. A.). Durante todo el análisis se mantiene a 35 °C dentro de un sistema de control de temperatura.

El **reactivo de derivatización** post-columna se prepara a partir de una solución reguladora de pH constituida por 31,0 g/l de ácido bórico (Panreac) y 26,2 g/l de hidróxido sódico (Panreac) a la que se adicionan 0,2 g/l de *orto*-ftalaldehído (ICN-Hubber) previamente disueltos en 5 ml de metanol grado CLAE (SDS), 3,0 ml/l de 2-mercaptoetanol y 3,0 ml/l de una solución de éter de polioxietilénlaurílico (Brij 35<sup>®</sup>, Merck) al 30%. Previamente a su uso, el reactivo debe filtrarse a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore) y desgasificarse en el ultrasonidos.

El reactivo de derivatización post-columna debe ser impulsado desde un sistema de bombeo adicional, a un flujo constante de 0,4 ml/min y libre de pulsaciones hasta un sistema conector en forma de T donde se encuentra con las aminas separadas salientes de la columna. Durante el corto trayecto hasta el detector se producirá la reacción de derivatización de las aminas mostrada en la figura 8.2, con el *orto*-ftalaldehído (OPA) en presencia de un grupo tiol (2-mercaptoetanol) que dará lugar a productos altamente fluorescentes (Smith, 1993).



**Figura 8.2.** Reacción de derivatización de las aminas con el *orto*-ftalaldehído en presencia de un grupo tiol.

#### 8.2.2.4. Cuantificación

El cálculo del contenido de aminas biógenas en la muestra se realizó mediante la cuantificación por patrón externo a partir de una recta de calibrado preparada con una serie de soluciones patrón de concentraciones comprendidas entre 0,1 mg/l y 20 mg/l de cada una de las aminas biógenas.

La concentración final de cada amina de la muestra analizada (mg/kg) se obtiene tras aplicar la siguiente fórmula:

$$\text{mg/kg} = C \times V/P$$

donde, C: concentración (µg/ml) de una determinada amina biógena, obtenida por interpolación del área del cromatograma en la recta de calibrado

V: volumen final (ml) del extracto

P: peso (g) de la muestra extraída

### **8.2.3. Determinación de pH**

La determinación del pH se realizó mediante la lectura directa del potencial eléctrico creado en la membrana de un electrodo de vidrio, diseñado especialmente para la medida del pH en muestras de alimento sólidas (Crison modelo Xerolyt). Previamente a la realización de la determinación del pH de una muestra, el pHímetro (Crison, modelo 2001) conectado al electrodo, debía ser calibrado a pH 4,00 y pH 7,02 con soluciones reguladoras de pH.

### **8.2.4. Determinación del contenido acuoso**

El contenido acuoso se determinó según el método oficial de análisis (Madrid-Vicente, 1994). El procedimiento se basa en una desecación de la muestra triturada y homogeneizada a  $102 \pm 2$  °C. La diferencia de peso entre la muestra inicial y la sometida a desecación se considera la cantidad de agua presente en la alícuota de muestra utilizada.

Para la determinación se secaron pesafiltros de vidrio que contenían unos 20 g de arena de mar en una estufa regulada a  $102 \pm 2$  °C, durante un tiempo mínimo de 30 minutos, transcurrido el cual se dejaron enfriar en un desecador hasta temperatura ambiente. Después de tarar los pesafiltros, se introdujeron aproximadamente unos 5 g de muestra, que se distribuyeron con una espátula por toda la superficie y se pesó el conjunto con una aproximación de 0,001 g. Se procedió a la desecación a  $102 \pm 2$  °C hasta peso constante, se enfriaron las muestras en un desecador y finalmente se pesaron.

Para el cálculo del contenido acuoso se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Agua (\%)} = \frac{P_i - P_f}{P_i - T} \times 100$$

donde:      T: peso (g) del pesafiltro seco con la arena (tara)  
              P<sub>i</sub>: peso (g) del pesafiltro con la muestra extendida (peso inicial)  
              P<sub>f</sub>: peso (g) del pesafiltro con la muestra desecada (peso final)

## 8.2.5. Determinación de las fracciones nitrogenadas

### 8.2.5.1. Nitrógeno total

La determinación del contenido en nitrógeno total ( $N_t$ ) se realizó mediante el método Kjeldahl descrito en Madrid-Vicente (1994). El método consta de tres etapas:

- La primera etapa tiene como objetivo **mineralizar o digerir una alícuota de la muestra** (1,5 – 2 g) con ácido sulfúrico concentrado (Scharlau), en presencia de un catalizador (selenio y sulfato de cobre, Scharlau) a temperaturas elevadas (400 °C) en el sistema de digestión Kjeltect<sup>®</sup> (Tecator). Durante esta etapa, la materia orgánica se transformará en inorgánica, principalmente en iones amonio debido a la acidez del medio. La etapa de digestión tiene una duración aproximada de 3-4 horas. Finaliza cuando se obtiene una solución transparente de color azulado.
- La segunda etapa consiste en la **destilación del nitrógeno inorgánico** de la solución ácida y en la posterior alcalinización con hidróxido sódico al 40% (Panreac) mediante corriente de vapor de agua en el sistema de destilación automático Kjeltect<sup>®</sup> (Tecator). Los iones amonio pasan a amoníaco y son recogidos sobre una solución de ácido bórico al 4% (Panreac).
- En la tercera etapa, se lleva a cabo una **valoración volumétrica ácido-base** con una solución normalizada de ácido clorhídrico 0,25 N (Scharlau) en presencia de un indicador de pH, Tashiro (compuesto por rojo de metilo y azul de metileno, Panreac). A partir del volumen de ácido consumido, se puede calcular la cantidad de nitrógeno destilado, equivalente al nitrógeno presente en la muestra digerida aplicando las siguientes fórmulas:

$$N_t (\%) = \frac{V \times N \times 1,4}{P}$$

$$N_t (\% \text{ peso seco}) = \frac{V \times N \times 140}{P \times (100 - A)}$$

donde, V: volumen (ml) de ácido clorhídrico gastado  
 N: normalidad exacta de la solución de ácido clorhídrico valorada  
 P: peso (g) de la muestra digerida  
 A: contenido acuoso (%) de la muestra

### 8.2.5.2. Nitrógeno no proteico

El nitrógeno no proteico (NNP) es indicativo del grado de proteolisis. Es una fracción nitrogenada constituida por aminoácidos, péptidos y otros compuestos orgánicos de bajo peso molecular solubles en ácido.

Para la determinación del NNP, se aplicó la metodología descrita por Dierick y col. (1974). Dicha técnica consiste en la determinación del nitrógeno presente en una alícuota (10 - 20 ml) del extracto perclórico de la muestra (mismo extracto que el utilizado para la determinación de aminos biógenas). El análisis se realiza mediante el método Kjeldahl descrito previamente para la determinación del nitrógeno total, utilizando 15 ml de ácido sulfúrico concentrado para la digestión de la muestra y solución de ácido clorhídrico 0,1 N (exactamente normalizada) para la valoración. El cálculo del NNP se efectuó con las siguientes fórmulas:

$$\text{NNP (mg/g)} = \frac{V_a \times N \times 14}{V_d} \times \frac{V_e}{P}$$

$$\text{NNP (mg/g peso seco)} = \frac{V_a \times N \times 14}{V_d} \times \frac{V_e}{P} \times \frac{100}{100 - A}$$

donde,  $V_a$ : volumen (ml) de ácido clorhídrico gastado  
 $N$ : normalidad exacta de la solución de ácido clorhídrico valorada  
 $V_d$ : volumen (ml) de extracto digerido  
 $V_e$ : volumen (ml) final total del extracto perclórico de la muestra  
 $P$ : peso (g) de la muestra extraída  
 $A$ : contenido acuoso (%) de la muestra

### 8.2.5.3. Índice de proteolisis

El índice de proteolisis (IP) se ha calculado a partir de los valores de nitrógeno no proteico y nitrógeno total de cada una de las muestras, utilizando la siguiente fórmula (Astiasarán y col., 1990):

$$\text{IP (\%)} = \frac{\text{NNP}}{N_t} \times 100$$

### **8.3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**

Las muestras analizadas reflejan la evolución de diversos grupos microbianos (mesófilos y psicrófilos totales, enterobacterias, pseudomonas, cocos Gram positivos catalasa positivos, bacterias del ácido láctico, enterococos, microorganismos halotolerantes y halófilos) a lo largo del deterioro de boquerón conservado en hielo y durante la maduración de anchoas en sal. Para el análisis de las diferentes poblaciones microbianas se siguieron las pautas y recomendaciones descritas por Pascual-Anderson (2000).

#### **8.3.1.Preparación de la muestra**

En cada punto de muestreo, 10 - 15 gramos de músculo procedentes de 3-4 boquerones o anchoas diferentes fueron extraídos asépticamente e introducidos en una bolsa estéril. Se añadió diluyente estéril (1,0 g/l de Bacto Peptona (Oxoid) y 8,5 g/l de cloruro sódico (Panreac) en agua destilada ajustando a pH 7) en una proporción 1:10. La muestra se homogeneizó en un triturador de paletas (*Stomacher*, Lab-Blender) durante 2 minutos. A partir de la muestra homogeneizada (suspensión madre de dilución  $10^{-1}$ ), se prepararon diluciones decimales seriadas.

#### **8.3.2.Recuentos microbianos**

La determinación del número de microorganismos o unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (ufc/g) se realizó, en función del tipo de microorganismo, mediante recuento de placa sembrada en masa o en superficie. El recuento se consideró válido en aquellas placas en las cuales habían crecido entre 30 y 300 colonias. Para ello, se sembraron placas con más de una dilución decimal. El cálculo de recuentos microbianos se realizó a partir del número de colonias desarrolladas en la placa, teniendo en cuenta tanto el factor de dilución como el volumen del inóculo sembrado en cada caso. El resultado se expresó como  $\log_{10}$  (ufc/g).

##### **8.3.2.1. Mesófilos y psicrófilos totales**

Para el recuento de microorganismos aerobios totales se sembró en superficie 0,1 ml de las diluciones decimales que se estimó oportuno en cada caso, en medio agar (*Plate Count Agar*, PCA, Oxoid). Se diseminó el inóculo con la

ayuda de una asa de vidrio estéril hasta su absorción en el medio y se incubaron las placas sembradas en la estufa (a 32 °C para el recuento de bacterias mesófilas y a 20 °C para el recuento de bacterias psicrófilas) durante 72 horas.

### **8.3.2.2. Enterobacterias**

El recuento de enterobacterias se realizó en un medio selectivo que contenía sales biliares y cristal violeta: *crystal Violet neutral Red Bile Glucose agar* (VRBG, Oxoid). Las colonias que crecen en este medio son de color púrpura y se encuentran rodeadas de un halo del mismo color como consecuencia de la precipitación de las sales.

Un mililitro de las diluciones más adecuadas se sembraron en masa en placas de petri estériles. Una vez solidificado el agar perfectamente mezclado con el inóculo, se añadió una segunda capa de VRBG con el fin de crear unas condiciones de anaerobiosis que suprimieran el crecimiento de bacterias Gram-negativas no fermentadoras. Las placas se incubaron a 37 °C en condiciones de aerobiosis durante 24 horas.

### **8.3.2.3. Pseudomonas**

El recuento de *Pseudomonas* se realizó en el medio de cultivo *Cetrimide agar* (Oxoid). Un inóculo de 0,1 ml se sembró en superficie y se diseminó con una asa de vidrio estéril. Las placas sembradas se incubaron en condiciones de aerobiosis a 32 °C durante 48-72 horas.

### **8.3.2.4. Cocos Gram-positivos catalasa-positivos (Micrococos y estafilococos)**

La enumeración de micrococos y estafilococos se llevó a cabo en agar manitol hipersalino (*Mannitol Salt Agar*, MSA, Oxoid) debido a la alta tolerancia que presentan estas especies a la salinidad. Un inóculo de 0,1 ml se sembró en superficie y fue diseminado con una asa de vidrio estéril. Las placas sembradas se incubaron a 32 °C en condiciones de aerobiosis durante 48-72 horas.

#### **8.3.2.5. Bacterias del ácido láctico**

El recuento de las bacterias del ácido láctico se realizó en el medio recomendado para su enumeración y mantenimiento: *Man Rogosa y Sharp* (MRS, Oxoid). Para ello se sembraron en superficie 0,1 ml de las diluciones más adecuadas y se diseminó el inóculo con la ayuda de una asa de vidrio estéril. Las placas sembradas se incubaron a 30 °C en una estufa de anaerobiosis, durante 48-72 horas.

#### **8.3.2.6. Enterococos**

Para el recuento de los enterococos se utilizó el medio de cultivo agar base kanamicina esculina azida (*Kanamicine Aesculine Azide*, KAA, Oxoid) selectivo y diferencial para enterococos fecales. La presencia de sulfato de kanamicina y de azida sódica inhibe la microbiota competitiva. La hidrólisis de la esculina por los presuntos enterococos ennegrece los alrededores de la colonia, debido a la formación de complejos fenólicos con hierro.

Un inóculo de 1 ml de las diluciones más adecuadas fue sembrado en masa (transferencia del inóculo a una placa de petri estéril, adición de unos 15 ml de medio KAA licuado y atemperado a 47-78 °C y mezcla). Una vez el agar estuvo solidificado, las placas se incubaron a 37 °C durante 48 horas en condiciones de aerobiosis.

#### **8.3.2.7. Bacterias halotolerantes y halófilas**

El recuento de microorganismos halotolerantes y halófilos se realizó en medio PCA, al cual le fue añadido un 3% ó 10% de cloruro sódico. Con la ayuda de una asa de vidrio estéril, se diseminó un inóculo de 0,1 ml de las diluciones decimales que se estimaron oportunas en cada caso hasta su absorción en el medio. Las placas sembradas fueron incubadas en la estufa a 32 °C durante 72 horas en condiciones de aerobiosis. Los microorganismos halotolerantes y halófilos fueron enumerados en los estudios que se efectuaron con anchoas maduras en sal.

### 8.3.3. Aislamiento e identificación de cepas

#### 8.3.3.1. Aislamiento y conservación de cepas bacterianas

Con la finalidad de evaluar la capacidad individual de los microorganismos para producir aminas biógenas *in vitro*, se procedió al aislamiento de un número significativo de colonias de cada uno de los medios selectivos anteriormente descritos. Las colonias seleccionadas al azar se sembraron en estría por agotamiento y, posteriormente, se obtuvo un cultivo puro en caldo MRS (Oxoid) de las bacterias del ácido láctico, o en caldo nutritivo de triptona y soja (*Tryptone Soya Broth*, TSB, Oxoid) de los demás grupos bacterianos.

Los caldos de las bacterias se mantuvieron en una estufa a 30 °C durante una noche para que las células alcanzaran la fase estacionaria de crecimiento. Posteriormente, se transfirió una alícuota del cultivo a un criotubo que contenía un 40% de glicerol estéril (Panreac) cuya función era ser agente crioprotector. Las cepas se conservaron en congelación a -80 °C hasta su utilización para las pruebas bioquímicas de caracterización e identificación y para la determinación de su capacidad aminoácido descarboxilasa.

#### 8.3.3.2. Identificación de cepas: Ensayos bioquímicos

La identificación (género y especie) sólo se realizó en aquellas cepas que presentaron capacidad para formar aminas biógenas *in vitro*.

#### **Tinción Gram y morfología**

La tinción Gram clasifica a las bacterias en Gram-positivas o Gram-negativas en función de la composición de la pared celular. A partir de una colonia de cultivo puro, se prepara un frotis con una gota de agua y se fija a un portaobjetos mediante la llama de un mechero Bunsen. Una vez el frotis está a temperatura ambiente, se tiñe con colorante cristal violeta (Oxoid) durante 1 minuto. Posteriormente se lava la preparación con agua destilada durante 30 segundos para que arrastre el colorante sobrante que no haya sido fijado. Se cubre el frotis con lugol (Oxoid) durante 30 segundos y se lava con alcohol y agua destilada. Finalmente, se añade el colorante de contraste, la safranina (Oxoid) durante 1-1,5 minutos y se vuelve a lavar con agua. Después de secar la preparación, se observa al microscopio el color y la morfología de las células.

Las células capaces de retener el colorante cristal violeta serán las Gram-positivas, mientras que las que se destiñen y posteriormente se vuelven a teñir con el colorante de contraste (color rojo-rosado) serán las Gram-negativas.

La morfología y el tipo de agrupación celular se estudian mediante la observación al microscopio de la preparación anterior o de un frotis de una colonia del cultivo puro con agua destilada.

#### ***Presencia de citocromo-oxidasa***

Para determinar si los microorganismos aislados presentan el enzima citocromo-oxidasa, se parte de colonias de un cultivo puro en un medio nutritivo. Se prepara un frotis sobre un bastoncillo comercial impregnado de una solución de oxalato de N,N-dimetil-p-fenilendiamina, ácido ascórbico y alfa-naftol (Oxoid). Para que la reacción dé positiva, se ha de oxidar el primer compuesto. Dicha oxidación dará lugar a que el frotis se tiña de color púrpura en unos 30 segundos debido a la formación de azul de indofenol.

#### ***Presencia del enzima catalasa***

La reacción del enzima catalasa con el peróxido de hidrógeno produce efervescencia debido a la degradación del peróxido en agua y oxígeno. Para determinar si una colonia aislada de cultivo puro presenta el enzima catalasa, se pone en contacto dicha colonia con 30  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno. La reacción es positiva, y por tanto la colonia presenta el enzima, si aparecen burbujas.

#### ***Sistemas API de identificación de microorganismos***

La identificación de los microorganismos aislados de los diversos medios de cultivo se realizó mediante el uso de galerías comerciales (BioMérieux). Estas galerías poseen determinados componentes deshidratados que permiten llevar a cabo múltiples tests bioquímicos estandarizados de manera simultánea. Algunas pruebas requieren el uso de reactivos adicionales después de un tiempo de incubación. La identificación (género y especie) se basa en la capacidad de los microorganismos para hidrolizar o modificar los distintos componentes, provocando la aparición de determinados colores indicativos de reacción positiva.

Las galerías están especialmente diseñadas para cada tipo de grupo microbiano. En la tabla 8.3 se exponen los diferentes sistemas utilizados según el tipo de microorganismo aislado. Las condiciones a las que deben someterse los kits están especificadas en las instrucciones del fabricante.

**Tabla 8.3.** Sistemas comerciales de identificación (galerías API, BioMérieux) utilizados según el tipo de microorganismo.

Grupo microbiano	Sistema API	Incubación
Enterobacterias	API 20 E	37 °C / 18-24 h
Pseudomonas	API 20 NE	30 °C / 24 h
Cocos G+ catalasa+	API Staph	37 °C / 18-24 h
Bacterias lácticas	API 50 CHL	30 °C / 48 h
Enterococos	Rapid API 32-Strep	37 °C / 4-24 h

### 8.3.4. Determinación de la capacidad aminoácido descarboxilasa

La determinación de la actividad aminoácido descarboxilasa de las cepas aisladas se realizó siguiendo la metodología propuesta por Bover-Cid y Holzapfel (1999). Esta técnica incluye la activación de los cultivos, el crecimiento en un medio diferencial y la confirmación de la capacidad productora de aminas biógenas de los microorganismos.

#### 8.3.4.1. Activación de los cultivos e inoculación en el medio diferencial

Para la activación de los cultivos, las cepas aisladas fueron subcultivadas repetidamente (entre 5 y 10 pases) en caldos de cultivo nutritivos adecuados. Dichos caldos consistían en MRS para las bacterias lácticas y TSB para las demás, que fueron enriquecidos con los aminoácidos precursores de las aminas al 0,1% (sustrato para la reacción) y piridoxal 5'-fosfato (0,005%) que actúa como cofactor enzimático en la reacción de descarboxilación.

Las colonias activadas fueron inoculadas durante 4 días a 30 °C en condiciones de anaerobiosis en un medio diferencial. Las reacciones de descarboxilación de los aminoácidos están acompañadas de un aumento del pH, debido a la basicidad de las aminas formadas. El medio diferencial en el cual son inoculadas las bacterias, contiene los aminoácidos precursores y un indicador de pH: púrpura de bromocresol, que presenta color púrpura a pH neutro y amarillo a un pH menor de 5,8. Así pues, como el pH del medio diferencial era 5,3, un viraje a color púrpura era indicativo de un resultado positivo.

#### **8.3.4.2. Confirmación de la capacidad productora de aminas biógenas**

La comprobación de la capacidad de cada cultivo microbiano para producir una o más aminas biógenas se realizó mediante el análisis cualitativo y cuantitativo de las aminas presentes en el medio de crecimiento diferencial. Para ello, una alícuota de 2 ml de caldo de cultivo homogeneizado se centrifugó (10000 rpm / 5 min) y 1 ml del sobrenadante se mezcló con 1 ml de ácido perclórico 0.6 N. Después de centrifugar nuevamente y filtrar el sobrenadante a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro, se determinó el contenido de aminas biógenas empleando el método cromatográfico propuesto por Veciana-Nogués y col. (1995), descrito en este mismo capítulo de la memoria.

### **8.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el paquete estadístico SPSS (SPSS Inc, 1999). Previamente a efectuar cualquier tratamiento estadístico, se verificó la normalidad de la distribución (prueba de Shapiro-Wilks) y la homogeneidad de las variancias (prueba de Levene). En el caso de no cumplirse estos supuestos, se aplicaron las correspondientes metodologías no paramétricas.

Se aplicó la curva ROC para determinar la capacidad discriminatoria de un parámetro entre dos estados (fresco y deteriorado) en aquellos estudios en los que el objetivo planteado fue el establecimiento de un límite de aceptabilidad. También fue aplicado el Índice Kappa (Doménec-Massons, 2000), para evaluar el nivel de concordancia que presentaban diferentes técnicas en el punto de rechazo.



---

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---



## **9. VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE N-TMA Y N-BVT POR ANÁLISIS DE INYECCIÓN DE FLUJO EN BOQUERÓN**

**Pons-Sánchez-Cascado, S.; Izquierdo-Pulido, M.; Mariné-Font, A.; Veciana-Nogués, M. T; Vidal-Carou, M. C. (2000).** Reliability of Trimethylamine and Total Volatile Basic Nitrogen determinations by Flow Injection-Gas Diffusion Techniques in pelagic fish: *Engraulis encrasicolus*. *Quím Anal*, 19: 165-170.

### **9.1. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO**

La frescura es uno de los aspectos más importantes de la calidad del pescado, y es por ello que muchos autores buscan métodos sencillos, rápidos y objetivos para determinar compuestos químicos cuyo contenido pueda orientar acerca de la misma. La trimetilamina, expresada como nitrógeno de trimetilamina (N-TMA) y el nitrógeno básico volátil total (N-BVT) son dos de los posibles indicadores químicos del grado de frescura, que tienen en común su generalmente reconocida buena correlación con la valoración organoléptica del pescado y una amplia tradición de uso en la inspección pesquera.

Existen diferencias notables en los contenidos de N-TMA y N-BVT entre las diferentes especies de pescado. Por tanto, es necesario establecer niveles máximos para cada una de las especies o familias. En el marco del proyecto europeo en el que se encuentra esta tesis, se ha validado una técnica por análisis de inyección de flujo (FIA) para la determinación de ambos indicadores químicos en boquerón. La metodología propuesta, además de cumplir los requisitos de sencillez y rapidez en la obtención de resultados, permite valorar

ambos parámetros con el mismo aparato. Además, por el tamaño y coste del equipo, así como por su fácil manipulación, es muy factible su uso en lonjas e industrias de procesado de pescado (ver apartado 5.2.2.3, *métodos de análisis por inyección de flujo*, de esta memoria).

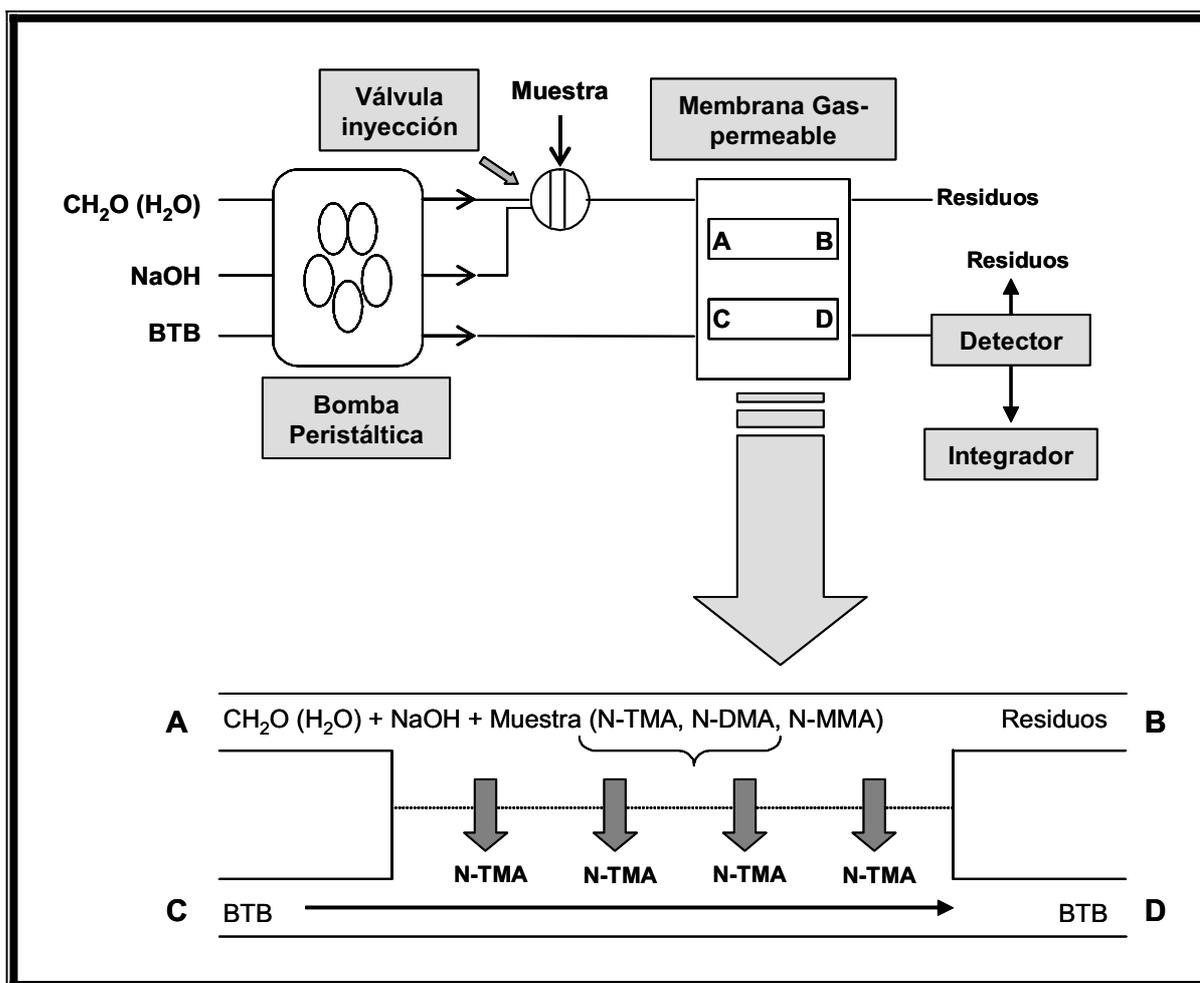
En este estudio se buscaron las condiciones óptimas de trabajo para adaptar la técnica a los contenidos de estos compuestos en boquerón del Mediterráneo y la misma se validó en términos de linealidad, precisión y exactitud. Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos con otras técnicas de uso tradicional para el análisis de estos compuestos: el método colorimétrico de Dyer para la determinación del N-TMA (AOAC, 1995; Dyer, 1945) y la destilación por corriente de vapor para la del N-BVT (CEE/149/95).

Finalmente, también se determinaron los niveles de N-TMA en muestras de boquerón del Mediterráneo almacenadas a diferentes temperaturas tras su captura, con el fin de efectuar un primer estudio exploratorio para establecer cuáles podrían ser los niveles habituales de estos compuestos en boquerones con distintos grados de frescura. A diferencia de lo que ocurre con especies de pescado blanco, la información disponible al respecto en especies grasas como el boquerón, es muy escasa.

## **9.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El método propuesto se basa en la medida colorimétrica del cambio de color inducido como consecuencia del cambio de pH de una solución que contiene el indicador azul de bromotimol (BTB), al entrar en contacto con los compuestos nitrogenados básicos volátiles liberados a partir de un extracto ácido de pescado tras su alcalinización. La determinación del N-TMA y del N-BVT se diferencia en el uso de formaldehído como reactivo auxiliar en la determinación del N-TMA. Este reactivo evita la interferencia de otros compuestos también presentes en el pescado, que junto con el N-TMA constituyen el N-BVT.

En la figura 9.1 se muestra un esquema del equipo utilizado para la determinación del N-TMA y el N-BVT por FIA, así como el recorrido en el circuito que deben seguir tanto la muestra como los diversos reactivos empleados.



**Figura 9.1.** Equipo de análisis por inyección de flujo para la determinación de N-TMA y N-BVT.

Una bomba peristáltica impulsa el formaldehído (agua en el caso de la valoración de N-BVT), hidróxido sódico (NaOH) y BTB a través del sistema. La muestra se introduce por la válvula de inyección y reacciona con la solución de NaOH, que provocará que sólo el N-TMA, si se ha incorporado formaldehído, o todas las sustancias básicas nitrogenadas que constituyen el N-BVT, pasen de la forma ionizada en la que se encuentran en el extracto ácido de pescado introducido en el sistema, a forma no ionizada (gas), por lo que pueden traspasar la membrana que separa el circuito por el que fluye la muestra de aquel por el que fluye el BTB. El cambio de pH debido a la incorporación de sustancias nitrogenadas básicas en la solución de BTB da lugar a un cambio de color cuya magnitud se cuantifica con la ayuda de un integrador conectado al sistema de detección, en el que se mide la variación de la absorbancia a  $\lambda=635$  nm.

## Resultados y Discusión

Los resultados de validación, tanto de la metodología FIA como de las técnicas tradicionales fueron satisfactorios (Tabla 9.1). La linealidad obtenida de todos los métodos presentó valores equiparables. Los coeficientes de determinación fueron de  $R^2 \geq 99\%$  destacando, sin embargo, mayor sensibilidad de la técnica FIA frente a la obtenida por el método clásico de la AOAC para la determinación de N-TMA y mayor precisión, tanto para la determinación de N-TMA como para la del N-BVT.

**Tabla 9.1.** Resultados de validación del N-TMA y N-BVT por la técnica FIA y por metodologías tradicionales.

	TMA		N-BVT	
	AOAC	FIA	UE	FIA
<b>Linealidad</b> (rango, mg/100 ml)	0,8 - 4	0,07 - 4,20	5,6 - 42,0	0,3 - 5,6
<b>Precisión</b> (coeficiente de variación)	2,0 %	1,4 %	2,1 %	0,8 %
<b>Recuperación</b> (%)	99,1 $\pm$ 2,6	97,7 $\pm$ 4,0	96,8 $\pm$ 1,1	96,1 $\pm$ 1,5

La exactitud del método se estudió en términos de recuperación, empleando tres niveles distintos de adición de patrón. Por análisis estadístico (Cochran's test) se comprobó que la recuperación no era dependiente del nivel de N-TMA o N-BVT presente en la muestra. Asimismo, tampoco se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas FIA y las tradicionales (T de student).

Finalmente la metodología propuesta se aplicó a la determinación de N-TMA en boquerones almacenados en hielo, a 8-10 °C y a 18-20 °C. Como cabía esperar, debido a su origen bacteriano, los contenidos de N-TMA aumentaron más rápidamente en muestras conservadas a 8-10 °C ( $\approx$  10 mg TMA / 100 g pescado en 4 días) y 18-20 °C ( $\approx$  11 mg TMA / 100 g pescado en 24 horas) que en las muestras conservadas en hielo (niveles inferiores a 2 mg TMA / 100 g pescado, después de 27 días de almacenamiento). Sin embargo, los niveles detectados siempre fueron muy inferiores a los propuestos por algunos autores como indicadores de rechazo para pescado blanco (5 – 15 mg/100 g, Ludorf y Meyer, 1978).

**Pons-Sánchez-Cascado, S.; Izquierdo-Pulido, M.; Mariné-Font, A.; Veciana-Nogués, M. T; Vidal-Carou, M. C. (2000).** Reliability of Trimethylamine and Total Volatile Basic Nitrogen determinations by Flow Injection-Gas Diffusion Techniques in pelagic fish: *Engraulis encrasicolus*. *Quím Anal*, 19: 165-170.



# Reliability of Trimethylamine and Total Volatile Basic Nitrogen Determinations by Flow Injection-Gas Diffusion Techniques in Pelagic Fish: *Engraulis encrasicolus*

## Abstract

A collaborative project among different European countries (U.E. FAIR CT97-3253) tries to validate a new methodology applying Flow Injection/Gas Diffusion techniques, to automate the determination of Trimethylamine (TMA-N) and the Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N) for different fish species. The proposed FIGD methods are simple, rapid and can be applied to the on-line monitoring control of fish factories; moreover, they allow the determination of both TMA-N and TVB-N using the same equipment. In this work, both FIGD procedures were validated in terms of linearity, precision and recovery for anchovy samples (*Engraulis encrasicolus*). Reliability results are compared with those obtained using reference methods. AOAC 971.14 for TMA-N and 95/149/CE for TVB-N. In addition, a storage study of fresh *E. encrasicolus* was done to monitor its TMA-N production along spoilage.

Precision was similar for both FIGD and reference techniques, the relative standard deviations being satisfactory, according to Horwitz's formula for intra-laboratory studies. However, less variability occurred with FIGD methods than with reference ones. Accuracy was studied using three standard addition levels for each analyte. Recovery was independent of analyte concentration, showing with FIGD techniques average values of  $97.70 \pm 4.03\%$  for TMA-N and  $96.06 \pm 1.48\%$  for TVB-N. Both FIGD procedures were reliable and more sensitive than the reference methods. Therefore, they can be useful to evaluate the freshness degree of anchovies, as well as of other fish species attaining low TMA-N levels. The storage study showed that formation of TMA-N in anchovies, was slow even at abusive temperatures.

**Keywords:** Anchovy, Flow Injection/Gas Diffusion Analysis, Trimethylamine, Total Volatile Basic Nitrogen.

S. Pons-Sánchez-Cascado, M. Izquierdo-Pulido, A. Mariné-Font, M. T. Veciana-Nogués and M.C. Vidal-Carou\*

Departament de Nutrició i Bromatologia-CeRTA. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona. Av. Joan XXIII s/n. 08028 Barcelona. (Spain).

## Introduction

Freshness is an important aspect of fish quality and has a great influence on their technological properties. One of the most characteristic chemical changes occurring in marine fish during spoilage is the production of Trimethylamine (TMA-N) and other volatile bases.

Trimethylamine oxide (TMAO) is a compound usually involved in the osmoregulatory function of marine fish [1]. After death, TMAO is quickly reduced by bacterial enzymatic activity to TMA-N, which is never found in alive fish. TMA-N level increases during fish spoilage and is the main compound responsible for the characteristic odour of spoiled fish.

After a latency period, TMA-N production follows an exponential curve, which corresponds to bacterial growth [2]. Besides TMA-N, urea and other basic nitrogenous compounds, also produced during fish spoilage, constitute the Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N). The determination of TVB-N was one of the first chemical indexes applied to fish to evaluate the degree of freshness, as an alternative

to classical sensory evaluation, which is more subjective. TVB-N levels remain very low while fish is still edible and they quickly increase while the fish reaches sensory rejection. Therefore, TVB-N determination can be particularly suitable to evaluate fish species having low TMAO content [3].

Differences in both TMA-N and TVB-N generation rates occur among different fish species [4], and then, different maximum allowable contents for those compounds have been reported depending on the species. Thus, the European Union has established different maximum allowable levels, ranging from 25 to 35 mg of TVB-N/100 g [5]. Nowadays there is not a general maximum legal limit set for TMA-N content for all sorts of fish. Several authors however have recommended maximum tolerance levels within the range of 5 to 15 mg/100 g [6].

There is an official European method to determine TVB-N [5] but there is not one for TMA-N. The European method to analyse TVB-N (95/149/CE) includes a steam distillation of the acidic fish extract

\* Author to whom correspondence is to be sent  
e-mail: mcvidal@farmacia.far.ub.es

and its further titration with 0.01N HCl.

For TMA-N determination, the current official method of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) is frequently used. This AOAC procedure [7] is based on Dyer's method, which involves a reaction of the TMA-N with picric acid in alkaline medium, to form a UV-coloured complex [8].

Gas Chromatographic (GC) techniques for TMA-N determination can be also useful due to their high sensitivity [9-11]. The Flow Injection/Gas Diffusion technique (FIGD) has been proposed as a new methodology for TMA-N and TVB-N determinations as it is a simple and rapid procedure, and can be introduced as a monitoring technique in laboratories at fish industries.

In addition, FIGD procedures allow the determination of both TMA-N and TVB-N using the same equipment, and provide a high sensitivity for TMA-N, comparable to that obtained with other high cost analytical techniques such as GC procedures [11].

FIGD equipment and conditions required for TMA-N determination in lean fish have been previously described [12], but no data on reliability for TVB-N determination are so far available. Levels of TVB-N and TMA-N may widely vary among different kind of fish and thus, it is necessary to check whether the sensitivity and linearity of these analytical procedures is suitable to evaluate the freshness degree of different fish species.

Anchovy (*Engraulis encrasicolus*) is a pelagic fish belonging to the Clupeidae family, which is commonly consumed in our country as fresh fish. It can be used also to obtain traditional brined fish products. In this work, both FIGD procedures for TMA-N and TVB-N determination were applied to fresh anchovies, since both analytes might separately evolve throughout ice storage, achieving (in edible samples) levels very different from those re-

ported for lean fish. In addition, both FIGD procedures were validated in terms of linearity, precision and accuracy, in order to compare them with those obtained with the reference chemical methods (E.U. method for TVB-N and AOAC method for TMA-N).

Data on TMA-N levels and their evolution during storage of anchovies kept in ice, under refrigeration and at room temperature, besides, provide a scope for the application of these new methods.

## Experimental

Samples of fresh Mediterranean anchovy (*Engraulis encrasicolus*) were obtained from a Barcelona local market. They were rated as excellent quality grade by their appearance according to Botta's criterion for this fish species [13].

For the storage study, 5 kg of fresh anchovy were divided into 3 batches. One was kept on melting ice (0 °C) for 27 days (sampling every 2-3 days), the second one, under refrigeration (8-10 °C) for 4 days (sampling every 8 hours) and the last one, at room temperature (18-20 °C) for 2 days (sampling every 4-6 hours).

For each determination, 10 anchovies were taken at random and treated as explained below.

### Sample preparation.

After removal of the head, bones and guts, the flesh of the anchovy samples was triturated and homogenised with a domestic mincer to obtain a fine paste. 50 g or 10 g of prepared sample were mixed with 100 mL or 90 mL of 7.5% Trichloroacetic acid (TCA) for TMA-N or TVB-N determinations, respectively.

Then, the mixture was homogenised using an Ultra Turrax® device (IKA Labortechnik) for two minutes and, filtered to obtain the sample extract.

### Standard preparation

Trimethylamine (TMA-N): a) Stock solution.- 0.682 g trimethylamine hydrochloride (Sigma) were added to 1 mL 25% HCl and adjusted to 100 mL with water. The TMA-N content of a 5 mL aliquot was checked by adding to it enough quantity of 40% NaOH to alkalise,

The distillation was performed in a Ticator® distiller, the distilled solution was collected into 10 mL 4% boric acid and titrated with 0.1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> using Tashiro indicator.

b) Working solution for TMA-N determination by the AOAC method.- 1 mL stock solution was added to 1 mL 25% HCl and adjusted to 100 mL with water. c) Working solution for TMA-N determination by FIGD.- The TMA-N standards were prepared with 7.5% TCA in the range of 0.07-4.2 mg/100 mL by taking appropriate dilutions of the Stock solution.

Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N): a) Stock solution.- To be used as standard, 5.349 g of ammonium chloride (Panreac) were dissolved in 1 litre of 7.5% TCA to prepare a 140 mg TVB-N/100 mL solution.- b) Working solution TVB-N determination by the EU method.- The stock solution was diluted with 7.5% TCA to prepare solutions from 5.6 to 42 mg/100 mL. - c) Working solution for TVB-N determination by FIGD.- The stock solution was diluted appropriately with 7.5 % TCA to obtain standard solutions ranging between 0.28 to 5.6 mg/100 mL.

### Reagents

a) TMA-N determination by the AOAC method.- Anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 20% formaldehyde solution; 2% picric acid solution; saturated solution of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and toluene. All reagents were obtained from Panreac except the picric acid that was from Fluka.- b) TVB-N determination by the UE method.- 4% Boric acid solution (Panreac); 40% NaOH (Quimivita); 0.01 N HCl (Merk); 1% ethanolic phenolphthalein (Sigma); Tashiro indicator (Sigma).- c) TMA-N and TVB-N determinations by FIGD.- 0.1 NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution (Scharlau); 0.6 M NaOH solution (Panreac); 20% formaldehyde solution (Panreac); 0.03 % Bromothymol blue (BTB) (adjusted to pH 6.3-7.0 with NaOH)(Sigma).

### Apparatus and procedures

a) TMA-N determination by the AOAC method.- 1 mL aliquot of sample extract was pipetted into test tubes and diluted to 4.0 mL with water.

For the standard curve, 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 mL working standard solution were pipetted and diluted to 4.0 mL with water. 4.0 mL of water were used as a blank.

1 mL of 20% formaldehyde, 10 mL of toluene and 3 mL  $K_2CO_3$  saturated solution were added. Stoppered tubes were vigorously shaken.

The toluene layer was pipetted off into a tube containing 0.1g of anhydrous  $Na_2SO_4$ , which was then stoppered and shaken to remove water from toluene. 5 mL of water-free toluene were pipetted off into a tube, adding then 5 mL of 0.02% picric acid solution and mixing.

Absorbance was read at a wavelength of 410 nm (Spectrophotometer Shimadzu UV-160A).

(b) TVB-N determination by the EU method.- 10 mL of sample extract or working standard solution were pipetted into Tecator® flasks. 10 mL of 7.5% TCA were used as a blank. 3-4 drops of 1% phenolphthalein were added before connecting the flasks into the Tecator® (Kjeltec System 1002 Distilling unit).

Enough quantity of 40% NaOH was added to achieve an alkaline medium, to distil until 150-200 mL were collected on 20 mL of 4% boric acid solution.

Titration was with 0.01 N HCl using Tashiro indicator. A calibration curve was drawn with the results obtained from the standard solution of the steam distillation.

(c) TMA-N and TVB-N determination by FIGD.- The equipment consisted of a peristaltic pump (IPC-8, Ismatec), an injection valve (model 5020 Reodyne), a gas-permeable membrane, a colorimetric detector and an integrator HP 3396 A (Hewlett Packard). TMA-N determination: The peristaltic pump drives the formaldehyde, 0.6 M NaOH and BTB solutions through the system. Formaldehyde is used as it reacts with primary and secondary amines, suppressing possible interferences.

Samples (100  $\mu$ L) are introduced through the injection valve, reacting with the formaldehyde and later with 0.6 M NaOH. NaOH converts TMA-N ions to gas, which goes through the membrane and gets dissolved into the BTB solution inducing a colour change (due to the alkalini-zation), which is quantified by the colorimetric detector set at 635 nm. A calibra-

tion curve is made from the standard solutions described above. Figure 1 shows the scheme of the FIGD system for TMA-N determination.

TVB-N determination: The same procedure described above is employed, except for the use of formaldehyde, since here all volatile bases have to react directly with the NaOH and diffuse through the membrane. Figure 2 shows the scheme for the FIGD system in TVB-N determination.

#### Statistical analysis

Statistical tests were applied using the SPSS Package for Windows.

### Results and discussion

The reliability of the FIGD methodologies for the determination of TMA-N and TVB-N was studied in terms of linearity, precision and recovery. The reliability of the reference methods (AOAC and EU methods) was also studied in the same

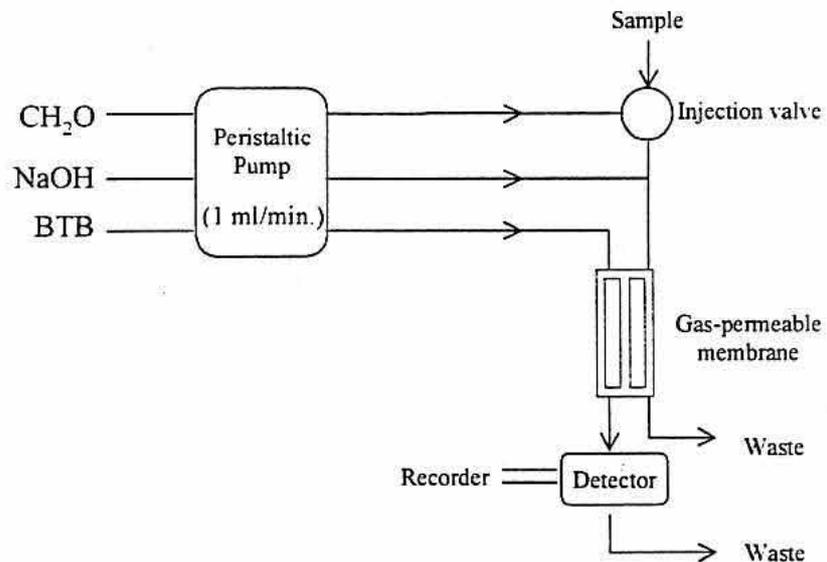


Figure 1. Flow Injections/Gas Diffusion system to determinate TMA-N

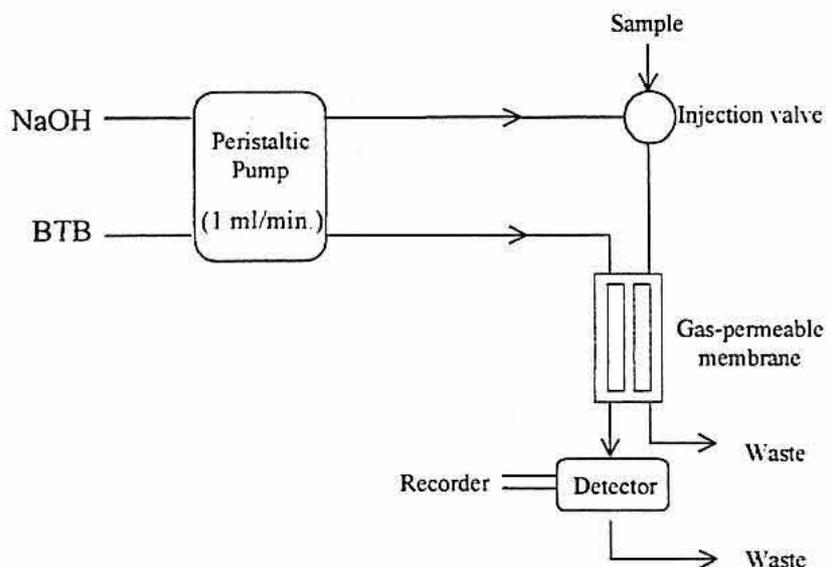


Figure 2. Flow Injections/Gas Diffusion system to determinate TVB-N

**Table 1** Reliability results of TMA-N determination in anchovy samples by both AOAC and FIGD procedures

		AOAC	FIGD
Linearity	r	0.998	0.998
	R <sup>2</sup> (%)	99.5	99.5
	p	< 0.0001	< 0.0001
	Range (mg/100ml)	0.80-4.00	0.07-4.20
Precision	RSD <sub>E</sub> <sup>a</sup> (%)	2.0	1.4
	RSD <sub>H</sub> <sup>b</sup> (%)	5.9	6.0
Recovery	Level I (1.0 mg)	101.2 ± 1.2 <sup>c</sup>	95.1 ± 1.6 <sup>c</sup>
	Level II (2.0 mg)	96.5 ± 2.0	95.3 ± 1.0
	Level III (4.1 mg)	99.9 ± 1.1	102.7 ± 5.5
	Mean value	99.1 ± 2.6	97.7 ± 4.0

<sup>a</sup> Experimental relative standard deviation; <sup>b</sup> Maximun relative standard deviation allowed according to the Horwitz's criterion for intralaboratory studies; <sup>c</sup> Mean value ± Standard deviation

**Table 2** Reliability results of TVB-N determination in anchovy samples by both EU and FIGD procedures

		EU	FIGD
Linearity	r	0.999	0.995
	R <sup>2</sup> (%)	99.8	99.0
	p	< 0.0001	< 0.0001
	Range (mg/100 mL)	5.6-42.0	0.3-5.6
Precision	RSD <sub>E</sub> <sup>a</sup> (%)	2.1	0.8
	RSD <sub>H</sub> <sup>b</sup> (%)	5.7	5.6
Recovery	Level I (1.5 mg)	96.9 ± 0.9 <sup>c</sup>	96.4 ± 1.3 <sup>c</sup>
	Level II (3.0 mg)	93.3 ± 1.2	94.5 ± 0.7
	Level III (6.0 mg)	97.0 ± 1.2	97.2 ± 0.7
	Mean value	96.8 ± 1.1	96.1 ± 1.5

<sup>a</sup> Experimental relative standard deviation; <sup>b</sup> Maximun relative standard deviation allowed according to the Horwitz's criterion for intralaboratory studies; <sup>c</sup> Mean value ± Standard deviation

terms and with the same samples for the purpose of comparison.

#### Determination of TMA-N by the AOAC and FIGD procedures (Table 1)

Linearity.- Detector responses in the corresponding calibration curves were linear from 0.80 to 4.00 mg/100 mL following the AOAC method, and from 0.07 to 4.20 mg/100 mL with the FIGD technique.

Linearity of both methods was verified by analysis of variance of regression, and the results obtained were always satisfactory.

Correlation coefficients (r) were higher than 0.995 for both methodologies (p < 0.001), and coefficients of determination (R<sup>2</sup>) were higher than 99.5% for all standard curves. Even though both methods showed an excellent linearity, the FIGD procedure was more sensitive than the AOAC method, as it allowed to

quantify at least 10-fold lower amounts of TMA-N: 0.07 mg/100 mL versus 0.8 mg/100 mL.

Precision.- Eight determinations of TMA-N were carried out the same day, using the same reagents and apparatus for both AOAC and FIGD methods. RSD values were always satisfactory, according to the Horwitz's formula for intralaboratory studies [14]. However, less variability was found when the FIGD technique was used. The AOAC procedure is a complex method involving multiple steps, while the FIGD technique only needs a simple sample extraction.

Recovery.- Recovery was tested for both methodologies by the standard addition procedure with three addition levels.

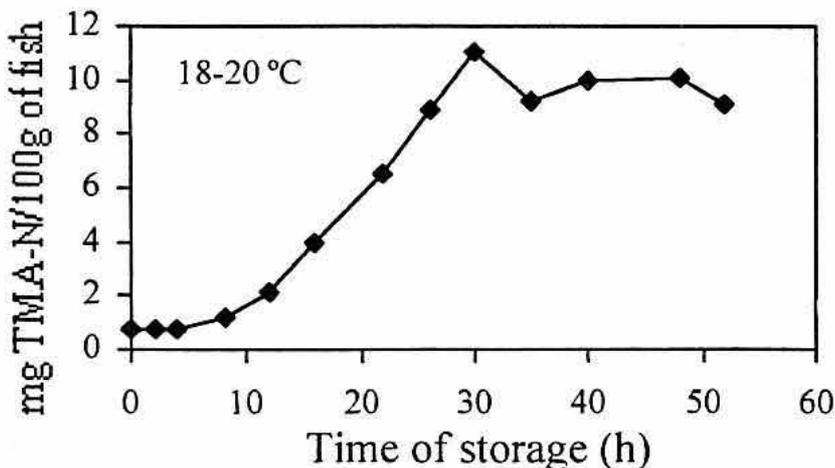
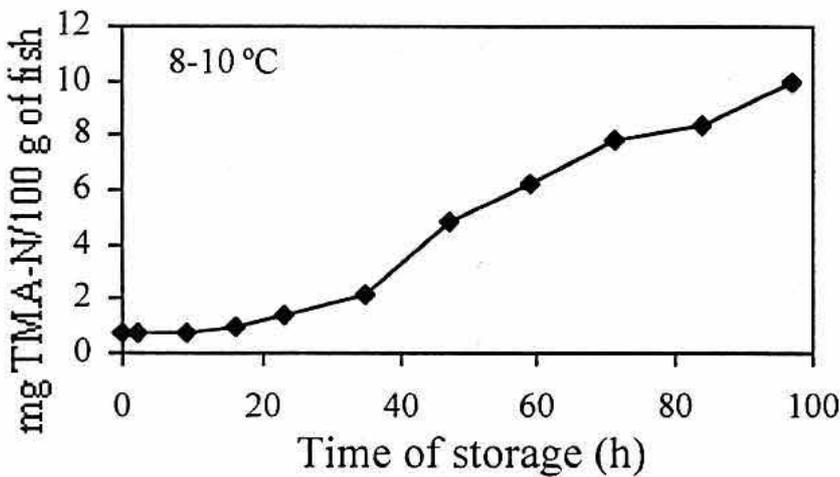
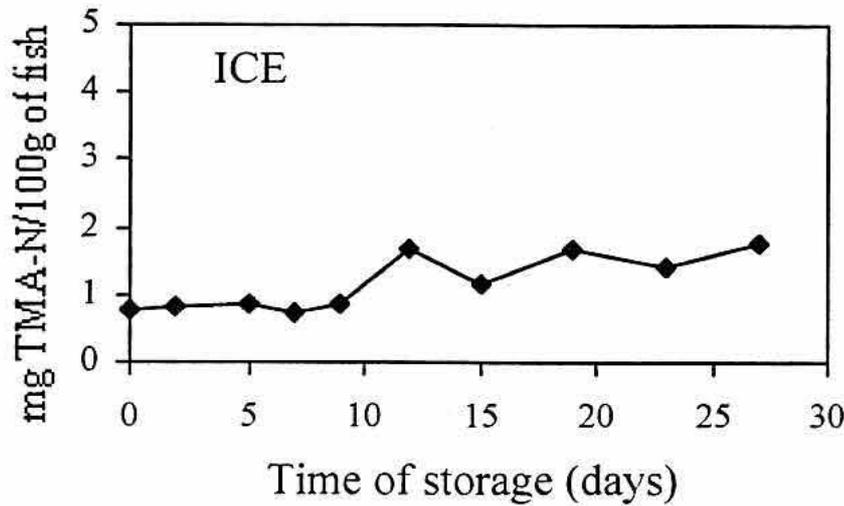
It was verified by statistical analysis (Cochran's test), for both methods, that accuracy did not depend on TMA-N content of the sample. Moreover, no significant differences (Student's t-test) were observed between the mean recovery figures obtained with the FIGD and the AOAC methods.

#### Determination of TVB-N by the EU and FIGD procedures (Table 2)

Linearity.- Calibration curves were obtained for working standard solutions with 5.6 to 42.0 mg/100 mL for the official EU method and with 0.3 to 5.6 mg/100 mL for the FIGD technique. Linearity was verified for those ranges analysing the variance of the regression.

Coefficients of regression of r > 0.995 and coefficients of determination of R<sup>2</sup> > 99.0% were obtained using the two methodologies. As observed from the TMA-N analysis, FIGD allowed the quantification of smaller amounts of TVB-N, in comparison with the EU method. Thus, 0.3 mg TVB-N/100 g sample were detected with the FIGD technique, while the steam distillation could only detect almost twenty times larger concentrations.

Precision.- Eight determinations were carried out using the same rea-



gents and apparatus. The experimental RSDs values for TVB-N were always satisfactory, according to the Horwitz's formula for intralaboratory studies. However, as registered in TMA-N determination, the semi-automatic technique showed less variability than the corresponding reference method, 0.8 and 2.1%, respectively.

**Recovery.**- Recovery rates were determined by the standard addition procedure.

Three addition levels were assayed by every method. By Cochran's test, it was verified that the method accuracy did not depend on TVB-N content. The mean recovery value was higher than 96% and no significant differences (Student's t-test) were observed between both techniques assayed. Therefore, FIGD procedures for the determination of both analytes, TMA-N and TVB-N, in pelagic fish samples, were shown to be accurate and reliable techniques, having greater precision and sensitivity than the reference methods. The simplicity of the FIGD procedure can explain the improvement of the method's precision.

In addition, the semi-automatic FIGD technique can be easily included into on-line routine analysis, due to its simplicity, rapidity and low cost, especially in comparison with the reference methods, which are tedious, cumbersome and cannot be easily automated. An additional advantage of FIGD methodology is the suitability of the same equipment to the determination of both TMA-N and TVB-N, and the small quantity of sample required to carry out the analyses.

#### *TMA-N contents and evolution during storage of E. Engraulis at different temperatures*

Contents of TMA-N in anchovy samples from different retailer market points showed an average value of  $0.73 \pm 0.04$  mg TMA-N/100 g, which is well below the levels traditionally

Figure 3. Changes in TMA-N contents of anchovy (*E. encrasicolus*) samples stored in ice, at 8-10 °C and 18-20 °C

assumed for fish rejection (from 5 to 15 mg TMA-N/100 of fish). Besides, all samples could be considered of excellent quality grade according to the classical Castell's criterion [15], as they never exceeded 1 mg TMA-N/100 g of fish. Other authors have also reported comparable low levels of TMA-N in fresh catch of other pelagic fish species [16-17].

Figure 3 shows the evolution of TMA-N throughout storage on ice, at 8-10 °C and 18-20 °C. TMA-N content showed an initial value of  $0.79 \pm 0.02$  mg/100 g and increasing gently throughout the whole period of ice storage, though keeping always below 2 mg/100 g. In spite of the slight changes observed in TMA-N of iced samples, a high correlation between TMA-N and storage time was found ( $r = 0.836$ ,  $p < 0.005$ ). Levels of TMA-N in samples stored at both 8-10°C and 18-20 °C, also showed high correlations with storage time ( $r = 0.982$ ,  $p < 0.0001$  and  $r = 0.911$ ,  $p < 0.001$ , respectively). Levels of 5 mg TMA-N/100 g were only achieved after relatively long storage periods, 48h at 8-10 °C, and 24h at 18-20 °C. In no case, levels of 15 mg TMA-N/100 g were attained.

TMA-N contents remained below 1 mg/100 g for c.a. 10 days in iced samples, c.a. 18 h in samples stored at 8-10 °C, and 6 h in samples stored at 18-20 °C. These results agree with other author's reports, which describe an induc-

tion phase in TMA-N production [2]. As it was expected, and due to its bacterial origin, increases in TMA-N were faster when samples were kept at 8-10 or 18-20 °C than in the case of ice storage. However, quite similar maximum levels were achieved when samples were stored at either 8-10 or 18-20 °C. Many psychrotrophic microorganisms (*Pseudomonas*, *Alteromonas* and *Vibrio*) are involved in TMA-N production and that could explain the relatively high production of TMA-N under refrigeration.

TMA-N production in *E. encrasicolus* was not as intense as in lean fish species, so the amounts of TMA-N traditionally used to limit fish acceptability are hardly achieved even with abusive storage temperatures. Further work is needed to establish specific TMA-N levels acceptable for anchovy consumption, which are probably lower than those reported for other fish species. The high sensitivity of the described FIGD procedure makes it suitable to determine TMA-N in anchovies, as well as in other fish species not liable to accumulate large concentrations of this compound.

#### Acknowledgements

We thank Dr. A. León from the Laboratorio Municipal de Barcelona for his valuable assistance with the FIGD methodology and Qualpoiss2 (FAIR.CT 96.3253) for financial support of this study.

#### References

- [1] S. Sadok, R. F. Uglow, S. J. Haswell., *Anal. Chim. Acta*, 334 (1996) 279-285.
- [2] H. H. Huss. *Quality and changes in fresh fish*. FAO. Roma. 1995 pp 150-152.
- [3] J. J. Connel, J. M. Shewan, "Advances in fish science and technology". Ed. Fishing News (Books), Ltd., Suney, England, 1980 pp 51.
- [4] M. C. Wekell, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74 (1991) 136-137.
- [5] CEE 95/149/CE. *Diario Oficial de las comunidades Europeas*, L97 (1995) 84-87.
- [6] W. Ludorf, V. Meyer. "El pescado y los productos de la pesca". Esaín-Escobar, J. Trad. Ed. Acribía, Zaragoza, 2ª edn., 1978. pp 282-289.
- [7] AOAC official method of analysis (1995). AOAC Official method 971.14, chapter 35, pp. 7.
- [8] W. J. Dyer. *J. Fish Res. Bd. Can.*, 6 (1945) 351-358.
- [9] R. C. Lundstrom, L.D. Racicot. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66 (1983) 1158-1163.
- [10] M. E. Krzymien, L. Elias. *J. Food Sci.*, 55 (1990) 1228-1232.
- [11] M. T. Veciana Nogués, M. S. Albalá Hurtado, M. Izquierdo Pulido, M. C. Vidal Carou. *Food Chem.*, 57 (1996) 569-573.
- [12] S. Sadok, R. F. Uglow, S. J. Haswell. *Anal. Chim. Acta*, 321 (1996) 69-74.
- [13] J. R. Botta. *Evaluation of seafood freshness quality*. VCH Publishers (UK), Ltd., 1995, pp 82.
- [14] W. Horwitz. *Anal. Chem.* 54 (1982) 67-76.
- [15] C. H. Castell, D. M. Bishop, W. E. Neal. *J. Fish Res. Bd. Can.*, 25 (1968) 921-933.
- [16] Z. Teskeredzic, K. Pfeifer. *J. Food Sci.*, 52 (1987) 1101-1102.
- [17] J. C. Wekell, H. Barnett. *J. Food Sci.*, 56 (1991) 132-135 and 138.

## 10. ANÁLISIS SENSORIAL DEL BOQUERÓN

**Pons-Sánchez-Cascado, S.; Vidal-Carou, M. C.; Nunes, M. L.; Veciana-Nogués, M. T. (2005).** Sensory analysis to assess the freshness of Mediterranean anchovies (*Engraulis encrasicolus*) stored in ice. *Food Control* (en prensa).

### 10.1. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

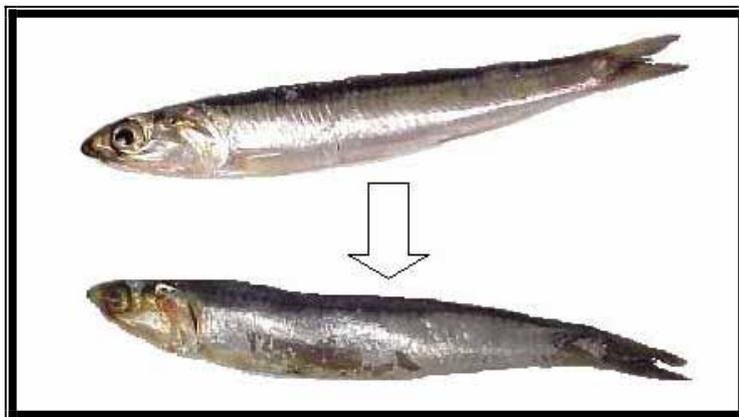
El análisis organoléptico es la técnica de análisis de la frescura del pescado habitualmente utilizada en las lonjas y empresas de procesado. En 1976, la Unión Europea propuso un esquema (CEE/103/76) que posteriormente modificó en 1996 (CEE/2406/96), para la determinación de la frescura del pescado mediante el análisis sensorial. Este esquema presenta la ventaja de la rapidez, sin embargo no es específico para ninguna especie en concreto. Tras la captura de los boquerones, las características sensoriales de éstos empiezan a cambiar rápidamente tal y como se expone a continuación.

Los primeros cambios sensoriales del boquerón durante el almacenamiento están relacionados con la apariencia general. El boquerón fresco presenta un aspecto muy brillante, con una iridiscencia azulada y una piel entera, sin rasgar. A medida que el pescado se va deteriorando, el aspecto de la piel adquiere tonalidades más apagadas (no tan brillante), la piel empieza a rasgarse y el abdomen a perforarse (Figura 10.1). Los ojos y las branquias también son indicativos del estado de frescura o deterioro en el que se encuentra el boquerón. Así, los ojos convexos con la cornea transparente y una pupila negra brillante, juntamente con las branquias de color rojo intenso serán indicativas de que el pescado lleva pocas horas almacenado en hielo (Figura 10.2). Por el contrario, los ojos cóncavos, con la cornea opaca y unas

## **Resultados y Discusión**

---

branquias descoloridas, indicarán que el boquerón está en un avanzado estado de deterioro (Figura 10.3).



**Figura 10.1.** Evolución de la apariencia general y el abdomen durante el deterioro del boquerón.

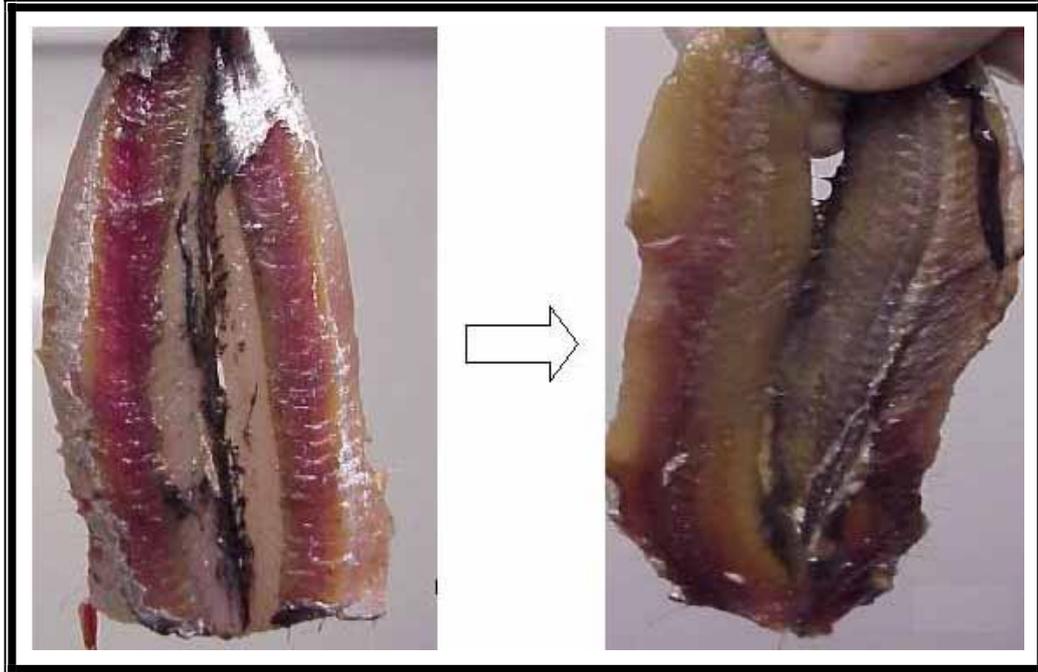


**Figura 10.2.** Ojos y branquias correspondientes a un boquerón que ha permanecido 12 horas en hielo.



**Figura 10.3.** Ojos y branquias correspondientes a un boquerón que ha permanecido 7 días en hielo.

Por último, aunque no por ello menos importante, la apariencia y color de la carne también experimenta un cambio, pasando de presentar un aspecto liso y translúcido a otro ceroso y rojizo, cuando el boquerón está deteriorado (Figura 10.4).



**Figura 10.4.** Evolución de la apariencia de la carne durante el deterioro del boquerón.

La rapidez con la que se modifican los caracteres organolépticos del boquerón lo sitúan entre aquellas especies de pescado para las cuales parece más apropiado disponer de métodos de evaluación sensorial de tipo más específico que los que actualmente contempla la legislación española y comunitaria.

Una de las alternativas actuales a los métodos de evaluación organoléptica de tipo general del pescado crudo es el Método de Índice de Calidad o Quality Index Method (QIM). Para el desarrollo de un QIM, primero deben escogerse los parámetros y atributos a evaluar, a los que posteriormente se les asigna una puntuación que generalmente va de 0 a 3. La puntuación total se obtiene dividiendo la suma de las puntuaciones de cada parámetro valorado por el máximo valor alcanzable por el esquema QIM. De este modo, el pescado con máximo grado de frescura le corresponderá una puntuación igual a 0 y al más deteriorado un máximo de 1.

Debido a que el análisis sensorial del pescado cocido refleja mejor la apreciación que del mismo pueda tener el consumidor, se planteó también el desarrollo de una tabla de análisis sensorial de este tipo específica para el boquerón. En el análisis sensorial del pescado cocido adquieren especial importancia características como el olor o el flavor del pescado y es necesario recurrir a esquemas de valoración muy distintos de los aplicables al pescado crudo. Los más utilizados son los esquemas desarrollados en la Torry Research Station (Aberdeen, Reino Unido), en los que se emplea una escala que va de una puntuación máxima de 10 (pescado fresco) a un mínimo de 3 (pescado deteriorado).

El objetivo de esta parte de trabajo fue pues desarrollar, en el marco del proyecto europeo CT97.3253, métodos sensoriales específicos para la evaluación organoléptica del boquerón crudo y cocido. Para ello se organizó un panel de catadores (8 miembros) con los que se llevaron a cabo 3 clases de sesiones: preliminares, entrenamiento y aplicación. Las muestras se prepararon tal y como está descrito en el apartado 7.1 (*Estudios de almacenamiento en hielo*) de esta memoria. Para estudiar la adecuación de los esquemas de valoración propuestos, los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos por métodos microbiológicos (determinación de bacterias mesófilas y enterobacterias) para los que la legislación española establece límites máximos de aceptación (RD 1521/1991).

## **10.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El QIM propuesto para la evaluación del boquerón crudo se basa en el propuesto por Nielsen (Botta, 1995), pero ha sido modificado con la finalidad de simplificarlo y adaptarlo mejor al boquerón del Mediterráneo. Los parámetros y atributos finalmente incluidos en el esquema propuesto (Tabla 10.1) se eligieron teniendo en cuenta el número de panelistas que detectaron un determinado cambio y el número de muestras y la intensidad en la que estos cambios eran apreciados. La puntuación total máxima asignada al esquema QIM propuesto se estableció en 23.

**Tabla 10.1.** Método de Índice de Calidad para la evaluación sensorial del boquerón crudo.

PARÁMETROS		CARACTERÍSTICAS	PUNTUACIÓN
<b>APARIENCIA GENERAL</b>	<b>Aspecto externo</b>	Muy brillante, iridiscencia azulada/violeta	0
		Menos brillante, iridiscencia no azulada	1
		Color apagado, no brillante	2
	<b>Moco</b>	Transparente, acuoso	0
		Ligeramente turbio, abundante	1
		Muy abundante (resbala), amarillo-marrón	2
	<b>Piel</b>	Entera, intacta	0
		Ligeramente pelada o fácil de pelar	1
		Rasgada y dañada	2
<b>OJOS</b>	<b>Claridad (cornea)</b>	Limpio, transparente	0
		Ligeramente turbio	1
		Opaca	2
	<b>Pupila</b>	Negro brillante	0
		Negro apagado, no tan circular	1
		Gris	2
		Gris y distorsionado	3
	<b>Forma</b>	Convexo	0
		Plano	1
		Cóncavo	2
Muy hundido		3	
<b>BRANQUIAS</b>	<b>Color</b>	Rojo brillante	0
		Rojo apagado	1
		Marrón-rojizo	2
		Decolorada	3
	<b>Olor</b>	Olor a algas	0
		Poco olor a algas, neutro	1
		Acre, rancio o dulce, metálico	2
<b>ABDOMEN</b>	<b>Post-agallas</b>	No perforado, firme	0
		Un poco perforado (<50%), blando	1
		Muy perforado, muy blando	2
<b>CARNE</b>	<b>Apariencia y color</b>	Lisa y translúcida	0
		Aspecto céreo con tonalidades rosadas	1
		Aspecto céreo, removida, más oscura y rojiza	2
<b>TOTAL</b>			<b>0-23</b>

## Resultados y Discusión

El esquema desarrollado para el análisis del boquerón cocido se basa en el esquema Torry propuesto para el arenque, adaptándolo al boquerón (Tabla 10.2).

**Tabla 10.2.** Esquema para la evaluación sensorial del boquerón cocido.

PUNTUACIÓN	OLOR	SABOR-SUCULENCIA	TEXTURA
10	Característico	Característico, muy succulento	Firme y elástica
9	Característico menos intenso	Característico, menos intenso, succulento	Poco firme y elástica
8	Característico menos intenso	Característico, menos intenso, succulento	Menos elástica
7	Neutral, ligeramente dulce	Neutral, un poco dulce	Seca
6	Dulce, afrutado	Un poco metálico, seco	Pastosa
5	A pescado	Un poco agrio, ácido o rancio	Aumento del atributo anterior
4	Olor intenso a pescado, ácido, agrio	Amargo, agrio, rancio	
3	Ácido láctico, amoniacal, rancio	Amoniacal, a sulfuro	

Los resultados obtenidos con los dos esquemas de valoración sensorial desarrollados en este trabajo mostraron una elevada correlación con el tiempo de almacenamiento ( $R^2 > 0,90$ ;  $p < 0,01$ ), hecho que demuestra su utilidad para poder establecer el tiempo remanente de vida útil del pescado. Los panelistas rechazaron el pescado entre los días 5 y 7 de almacenamiento. El día 5 coincidió con el rechazo a nivel microbiológico por parte de las enterobacterias ( $\geq 10^3$  ufc / g) y el día 7 con el de los microorganismos mesófilos ( $\geq 10^6$  ufc / g).

Con el objetivo de complementar el estudio de validez de los esquemas propuestos, se compararon los resultados con los de las enterobacterias (ya que éstos fueron los microorganismos que antes superaron el límite de aceptabilidad para el consumo del pescado). La herramienta estadística utilizada fue la denominada curva ROC (Receiver Operating Characteristic), cuya área bajo la curva fue siempre superior al mínimo de aceptabilidad para establecer este tipo de comparación (0,70%), e indicó como límites de aceptabilidad valores entre 0,43 – 0,51 para boquerón crudo y 7,1 – 6,6 para boquerón cocido.

Por último, se hizo la comparación estadística entre los límites de rechazo de las tablas sensoriales y las enterobacterias (prueba estadística del índice kappa). Los resultados obtenidos indicaron buena o muy buena concordancia en el punto de rechazo entre los métodos propuestos.

Por tanto, los esquemas propuestos son herramientas útiles para la evaluación de la frescura del boquerón almacenado en hielo. Valores superiores a 0,51 o inferiores a 7,1 (para pescado crudo y cocido, respectivamente) son indicadores del límite de aceptabilidad. Estos valores se consiguen después de 5 días de almacenamiento en hielo.

En el marco del proyecto europeo y con objeto de facilitar la diseminación de los resultados, se elaboró una ficha técnica mostrando los cambios más significativos en la apariencia del boquerón durante su almacenamiento en hielo (mediante fotografías), así como la escala propuesta para su valoración sensorial. Dicha ficha se muestra en la figura 10.5.

## Evaluación de la frescura del boquerón (*Engraulis encrasicolus*)

PARÁMETROS		CARACTERÍSTICAS	PUNTUACIÓN
APARIENCIA GENERAL	Aspecto externo	Muy brillante, iridiscencia azulada/violeta	0
		Menos brillante, iridiscencia no azul	1
		Color apagado, no brillante	2
	Moco	Transparente, acuoso	0
		Ligeramente turbio	1
		Muy abundante (resbala), amarillo-marrón	2
	Piel	Entera, intacta	0
		Ligeramente pelada o fácil de pelar	1
		Pelada	2
OJOS	Claridad (cornea)	Limpio, transparente	0
		Ligeramente turbio	1
		Opaca	2
	Pupila	Negro brillante	0
		Negro apagado, no tan circular	1
		Gris	2
		Gris y distorsionado	3
	Forma	Convexo	0
		Plano	1
		Cóncavo	2
Muy hundido		3	
BRANQUIAS	Color	Rojo brillante	0
		Rojo apagado	1
		Marrón-rojizo	2
		Decolorada	3
	Olor	Olor a algas	0
		Poco olor a algas, neutro	1
ABDOMEN	Post-agallas	No perforado, firme	0
		Un poco perforado (<50%), blando	1
		Muy perforado, muy blando	2
CARNE	Apariencia y color	Lisa y translúcida	0
		Aspecto céreo con tonalidades rosadas	1
		Aspecto céreo, removida, más oscura y rojiza	2
<b>TOTAL</b>			<b>0-23</b>

## Evolución de los principales atributos externos del boquerón (*Engraulis encrasicolus*) almacenado en hielo

### Apariencia general

- A) Apariencia muy brillante, piel intacta
- B) Apariencia menos brillante, piel ligeramente pelada
- C) Color apagado, piel rota



A) 12 horas en hielo



B) 3 días en hielo



C) 5 días en hielo

### Ojos



A) 12 horas en hielo



B) 3 días en hielo



C) 5 días en hielo

- A) Córnea transparente, pupila negra brillante, convexo
- B) Córnea ligeramente turbia, pupila negra apagada, plano
- C) Córnea opaca, pupila gris, cóncavo

### Branquias



A) 12 horas en hielo



B) 3 días en hielo



C) 5 días en hielo

- A) Rojo brillante
- B) Marrón-rojizo
- C) Decolorado

**Figura 10.5.** Ficha técnica: Cambios más significativos en la apariencia del boquerón durante su almacenamiento en hielo.



**Pons-Sánchez-Cascado, S.; Vidal-Carou, M. C.; Nunes, M. L.; Veciana-Nogués, M. T. (2005).** Sensory analysis to assess the freshness of Mediterranean anchovies (*Engraulis encrasicolus*) stored in ice. *Food Control* (en prensa).





ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Food Control xxx (2005) xxx–xxx

FOOD  
CONTROL[www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)

## Sensory analysis to assess the freshness of Mediterranean anchovies (*Engraulis encrasicolus*) stored in ice

S. Pons-Sánchez-Cascado, M.C. Vidal-Carou \*, M.L. Nunes, M.T. Veciana-Nogués

Departament de Nutrició i Bromatologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avinguda Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, Spain

Received 25 September 2004; received in revised form 22 February 2005; accepted 24 February 2005

### 8 Abstract

9 A quality index method and a sensory scheme were developed to assess raw and cooked Mediterranean anchovies (*Engraulis encrasicolus*), respectively. Fresh anchovies were stored in ice for 7 days in three trials. The changes in sensory punctuations showed 10 satisfactory correlations with time of storage. Enterobacteria were the first microorganisms that exceeded the maximum allowable 11 limit for marketable fish according to the Spanish regulations, reaching more than  $10^3$  colony former units/g after 5 days of storage. 12 Receiver operating characteristic curves of the sensory scores of raw and cooked anchovy against Enterobacteria counts were used 13 to corroborate the suitability of the schemes. Areas under the curves were satisfactory and the estimated rejection values ranged 14 from 0.43 to 0.51 and from 6.6 to 7.1 for raw and cooked anchovies, respectively. 15 © 2005 Published by Elsevier Ltd. 16

17 **Keywords:** Quality index method; Anchovies; Ice storage

### 19 1. Introduction

20 A great deal of fresh fish is marketed and consumed 21 in Spain. Two pelagic species, anchovies and sardines, 22 together with hake, account for a consumption of 23 140,000 tonnes/year (MSC, 2000).

24 The anchovy (*Engraulis encrasicolus*) is a pelagic 25 species that belongs to the *Engraulidae* family. It has a 26 very slim body with the typical coloration of pelagic fish: 27 a dark back to avoid detection by birds, and a silver 28 belly, which is confused with the appearance of the sur- 29 face of the water when observed from below. In Spain, 30 this fish is commonly consumed fresh during spring 31 and summer but marinating in vinegar and ripening in 32 saturated brines are also traditional preservation 33 methods.

After death, anchovy muscle undergoes some modifi- 34 cations and sensory characteristics change deeply. This 35 can be easily appreciated by smell, sight and touch. 36 Some of these changes are due to the high water and free 37 amino acid contents, which allow rapid bacterial 38 growth, even under refrigeration (Pedrosa-Menabrito 39 & Regenstein, 1988). 40

Traditionally, fish freshness has been evaluated by 41 sensory inspection (Anastasio, Vollano, Visciano, 42 Miranda, & Cortes, 1999). This procedure has several 43 advantages as it is fast, reliable and is a direct measure 44 of attributes such as appearance and odour (Bremner 45 & Sakaguchi, 2000). The European Union has used a 46 general scheme to grade fish freshness since the 1970s 47 (CEE, 1976). However, in 1996 a new sensory scheme 48 was introduced, but it was still non-specific for each 49 marketable species (CEE, 1996). The use of descriptive 50 analyses like the quality index method (QIM) is cur- 51 rently increasing for sensory analysis of marine products 52

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 45 08; fax: +34 93 403 59 31.

E-mail address: [mcvidal@ub.edu](mailto:mcvidal@ub.edu) (M.C. Vidal-Carou).

53 (Botta, 1995; Huidobro, Pastor, López-Caballero, &  
54 Tejada, 2001).

55 The QIM is a systematic procedure that allows rapid  
56 and easy evaluation of the attributes of raw fish during  
57 storage. This technique takes into account all the char-  
58 acteristics of traditional sensory methods; it is relatively  
59 fast, and based only on direct observations of fish attri-  
60 butes. In addition, it is more precise and specific than  
61 other methods since it is developed specifically for each  
62 species. A demerit score, which ranges generally from 0  
63 to 3, is applied to each attribute or character. A global  
64 sensory score is obtained by dividing the sum of the de-  
65 merit scores assigned to each attribute by the sum of  
66 maximum score of each attribute. In other fish species,  
67 changes in QIM values highly correlates with time of  
68 storage in ice and can be used to predict their remaining  
69 storage time in ice (Alasalvar, Taylor, Öksüz, Shahidi, &  
70 Alexis, 2002; Lougovois, Kyranas, & Kyranas, 2003). To  
71 evaluate the freshness of a specific species, the paramet-  
72 ers and characters must be defined for the descriptive  
73 analysis. A precise description of these parameters and  
74 characteristics is required and those that are truly the  
75 most critical must be determined (Besteiro, Rodríguez,  
76 Tilve-Jar, & Pascual, 1996). However, once characters  
77 and descriptors have been defined, the QIM is a reliable  
78 sensory tool for assessing fish freshness (Botta, 1995).

79 Sensory analysis of cooked fish is also necessary be-  
80 cause some characters, such as odour and flavour, which  
81 contribute to fresh fish assessment, are modified or even  
82 lost during cooking. Moreover, this type of analysis may  
83 be more representative of consumers' appreciation. The  
84 usefulness of sensory analysis of raw and cooked fish has  
85 been reported for several fish species (Regenstein &  
86 Regenstein, 1991). Thus, Lougovois et al. (2003) pro-  
87 posed the assessment of cooked fish flavour as the  
88 underlying basis for establishing the fish quality and  
89 the QIM as an effective method for routine freshness  
90 evaluation. The most common methods for freshness  
91 evaluation of cooked fish are probably the Torry  
92 schemes (Regenstein and Regenstein, 1991; Torry *advi-  
93 sory note No. 91*). These use a scale from 10 (fresh fish)  
94 to 3 (putrid or spoiled fish). Odour and taste follow a de-  
95 fined guideline throughout fish spoilage. However, spe-  
96 cies differ, particularly in the first stages of loss of  
97 freshness (Ranken, 1993). Therefore, a specific sensory  
98 analysis scheme for each fish species or similar groups  
99 could be also useful to study loss of freshness in cooked  
100 fish.

101 Establishing the rejection point is not easy in some  
102 cases, even by using sensory analysis. Consequently, sev-  
103 eral alternative methods have been developed (Connell,  
104 1995; Morales et al., 1996). Thus, the current European  
105 and Spanish regulations on fish state that when the re-  
106 sults of sensory analysis are not definitive, either micro-  
107 bial or chemical analyses can be used as complementary  
108 methods (CEE, 1991; MSC, 1993).

In the framework of the European project  
CT97.3253, sensory methods were evaluated to assess  
the freshness of raw and cooked Mediterranean ancho-  
vies stored in ice. In accordance with legislation, counts  
of total mesophilic bacteria and, enterobacteria  
throughout ice storage of anchovies were also moni-  
tored to study the suitability of the schemes proposed  
and to choose the rejection point. In addition, the poten-  
tial use of psychrotrophic bacteria counts was also as-  
sessed since the growth of these microorganisms could  
be favoured by storage in ice.

## 2. Materials and methods 120

### 2.1. Storage conditions and sampling 121

Three trials were carried out in May, June and July.  
Fresh anchovies (*E. encrasicolus*) from the Mediterra-  
nean coast were obtained from a fish market in Barce-  
lona and stored in flake ice (0 °C) in a refrigerator at  
4 °C. Fish were placed in a self-draining box, and the  
melted ice was replaced daily. Individual anchovies  
had an average weight of approximately 20 g and an  
average length of 13.5–15 cm. Anchovies were sampled  
immediately after being caught and after 2, 5, and 7 days  
of storage. At each sampling time, 25 anchovies were  
randomly chosen for sensory and microbiological  
analysis.

### 2.2. Sensory evaluation 134

A team of 8 panel members trained in fish freshness  
assessment developed the schemes proposed for raw  
and cooked anchovies. The design of these schemes in-  
volved preliminary, training and trial sessions. In the  
preliminary sessions, available evaluation methods and  
their modifications were discussed together with the  
choice of the parameters to be included in the schemes  
and the specific words to be used as descriptors. The  
training sessions were established to familiarize the  
panel members with the new schemes. Finally, the  
schemes were validated in the 3 trial sessions.

For each sampling point, recently caught anchovies  
were used as reference samples for sensory analysis. Sen-  
sory evaluation of raw anchovies was performed follow-  
ing the QIM developed in this study. This method was  
mainly based on the freshness quality grading system  
for anchovy proposed by Nielsen (Botta, 1995). The  
scoring system used was the ratio between the QIM  
score and the total score that can be achieved. There-  
fore, for the anchovy QIM, the quality index (QI) was  
calculated as follows:

$$109 \quad QI = SS/23, \quad 157$$

158 where SS is the overall sensory score from the sum of the  
159 demerit points of each character assessed, and 23 is the  
160 maximum achievable score for the QIM proposed.  
161 Thus, the QI for raw anchovy ranged from 0 (top qual-  
162 ity) to 1.

163 For the sensory analysis of cooked anchovy, a new  
164 scheme based on the Torry sensory scheme for herring  
165 (Regenstein & Regenstein, 1991) was used. The words  
166 used as descriptors better described the changes in  
167 odour, taste-succulence and texture observed in the an-  
168 chovy samples stored in ice. Beheaded and gutted  
169 anchovies were placed in a recipient, without water or  
170 any other ingredient, and covered with a perforated  
171 plastic film. They were then cooked in a microwave  
172 (150 W, 1 min) and offered to the panel members im-  
173 mediately after cooking.

### 174 2.3. Microbiological analysis

175 Mesophilic and psychrotrophic microorganisms were  
176 enumerated on plate count agar (PCA, Oxoid, Unipath  
177 Ltd. Basingstoke, Hampshire, UK) at 32 °C and 20 °C,  
178 respectively, for 72 h, and enterobacteria on violet red  
179 bile agar (VRBG, oxoid) incubated with a double layer  
180 at 37 °C for 24 h (Pascual-Anderson & Calderón-Pasc-  
181 ual, 2000).

### 182 2.4. Statistical analysis

183 Statistical analysis of data was performed using SPSS  
184 11.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL) software.

## 185 3. Results and discussion

186 Nielsen's original proposal for anchovy freshness  
187 evaluation (Botta, 1995) was modified in search of a sim-  
188 pler scheme. The QIM scheme for raw anchovy pro-  
189 posed here was based on the external examination of  
190 the general appearance, eyes, gills, abdomen and inter-  
191 nal examination of the flesh (Table 1). The scheme for  
192 Mediterranean *E. encrasicholus* was adapted taking into  
193 account the frequency of the characters or attributes.  
194 This means the number of panellists who were able to  
195 detect changes in each attribute, the number of samples  
196 in which changes were detected, and its intensity as no-  
197 ticed by the trained panel members.

198 By comparison with Nielsen's original scheme, the  
199 main modifications were: (a) *General appearance* of the  
200 flesh firmness was eliminated because it did not show a  
201 regular evolution throughout ice storage. When anchovy  
202 is fresh, the flesh is firm and hard, and then it softens,  
203 and finally becomes hard again as deterioration pro-  
204 gresses. In contrast, the slime and skin were added as  
205 new characters because both showed a clear evolution  
206 during the storage, from transparent to yellowish and

from complete to torn, respectively. (b) In *gills*, bloodi- 207  
ness in cover was eliminated. Although an increase in 208  
blood during storage was expected, this increase was 209  
never observed, even after long storage time, probably 210  
due to a "washing effect" of melted ice. Slime of gills 211  
was also eliminated because it is observed only at very 212  
advanced stages of spoilage. (c) The character *backbone* 213  
included in Nielsen's table was removed since some con- 214  
tradictions were found. At the beginning of the storage, 215  
the spinal column was adherent or it came apart at ran- 216  
dom depending on the sample. The same occurred when 217  
anchovies were spoiled. (d) In *flesh*, evolution of appear- 218  
ance and colour was maintained as an attribute in the 219  
scheme since it showed a very clear evolution through- 220  
out storage, but descriptors were modified. 221

222 A new sensory analysis scheme for cooked *E. encras-*  
*icholus* is proposed. It is based on the sensory assessment 223  
score of the Torry scheme for cooked herring (Table 2). 224  
The Torry scoresheet for cooked herring evaluates the 225  
odour and the flavour of brown and white flesh. How- 226  
ever, these descriptors were not taken into account for 227  
anchovies because the differences between flesh samples 228  
could not be appreciated. In the proposed scheme, the 229  
parameters evaluated were odour (for anchovy), taste- 230  
succulence and texture. 231

232 To validate the two schemes, three trials were per- 233  
formed with anchovies stored in ice. The sensory scores 234  
for raw and cooked anchovy showed a high correlation 235  
with time of storage in all trials ( $R^2 = 0.987$ ,  $p < 0.01$ ) 236  
for raw anchovies and  $R^2 = 0.928$ ,  $p < 0.01$  for cooked 237  
ones (Figs. 1 and 2). In both raw and cooked sensory 238  
analysis the slope of each trial was within the confidence 239  
interval of the other trials. Therefore, the results among 240  
trials were comparable.

241 Statistical correlation between days of storage and  
242 demerit points of the sensory attributes of raw anchovy  
243 and days of storage was found (Table 3). One of the  
244 main problems during anchovy storage is belly bursting  
245 caused by rapid autolytic degradation of the abdominal  
246 tissue (Hernández-Herrero, Roig-Sagués, López-Saba-  
247 ter, Rodríguez-Jerez, & Mora-Ventura, 2002). These re-  
248 sults showed a good statistical correlation between this  
249 parameter and the time of storage, with a correlation  
250 coefficient similar to other parameters, such as gills. Be-  
251 cause of the good correlation, this parameter was in-  
252 cluded in the QIM.

253 Scores of odour, taste-succulence and texture of  
254 cooked fish showed a statistically significant decrease  
255 between the characters and time of storage in ice (Table  
256 3). Odour was the attribute that better correlated with  
257 time of storage and showing the higher significance  
258 level.

259 In the three trials initial microbial counts for meso-  
260 philic and psychrotrophic bacteria ranged from  $10^3$  to  
261  $10^4$  colony formed units (cfu)/g, which is consistent with  
262 other studies (Fuselli, Casales, Fritz, & Yeannes, 1994;

Table 1  
Quality index method for raw anchovy (*E. encrasicolus*)

Parameter Character	Descriptor	Demerit points
<i>General appearance</i>		
☞ Surface appearance	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Very bright, iridescence bluish-violet</li> <li>• Less bright, iridescence not bluish</li> <li>• Slightly dull, not bright</li> </ul>	0 1 2
☞ Slime	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transparent watery mucus</li> <li>• Slightly cloudy mucus, abundant</li> <li>• Plentiful (slippery), yellowish-brownish mucus</li> </ul>	0 1 2
☞ Skin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intact</li> <li>• Slightly broken or easy to break</li> <li>• Torn and damaged</li> </ul>	0 1 2
<i>Eyes</i>		
☞ Clarity (cornea)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Clear, transparent</li> <li>• Slightly cloudy</li> <li>• Opaque</li> </ul>	0 1 2
☞ Pupil	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bright black</li> <li>• Dull black, not so circular</li> <li>• Grey</li> <li>• Grey and distorted</li> </ul>	0 1 2 3
☞ Shape	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Convex</li> <li>• Flat</li> <li>• Concave</li> <li>• Sunken</li> </ul>	0 1 2 3
<i>Gills</i>		
☞ Colour	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bright red</li> <li>• Dull-red</li> <li>• Brownish-red</li> <li>• Discoloured</li> </ul>	0 1 2 3
☞ Smell	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Seaweedly</li> <li>• Slightly seaweedly, neutral</li> <li>• Slightly acrid, rancid or sweet, metallic</li> </ul>	0 1 2
<i>Abdomen</i>		
☞ Postgill (belly-burst)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Firm</li> <li>• Burst (&lt;50%), and soft</li> <li>• Bursts, very soft</li> </ul>	0 1 2
<i>Flesh</i>		
☞ Appearance and colour	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Velvety, translucent</li> <li>• Waxy pink</li> <li>• Wax-like matt, dark red colour</li> </ul>	0 1 2
Range of score		0–23

Table 2  
Sensory assessment score for cooked anchovy

Score	Odour	Taste-succulence	Texture
10	Characteristic of cooked anchovy	Characteristic of cooked anchovy, very succulent	Firm and elastic
9	Characteristic, less strong	Characteristic, less strong, succulent	Slightly firm and elastic
8	Characteristic, less strong	Characteristic, less strong, succulent	Less elastic
7	Neutral, slightly sweet	Neutral, slightly sweet	Dry
6	Sweet, fruity	Slightly metallic, dry	Pasty
5	Fishy	Slightly sour, acrid or rancid	Increasing of anterior attribute
4	Very fishy, acrid, sour	Bitter, sour, rancid	
3	Lactic acid, ammoniac, rancid	Ammoniac, to sulphides	

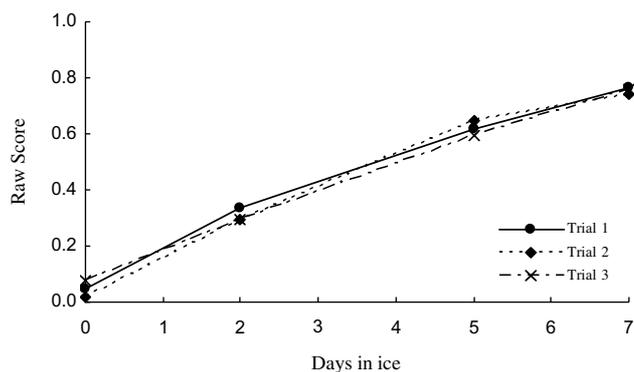


Fig. 1. Changes in raw sensory scores versus time of anchovy storage in ice.

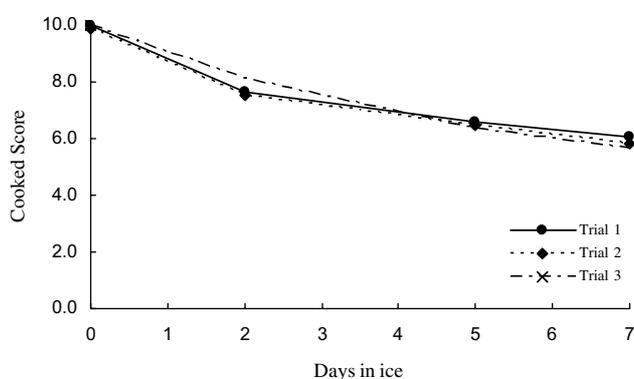


Fig. 2. Changes in cooked sensory scores versus time of anchovy storage in ice.

Table 3

Correlation results between each sensory parameter and time of anchovies stored in ice

Parameters	$r^a$	$R^{2b}$	$P^c$
<i>Raw fish</i>			
General appearance	0.999	0.998	0.001
Eyes	0.995	0.991	0.005
Gills	0.977	0.954	0.023
Abdomen	0.983	0.967	0.017
Flesh	0.984	0.969	0.015
<i>Cooked fish</i>			
Odour	0.996	0.991	0.004
Taste-succulence	0.958	0.918	0.042
Texture	0.953	0.908	0.047

<sup>a</sup> Regression coefficient.

<sup>b</sup> Determination coefficient.

<sup>c</sup> Signification level.

263 Pérez-Villareal & Pozo, 1992). Enterobacteria counts  
 264 showed initial counts of  $2.45 \times 10^2 \pm 0.14 \times 10^1$  cfu/g,  
 265 which were in agreement with those reported for fresh  
 266 anchovies (Hernández-Herrero, Roig-Sagués, López-  
 267 Sabater, Rodríguez-Jerez, & Mora-Ventura, 1999).  
 268 Spanish regulations state that the total aerobic meso-

philic bacteria in fresh fish should not exceed  $10^6$  cfu/g, 269  
 but for selective groups, such as *Enterobacteriaceae* 270  
*sp.*, lower counts have been established,  $10^3$  cfu/g being 271  
 the maximum limit allowed (Swets, 1988). Maximum 272  
 allowable levels of enterobacteria and aerobic meso- 273  
 philic bacteria were reached after 5 and 7 days of storage, 274  
 respectively. Therefore, the maximum time of 275  
 anchovy storage in ice for its consumption was 5 days. 276  
 Although the growth of psychrotrophic bacteria could 277  
 be favoured by storage in ice, their counts were similar 278  
 to those of mesophilic ones, reaching levels of  $10^6$  cfu / 279  
 g after 7 days of storage. In addition, most of the panel- 280  
 list rejected the fish by sensory analysis of both raw and 281  
 cooked fish after 5–7 days of storage. 282

A receiver operating characteristic (ROC) curve was 283  
 applied to evaluate the suitability of the two sensory 284  
 schemes against enterobacteria. This curve is used to as- 285  
 sess the quality of the discriminatory power of a test 286  
 using sensitivity and specificity data. Moreover, it can 287  
 be used to select an optimum decision threshold. The 288  
 values of the Area Under the Curve (AUC) calculated 289  
 for QIM and for cooked schemes were 0.94 and 0.79, 290  
 respectively. These AUC values are indicators of the 291  
 suitability of the schemes (Swets, 1988). The ROC anal- 292  
 ysis showed values ranging from 0.43 to 0.51 for QIM 293  
 and from 6.6 to 7.1 for the assessment of cooked anchov- 294  
 ies as limits of fish acceptability. These values are pro- 295  
 posed as threshold since their sensitivity and specificity 296  
 were always higher than 0.75 (Burgueño, García-Bastos, 297  
 & González-Buitrago, 1995). 298

The statistical Kappa index (Doménech-Massons, 299  
 2000) was used to check the degree of agreement of 300  
 the rejection point between the two sensory methods. 301  
 To obtain this index, the rejection point score of each 302  
 panel member was placed in a  $2 \times 2$  table of paired data. 303  
 A Kappa index of 1 means perfect agreement and a value 304  
 of 0 implies that the measures differ. These results 305  
 showed Kappa values that ranged from 0.676 to 0.833, 306  
 indicating a good–very good concordance level of the 307  
 rejection points established by the two methods. 308

#### 4. Conclusions 309

The schemes used for raw and cooked anchovy are 310  
 reliable tools with which to assess the freshness of this 311  
 fish when stored in ice. The values over 0.51 for raw 312  
 and under 7.1 for cooked anchovy, respectively, are 313  
 indicators of limit of acceptability. These levels are 314  
 reached after 5 days of storage in ice. 315

#### 5. Uncited reference 316

MSC (1991). 317

318 **Acknowledgment**

319 This research was supported by the Comissió Interde-  
320 partamental de Recerca i Innovació Tecnològica (CIR-  
321 IT, 2001 SGR 00132) of the Generalitat de Catalunya  
322 and the European project Qualpoiss2 (FAIR.CT  
323 97.3253). S. Pons-Sánchez-Cascado was recipient of a  
324 pre-doctoral grand awarded by the Comissió Interde-  
325 partamental de Recerca i Innovació Tecnològica (CIR-  
326 IT) of the Generalitat de Catalunya (Spain).

327 **References**

- 328 Alasalvar, C., Taylor, K. D. A., Öksüz, A., Shahidi, F., & Alexis, M.  
329 (2002). Comparison of freshness quality of cultured and wild Sea  
330 Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Food Science*, 67(9),  
331 3220–3226.
- 332 Anastasio, A., Vollano, L., Visciano, P., Miranda, E., & Cortes, M. L.  
333 (1999). Correlations between pH, total volatile basic nitrogen,  
334 trimethylamine and sensory evaluation in fresh fish slices. *Archiv*  
335 *für Lebensmittelhygiene*, 50(3), 63–66.
- 336 Besteiro, I., Rodríguez, C. J., Tilve-Jar, C., & Pascual, C. (1996).  
337 Descriptive sensory analysis of anchovies. *Alimentaria*, 274, 73–79.
- 338 Botta, J. R. (1995). *Evaluation of seafood freshness quality*. New York:  
339 VCH Publishers.
- 340 Bremner, H. A., & Sakaguchi, M. (2000). A critical look at whether  
341 “freshness” can be determined. *Journal of Aquatic Food Product*  
342 *Technology*, 9(3), 5–25.
- 343 Burgueño, M. J., García-Bastos, J. L., & González-Buitrago, J. M.  
344 (1995). Las curvas ROC en la evaluación de pruebas diagnósticas.  
345 *Medicina Clínica*, 104, 661–670.
- 346 Connell, J. J. (1995). *Control of fish quality*. Oxford: Fishing New  
347 Books.
- 348 Consejo de la Comunidad Económica Europea (CEE) (1976). Regla-  
349 mento CEE/103/76. Normas comunes de comercialización de  
350 productos de la pesca. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*,  
351 L30, 29.
- 352 Consejo de la Comunidad Económica Europea (CEE) (1991). Direc-  
353 tiva 91/493/CEE, de 22 de julio de 1991, por la que se fijan las  
354 normas sanitarias aplicables a la producción y a la puesta en el  
355 mercado de los productos pesqueros. *Diario Oficial de la Comuni-*  
356 *dades Europeas*, L 268, 15–34.
- 357 Consejo de la Comunidad Económica Europea (CEE) (1996). Regla-  
358 mento CEE/2406/96. Fijación de normas comunes de comer-  
359 cialización de productos de la pesca. *Diario Oficial de las*  
360 *Comunidades Europeas*, L334, 1229.
- 361 Doménech-Massons, J. M. (2000). Medida de cambio: Análisis de  
362 diseños con medidas intrasujeto. Signo SA, Barcelona.
- 363 Fuselli, S. R., Casales, M. R., Fritz, R., & Yeannes, M. I. (1994).  
364 Microbiology of the marination process used in anchovy (*Engraulis*  
*anchoita*) production. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*,  
27(3), 214–218.
- Hernández-Herrero, M. M., Roig-Sagués, A. X., López-Sabater, E. I.,  
Rodríguez-Jerez, J. J., & Mora-Ventura, M. T. (1999). Total  
volatile basic nitrogen and other physico-chemical and microbio-  
logical characteristics as related to ripening of salted anchovies.  
*Journal of Food Science*, 64(2), 344–347.
- Hernández-Herrero, M. M., Roig-Sagués, A. X., López-Sabater, E. I.,  
Rodríguez-Jerez, J. J., & Mora-Ventura, M. T. (2002). Influence of  
raw fish quality on some physicochemical and microbiological  
characteristics as related to ripening of salted anchovies (*Engraulis*  
*encrasicolus* L.). *Journal of Food Science*, 67(7), 2631–2640.
- Huidobro, A., Pastor, A., López-Caballero, M. E., & Tejada, M.  
(2001). Washing effect on the quality index method (QIM)  
developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *European*  
*Food Research and Technology*, 212(4), 408–412.
- Lougois, V. P., Kyranas, E. R., & Kyranas, V. R. (2003). Compar-  
ison of selected methods of assessing freshness quality and  
remaining storage life of iced gilthead sea bream (*Sparus aurata*).  
*Food Research International*, 36(6), 551–560.
- Ministerio de Sanidad y Consumo MSC (1991). Orden del 2 de agosto  
de 1991 por la que se aprueban las normas microbiológicas, los  
límites de contenido en metales pesados y los métodos analíticos  
para la determinación de metales pesados para los productos de la  
pesca y de la acuicultura. *Boletín Oficial del Estado*, 195,  
27513–27515.
- Ministerio de Sanidad y Consumo MSC (1993). Real Decreto 1437/  
1992 por el que se aprueban la Normas sanitarias aplicables a la  
producción y comercialización de los productos pesqueros y de la  
acuicultura. *Boletín Oficial del Estado*, 11, 808–820.
- Ministerio de Salud y Consumo (2000). La alimentación en España en  
1999. Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación, Madrid.
- Morales, P., Haza, A. I., Ikken, Y., Martínez, A., Sanz, B., &  
Hernández, P. E. (1996). Freshness and quality of fish: Inspection  
and evaluation. II. Evaluation methods. *Alimentación Equipos y*  
*Tecnología*, 15, 139–147.
- Pascual-Anderson, M. R., & Calderón-Pascual, V. (2000). Microbio-  
logía alimentaria, Metodología para alimentos y bebidas 2ª  
edición. Díaz de Santos SA, Madrid.
- Pedrosa-Menabrito, A., & Regenstein, J. M. (1988). Shelf-life exten-  
sion of fresh fish—a review. Part I—Spoilage of fish. *Journal of*  
*Food Quality*, 11(2), 117–127.
- Pérez-Villareal, B., & Pozo, R. (1992). Ripening of the salted anchovy  
(*Engraulis anchoita*): Study of the sensory, biochemical and  
microbiological aspects. In H. H. Huss (Ed.), *Quality assurance*  
*in the fish industry* (pp. 157–167). Elsevier Science Publishers BV.
- Ranken, M. D. (1993). *Manual de industrias de los alimentos*. Acribia  
SA, Zaragoza.
- Regenstein, J. M., & Regenstein, C. E. (1991). *Introduction to fish*  
*technology*. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Swets, J. A. (1988). Measuring the accuracy of diagnostic systems.  
*Science*, 240, 1285–1293.
- Torry advisory note No. 91 (1989). Aberdeen: Torry Research Station  
and Ministry of Agriculture and Fisheries MAFF.

## **11. AMINAS VOLÁTILES Y BIÓGENAS COMO INDICADORES DE FRESCURA Y/O DETERIORO DEL BOQUERÓN CONSERVADO EN HIELO**

**Pons-Sánchez-Cascado, S.; Veciana-Nogués, M. T.; Bover-Cid, S.; Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, M. C.** Use of volatile and non-volatile amines to evaluate the freshness of anchovies stored in ice. *J Sci Food Agric (en prensa)*.

### **11.1. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO**

Para la determinación de la frescura del pescado, la legislación europea y española recomienda recurrir a determinaciones químicas y microbiológicas cuando existan dudas en el análisis sensorial (CEE/493/91; MSC, 1992).

Algunos autores han propuesto el uso del N-TMA y del N-BVT como índices de frescura debido a su buena correlación con el análisis organoléptico (Civera, 1993). Sin embargo, algunas aminas biógenas también podrían ser útiles para este mismo fin, ya que no se encuentran o están presentes en cantidades muy pequeñas en pescado fresco, mientras que su contenido aumenta durante el almacenamiento del pescado a temperaturas abusivas, pero también en refrigeración o hielo.

Para la monitorización de los niveles de aminas (volátiles y no volátiles), se llevaron a cabo tres estudios, coincidiendo todos ellos con la temporada de captura del boquerón. El pescado se mantuvo en hielo, ya que ésta es la forma más habitual de conservación, tanto para su consumo directo como para su uso como materia prima de derivados. Con el fin de establecer niveles máximos de aminas biógenas tolerables en boquerón apto para el consumo

humano, los contenidos de estos compuestos se compararon con recuentos de bacterias mesófilas totales y enterobacterias, cuyo valor máximo de aceptabilidad está legislado (MSC, 1991). En el caso de las aminas biógenas, actualmente sólo existen límites máximos legislados para la histamina, pero teniendo en cuenta el papel potenciador sobre sus efectos indeseables que ejercen otras aminas biógenas como la putrescina, la cadaverina y la tiramina, cada vez está más extendida la recomendación de la determinación de estas últimas junto con la de la histamina (FDA, 1995). Para profundizar en el estudio de la génesis de las aminas biógenas en el boquerón almacenado en hielo, también se analizó la relación entre aminas y recuentos de diferentes grupos bacterianos, potenciales productores de éstas.

### **11.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La legislación establece como límites de aceptabilidad para el pescado, valores de  $10^3$  ufc/g y  $10^6$  ufc/g para las enterobacterias y las bacterias mesófilas respectivamente. Estos recuentos fueron alcanzados después de 5 y 7 días de almacenamiento del boquerón en hielo. Por tanto, legalmente el período de vida útil de los boquerones quedaría establecido en 5 días.

Los niveles encontrados de N-TMA fueron muy inferiores a aquellos habitualmente considerados para el rechazo del pescado ( $<1$  mg N-TMA/100 g de pescado hasta los 12 días de almacenamiento). Este resultado podía ser esperado ya que los peces pelágicos contienen niveles muy bajos de OTMA y además durante las dos primeras semanas de almacenamiento, los valores de pH estuvieron alejados de 7,2 – 7,4, valores considerados como óptimos para su reducción bacteriana (Soudan, 1965). Los valores de N-BVT se mantuvieron constantes durante las dos primeras semanas de los estudios, no mostrando ninguna correlación con el tiempo de almacenamiento. Por tanto, no son válidos los niveles de N-TMA ni de N-BVT como índices de frescura.

Los contenidos de aminas biógenas, cadaverina, putrescina y tiramina mostraron incrementos significativos a lo largo del almacenamiento en hielo (Figura 11.1). La histamina, mostró un incremento muy inferior y más tardío (a partir del día 9). De hecho, la formación de histamina durante el almacenamiento del pescado azul, si bien ha sido ampliamente reportada en el pasado, en la mayoría de casos se trata de estudios en los que el pescado se

almacenó a temperaturas superiores (Ababouch y col., 1996, López-Sabater y col., 1996, Veciana-Nogués y col., 1996).

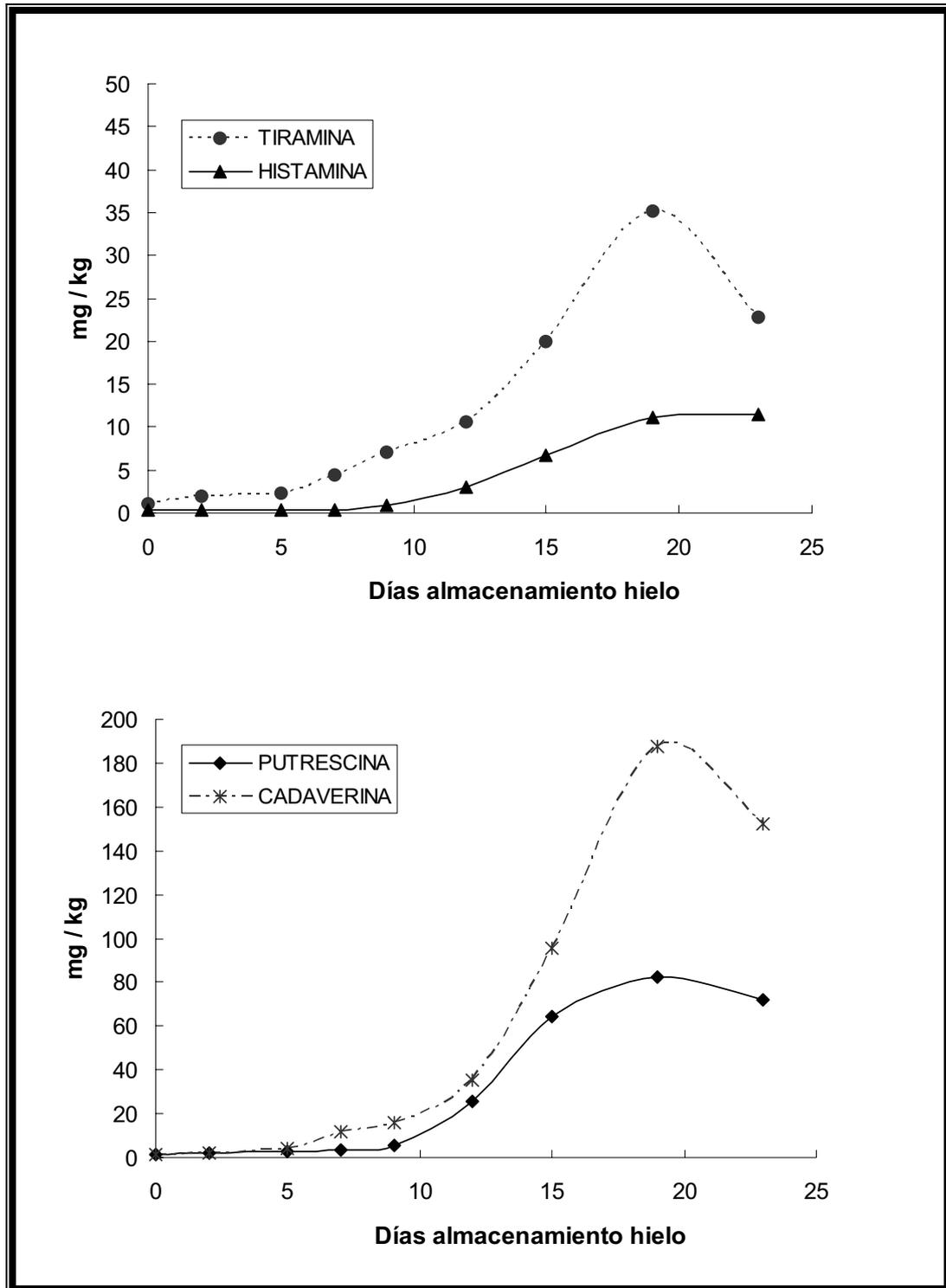


Figura 11.1. Evolución de la histamina, tiramina, putrescina y cadaverina durante el almacenamiento del boquerón en hielo.

De acuerdo con su origen microbiano, todas las aminas (volátiles y no volátiles) se correlacionaron con los recuentos de los grupos bacterianos estudiados, si bien se obtuvieron mejores correlaciones con las aminas biógenas que con los compuestos nitrogenados volátiles. Igualmente, cabe destacar que en general las correlaciones entre aminas biógenas y recuentos de microorganismos mesófilos o psicrófilos fueron mejores que las obtenidas con recuentos más específicos de microorganismos, incrementando la significación de estas últimas cuando el estudio de correlación se establecía por separado para cada uno de los tres ensayos efectuados. Así, tomando los estudios por separado se obtuvo una  $r > 0,98$  entre enterobacterias e histamina o una  $r > 0,96$  entre las bacterias del ácido láctico y la tiramina.

Debido a que la histamina, única amina biógena con límites legislados, presentó un tardío aumento y siempre en cantidades inferiores a la tiramina, putrescina o cadaverina, se propuso un índice de calidad que tuviera en cuenta las 4 aminas y no sólo la histamina:

$$\text{IAB} = \text{Histamina} + \text{Tiramina} + \text{Putrescina} + \text{Cadaverina}$$

Este índice de aminas biógenas (IAB) había sido propuesto con anterioridad por Veciana-Nogués y col. (1997) para el atún. Sin embargo, el valor propuesto como límite de aceptabilidad resultaba demasiado elevado para los boquerones.

Para comprobar la utilidad del IAB anterior como índice de frescura de los boquerones almacenados en hielo, se comparó éste con diferentes criterios previamente descritos: límite de histamina propuesto por la FDA y la Unión Europea, nivel de cadaverina (Yamanaka y col., 1991), la suma de cadaverina + putrescina (Stede y Stoeckmer, 1986) y el índice de calidad más complejo propuesto por Mietz y Karmas (1977). Con todos estos índices se construyeron curvas ROC. Los valores de referencia fueron los recuentos de enterobacterias ya que éstos fueron los primeros microorganismos en superar el límite legal de aceptabilidad. De todos ellos, el que presentó una mayor Área Bajo la Curva y por lo tanto una mayor precisión, fue el de Veciana-Nogués y col. (1997), siendo el valor de esta área de 0,925. En base a los valores de sensibilidad y especificidad para cada punto, y siguiendo el criterio de Burgueño (1995) que considera valores de sensibilidad y especificidad iguales o superiores a 0,75 para que los límites sean aceptables, se estableció en 15 ppm el límite de aceptabilidad del boquerón mantenido en hielo según el IAB propuesto.

**Pons-Sánchez-Cascado, S.; Veciana-Nogués, M. T.; Bover-Cid, S.; Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, M. C.** Use of volatile and non-volatile amines to evaluate the freshness of anchovies stored in ice. *J Sci Food Agric* (en prensa).



----- Original Message -----

From: [patrick.walter@soci.org](mailto:patrick.walter@soci.org)

To: [mcvidal@ub.edu](mailto:mcvidal@ub.edu)

Sent: Friday, June 03, 2005 12:57 PM

Subject: Final acceptance letter

RE: JSFA-04-0626.R2 - Use of volatile and non-volatile amines to evaluate the freshness of anchovies stored in ice

Dear Dr. M. Carmen:

The Editor is pleased to inform you that your paper has been accepted for publication in the Journal of the Science of Food and Agriculture. Please inform your co-authors.

Please post a printed signed copyright transfer agreement to me at the following address:

Journal of the Science of Food and Agriculture  
Society of Chemical Industry  
Publications Department  
14/15 Belgrave Square  
London  
SW1X 8PS

A proof will be sent to you in due course. If you have any further queries about its status, please contact Anne Shardlow by email [ashardlo@wiley.co.uk](mailto:ashardlo@wiley.co.uk) or by fax on +44 (0) 1243 770379.

Please feel free to contact me if you have any questions about this process. A Copyright Transfer Agreement can be downloaded from the Manuscript Central site <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/jabout/1294/ForAuthors.html>.

Thank you for your support. I look forward to seeing more of your work in the future.

Yours sincerely,

Patrick Walter

Editorial Assistant

T: +44 (0)20 7598 1553

F: +44 (0)20 7235 0887

E: [patrick.walter@soci.org](mailto:patrick.walter@soci.org)



## **Use of volatile and non-volatile amines to evaluate the freshness of anchovies stored in ice**

Sofía Pons-Sánchez-Cascado, M. Teresa Veciana-Nogués, Sara Bover-Cid, Abel Mariné-Font, M.Carmen Vidal-Carou\*

### **ABSTRACT**

Amounts of volatile and biogenic amines, pH and microbial counts were monitored in Mediterranean anchovy (*Engraulis encrasicolus*) over 23 days of ice storage with the aim of examining their suitability as indicators of freshness.

Counts of *Enterobacteriaceae* reached the maximum limits stipulated by Spanish regulations after 5 days of storage in ice, whilst those of mesophilic bacteria took 7 days. Levels of volatile amines hardly increased during ice storage. Amounts of biogenic amines did increase, though there were differences from one amine to the other. Cadaverine the most abundant biogenic amine showing the earliest increase, coinciding with the shelf-life time as determined through *Enterobacteriaceae* counts. Amounts of histamine remained below the maximum levels established by both European Union and Food and Drug Administration regulations. Other biogenic amines were found at much higher levels than histamine. Results demonstrated the suitability of the biogenic amine index (as the sum of Histamine + Tyramine + Putrescine + Cadaverine) as a freshness indicator for anchovies stored in ice, with a limit of acceptability set at 15 mg·kg<sup>-1</sup>.

**Key words:** Anchovy; freshness; trimethylamine; biogenic amines; microbial counts.

---

Departament de Nutrició i Bromatologia. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.  
Av. Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, SPAIN.

\* Corresponding autor. Tel.: +34 93 402 45 13; Fax: 34 93 403 59 31

*E-mail address:* mcvidal@ub.edu

### INTRODUCTION

Anchovy (*Engraulis encrasicolus*) is a pelagic fish belonging to the *Engraulidae* family. The catching season is from April to September, during the most intensive feeding period and just before spawning. A portion of the catch is consumed fresh, whilst the rest is used as a raw material for derivatives in fish factories. Freshness is, of course, a primary concern for these factories. The loss of freshness depends not only on the qualitative and quantitative composition of the fish microflora, but also on intrinsic factors such as species, size and fat content. The small size of anchovy makes it particularly susceptible to belly bursting often produced by autolytical breakdown.<sup>1</sup> Likewise, the storage conditions can also have an influence not only because of the temperature but also the different ways of chilling (ice, chilled seawater, mixture of ice and water...)<sup>2</sup>

European Union and Spanish regulations require a sensory analysis to establish fish quality, with both microbiological and chemical analyses called upon when sensory results are doubtful.<sup>3,4</sup> In line with this, several authors have put forward different chemical freshness indicators as objective tools to be used when sensory evaluation is uncertain.

The volatile amines trimethylamine (TMA-N) and total volatile basic nitrogen (TVB-N) have been widely proposed as quality indicators in fish since they show a close relationship with the sensory score.<sup>5</sup> TMA-N is considered a valuable tool in the quality evaluation of fish stored in ice thanks to its quick accumulation in muscle under chilling conditions. TMA-N is one of the main compounds responsible for the characteristic fishy odour and is produced by the reduction of trimethylamine oxide (TMA-O) by the trimethylamine oxide reductase enzyme activity of certain bacteria.<sup>6</sup> TVB-N is made up of TMA-N and ammonia, together with other basic nitrogenous compounds.<sup>6</sup>

Biogenic amines (BAs) are non-volatile basic compounds formed by decarboxylation of the precursor amino acids by bacterial enzymes.<sup>7</sup> They can be useful to estimate the loss of freshness and hygienic quality of fish since these compounds are absent or only present at very low levels in fresh fish.<sup>8</sup> Moreover, in susceptible humans, some BAs can lead to a variety of cutaneous, gastrointestinal, haemodynamic and/or neurological symptoms.<sup>9</sup> Histamine (HI) is the only BA with a maximum legal limit as it has been held responsible for scombroid poisoning, one of the most frequently reported illnesses associated

with seafood consumption.<sup>9</sup> The role of cadaverine (CA), putrescine (PU) and tyramine (TY) as enhancers of HI toxicity has also been documented.<sup>10</sup>

Fish is contaminated by a mixed bacterial population consisting of psychrotrophic Gram-negative bacteria such as enterobacteria and pseudomonads, as well as gram-positive bacteria such as micrococci and staphylococci.<sup>6,11</sup> Enterobacteria, pseudomonads and certain lactic acid bacteria have been described as active BA-producing microorganisms in fish.<sup>12-15</sup> Of the BAs, HI has been the most widely studied, due its biological activity. Its accumulation in food has been characterised. Histaminogenic potential and the presence of histidine-decarboxylase activity have been described in several microbial groups.<sup>12,15</sup> HI formation is to be expected during the storage of anchovies, since they belong to the *Engraulidae* family whose members are known to bear large quantities of free histidine in their muscle.<sup>16</sup> Several studies have been published on the accumulation of HI and other BAs during the storage of pelagic, as well as non-pelagic, fish species.<sup>13,15,17-19</sup> Veciana-Nogués *et al*<sup>20</sup> studied BA formation in anchovies stored under refrigeration and at abusive temperatures, but no data are available regarding the formation of these non-volatile amines in anchovy stored in ice, even though this is the most common preservation procedure preceding both direct consumption as well as the use as a raw material for derivatives.

The present study was therefore carried out to investigate changes in volatile and non-volatile amines during ice storage of anchovies, paying special attention to the possible relationships between the occurrence of these amines and the counts of certain microbial groups. Our ultimate objective was to evaluate the suitability of volatile amines and BAs as chemical freshness indicators specifically for anchovy.

## MATERIALS AND METHODS

### Samples and sampling

Fresh anchovies (*Engraulis encrasicolus*) from the Mediterranean coast were obtained from the local fish market in Barcelona, always in the same selling point. The fish was captured the night before in the Mediterranean area between Vilanova i la Geltrú and the “Golfo de Rosas” and stored in self-draining boxes with ice until sold. Three trials were carried out, all within the catching season for this species: trial 1 (July 1999), trial 2 (June 2000) and trial

3 (May 2001). Individual weights ranged between 16 and 22 g and lengths between 12 and 17 cm. Ungutted fish were stored in self-draining boxes with flake ice (0°C) and placed within a refrigerator set at 4°C. Melted ice was replaced daily. A sample of ten anchovies, randomly chosen, was taken from the boxes immediately after being acquired and after 2, 5, 7, 9, 12, 15, 19 and 23 days of ice storage. All analytical determinations were performed in duplicate.

### **Microbiological analysis**

Aseptically, 10g of fish flesh were taken and blended with 90 ml of peptone water (0.1%) (Merk, Darmstad, Germany). A series of decimal dilutions were obtained and inoculated on appropriate media.<sup>11</sup> Mesophilic microorganisms were enumerated on plate count agar (PCA, Oxoid, Unipath Ltd. Basingstoke, Hampshire, UK) at 30°C for 72h; psychrotrophic microorganisms on PCA at 20°C for 72h; enterobacteria in violet red bile agar (VRBG, Oxoid) incubated with a double layer at 37°C for 24h; pseudomonads on cetrimide agar (Sharlau, Barcelona, Spain) at 30°C for 72h; Gram+ catalase+ cocci (staphylococci and micrococci) on manitol salt agar (MSA, Oxoid) at 30°C for 72h and lactic acid bacteria on Man Rogosa Sharpe agar (MRS, oxoid) at 30°C for 48h, anaerobically.

### **Chemical analysis**

At each sampling point, bones, head and guts were removed, before all the muscle tissue was mixed to obtain homogeneous representative samples. TMA-N and TVB-N were measured by flow injection-gas diffusion (FIGD) from a trichloroacetic acid extract obtained from fish flesh.<sup>21</sup>

BAs [TY, HI, serotonin (SE), octopamine (OC), dopamine (DO),  $\beta$ -phenylethylamine (PHE), tryptamine (TR), PU, CA, agmatine (AG)], were analysed by High Performance Liquid Chromatography.<sup>22</sup> The method also allows one to quantify the polyamines spermidine (SD) and spermine (SM).

The pH was measured directly from samples using a pHmeter (Crison 2001, Spain) inserting a Xerolyt electrode (Crison, Spain) into a mixture of minced fish flesh.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses of data were carried out using the analytical procedures of SPSS 11.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). Non-parametric tests were applied since data did not fit a normal distribution and/or showed significant asymmetry. The ANOVA test was applied to examine the statistical significance of changes during the storage period. Spearman's correlation coefficients were calculated to study the relationships between amines (volatile and biogenic amines) and microbial counts. The Receiving Operating Characteristic (ROC) curve was calculated to evaluate the suitability of BA indexes according to Swets<sup>23</sup> and Morrison *et al.*<sup>24</sup>

## **RESULTS AND DISCUSSION**

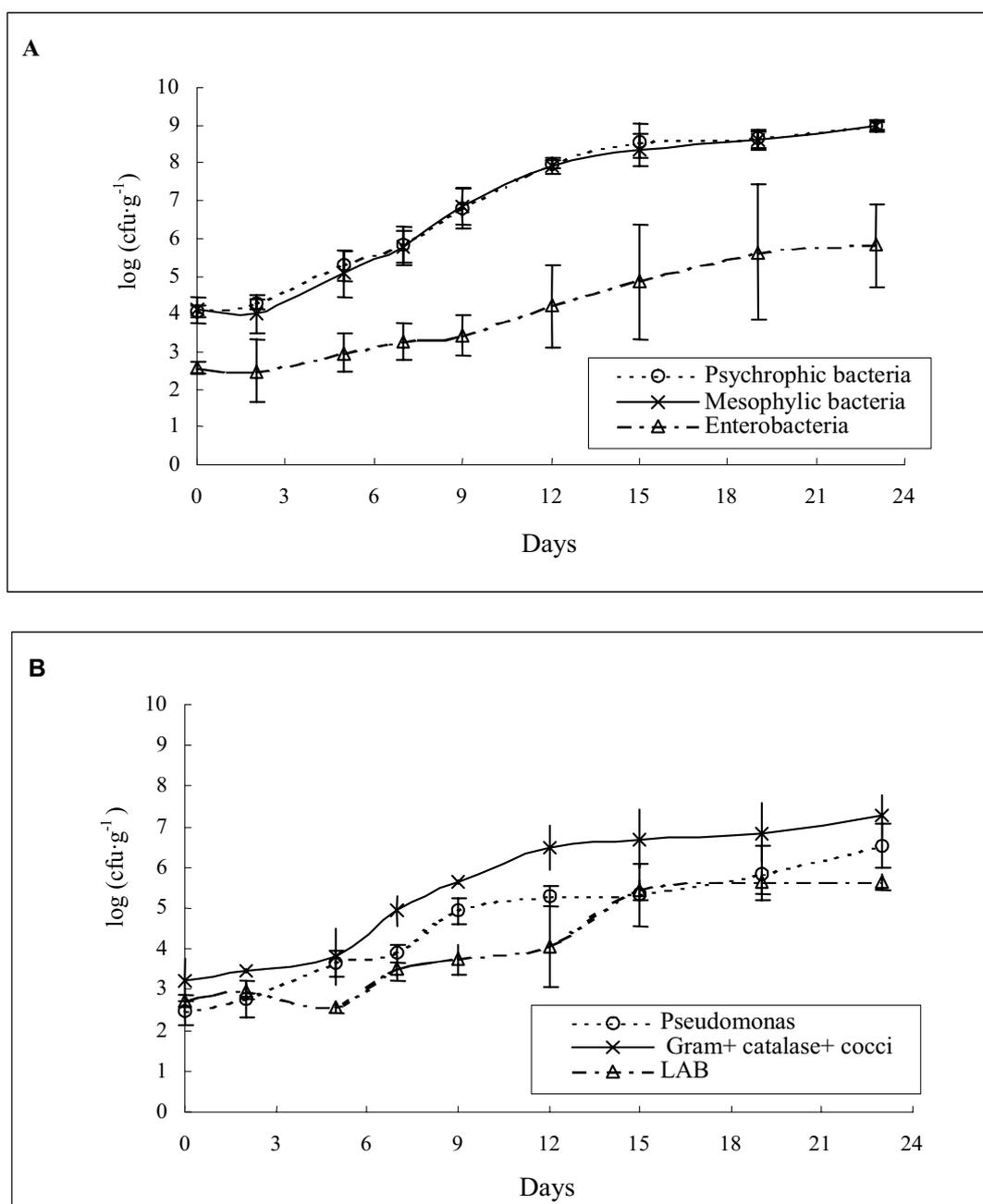
### **Changes in microbial flora**

Counts of all microbial groups increased during storage in ice (Figure 1 A). Psychrotrophic and mesophilic bacteria showed initial counts close to  $10^4$  cfu·g<sup>-1</sup>. This initial microbial load is comparable to data reported by other authors for fresh anchovies.<sup>25</sup> Both microbial groups showed a similar evolution reaching counts of  $10^8$  cfu·g<sup>-1</sup> by day 12 of ice storage, and then remaining fairly constant until the end of the study. Spanish regulations for fresh and refrigerated fish establish the microbial limit of acceptability at  $10^6$  cfu·g<sup>-1</sup> for mesophilic bacteria and  $10^3$  cfu·g<sup>-1</sup> for enterobacteria. Fish exceeding either of these limits are unmarketable.<sup>26</sup> These limits were surpassed after 7 and 5 days of storage, respectively. Therefore, based on the enterobacteria load, one could set the shelf life of ice-stored anchovies at 5 days. Aside from the legal regulations, a limit of  $10^5$  cfu·g<sup>-1</sup> for psychrotrophic bacteria has been suggested for fresh fish.<sup>11</sup> The results from this study showed that a count of psychrotrophic bacteria seems to be a more suitable indicator of freshness for anchovies stored in ice than one of mesophilic bacteria, since in all trials they reached the limit on day 5, which concords with the shelf-life period according to counts of enterobacteria.

Counts of *Pseudomonas* (Figure 1 B) surpassed  $10^3$  cfu·g<sup>-1</sup> after 5 days of storage, just as *Enterobacteriaceae*, but subsequently stabilised at higher levels. Gram+ catalase+ cocci showed in general higher counts than the other specific microbial groups studied. By contrast, lactic acid bacteria counts showed the lowest counts during the study, surpassing  $10^5$  cfu·g<sup>-1</sup> only after 12

days of storage, when fish could be rejected based on a sensory inspection. A similar evolution pattern for microbial counts has been reported during the ice storage of other fish species such as Mediterranean gilt-head sea bream.<sup>13</sup>

**Figure 1.** Evolution of microbial counts, in anchovy (*Engraulis encrasicolus*) during storage in ice (mean and standard deviation of three experiments).



### Volatile amine production and pH changes during ice storage

Table 1 shows changes in TMA-N and TVB-N levels as well as pH values during the experiment. TMA-N showed an initial value clearly lower than  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  while that of TBV-N was approximately  $115 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  both consistent with the low levels of volatile amines reported by other authors in freshly caught pelagic fish species.<sup>27,28</sup> According to the classical Castell criterion,<sup>29</sup> levels of  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  of TMA-N are considered an indicator of excellent fish quality. Levels of TMA-N in this study never reached maximum limits usually set at between 50 to  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .<sup>30</sup> Likewise, levels of TVB-N barely rose during the first period of ice storage. Flat and pelagic fish are known to contain the lowest levels of precursor (TMA-O),<sup>6</sup> perhaps explaining the low levels of TMA-N found. The maximum allowable limits for TBV-N established by European regulations for some fish families (not *Engraulidae*) range from 250 to  $350 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .<sup>31</sup> However, they seem inappropriately high for anchovy, since these levels were only achieved after 15 days of storage. Previous studies in both lean and fat fish have also reported much lower amounts of TVB-N than the above mentioned maximum.<sup>27</sup>

**Table 1.** Evolution of TMA-N ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), TVB-N ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and pH values<sup>a</sup> during ice storage of anchovy (*Engraulis encrasicolus*).

Days in ice	TMA-N	TVB-N	pH
0	4.94 (2.30) <sup>a</sup>	113.74 (22.88)	6.09 (0.11)
2	6.05 (2.11)	111.34 (22.06)	6.10 (0.08)
5	6.76 (1.93)	122.84 (31.50)	6.13 (0.05)
7	6.68 (1.17)	107.74 (52.92)	6.18 (0.07)
9	9.50 (2.00)	110.99 (42.24)	6.16 (0.10)
12	13.39 (4.64)	163.41 (42.84)	6.49 (0.14)
15	12.44 (0.61)	383.97 (129.38)	7.02 (0.24)
19	11.91 (3.38)	373.42 (108.35)	7.46 (0.24)
23	15.34 (2.05)	472.96 (147.66)	7.58 (0.11)

<sup>a</sup>mean (standard deviation) (n=3)

pH in samples from day 0 was near 6.0, which is typical for fresh fish.<sup>6</sup> During ice storage, pH rose to 7.50 but, as for TMA-N and TVB-N, there was no significant rise ( $p > 0.05$ ) during the first 9 days. Similar results have been described for sardines stored in ice.<sup>28</sup> The optimal pH for TMA-O reduction has been reported to be 7.2 – 7.4,<sup>32</sup> which was not reached during the first two weeks in our study. Thus, the low pH could be an additional factor explaining the low and late formation of TMA-N from TMA-O.

### Biogenic amine production during ice storage

Amounts of BAs in samples from day 0 were very low. Only polyamines were present in appreciable quantities, their levels remaining constant during the studied period, with no differences among trials (Table 2). These polyamines are usually found in fish muscle because of their physiological function,<sup>33</sup> and their presence is not associated with microbial spoilage of fish.

Levels of CA, PU and TY started to increase on day 5 whereas HI, OC, and PHE only increased later (Table 2). The diamines, CA followed by PU, were the main BAs formed in the three trials. However, levels for all BAs varied from trial to trial. This wide variability across trials could be attributed to the variability also found for counts of the microbial groups usually associated with a high potential of BA production (such as enterobacteria and lactic acid bacteria).

The European Community allows a maximum average value of  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  of HI in fish,<sup>3</sup> whereas the Food and Drug Administration (FDA) have stipulated a lower level of  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .<sup>34</sup> Despite the lengthy storage period, no sample exceeded these limits, even when microbial counts were unacceptably high according to Spanish regulations.<sup>26</sup> The low level of HI found is consistent with some other studies on sardine<sup>17</sup> and tuna<sup>15</sup> in which HI accumulation was significantly reduced or totally inhibited when fish was stored in ice. HI is produced mostly by mesophilic enterobacteria,<sup>35,36</sup> which grow better at abusive temperatures rather than the chilling conditions of ice storage. However, in some cases formation of toxic amounts of HI in pelagic fish stored in ice have been reported.<sup>17,37</sup> Moreover, some relationship between HI and enterobacteria development was found. In fact, levels of HI were negligible before enterobacteria counts reached  $10^5 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ , which are the minimum counts reported to be able to produce significant amounts of HI.<sup>18,35</sup>

**Table 2.** Evolution of biogenic amine contents ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) during ice storage of anchovy (*Engraulis encrasicolus*).

Days in ice	PU	CA	HI	TY	AG	OC	PHE	SD	SM
0	1.84 (0.94) <sup>a</sup>	1.65 (1.10)	0.49 (0.85)	1.45 (1.52)	6.13 (7.69)	0.05 (0.09)	nd <sup>b</sup>	4.92 (0.32)	4.04 (2.88)
2	2.65 (0.55)	3.03 (1.54)	0.47 (0.77)	2.29 (1.81)	12.97 (8.75)	0.15 (0.29)	nd	5.97 (1.14)	4.67 (3.03)
5	3.09 (0.62)	5.26 (4.54)	0.46 (0.79)	2.80 (1.51)	17.82 (12.74)	0.11 (0.19)	nd	7.10 (1.71)	4.19 (2.28)
7	3.94 (2.63)	13.99 (14.23)	0.49 (0.84)	4.60 (1.77)	38.27 (33.97)	0.03 (0.06)	nd	6.95 (1.10)	5.14 (3.05)
9	5.98 (1.46)	19.93 (14.61)	1.18 (0.84)	8.75 (1.78)	45.70 (29.14)	0.05 (0.08)	0.52 (0.89)	7.60 (1.72)	4.86 (2.63)
12	29.13 (7.89)	44.28 (25.39)	4.07 (6.13)	12.84 (12.84)	57.16 (31.41)	0.70 (0.99)	0.79 (1.36)	6.67 (1.72)	5.00 (2.17)
15	64.69 (31.14)	95.44 (28.46)	6.78 (4.31)	19.99 (20.85)	30.19 (38.70)	2.92 (2.12)	1.40 (2.43)	4.48 (2.44)	4.33 (2.50)
19	82.42 (25.91)	187.32 (34.57)	11.16 (7.30)	35.11 (23.89)	25.92 (28.27)	9.36 (3.89)	2.01 (3.48)	4.72 (2.38)	4.47 (3.78)
23	71.64 (13.86)	152.32 (13.18)	11.52 (7.90)	22.77 (22.33)	9.22 (15.96)	6.87 (3.02)	1.63 (2.82)	4.38 (1.95)	4.00 (4.02)

<sup>a</sup> mean (standard deviation) from three experiments

<sup>b</sup> not detected

Although HI is the only BA for which legal limits have been set, the FDA also recommends a quantification of other BAs in fish.<sup>34</sup> Indeed, levels of diamines CA and PU were in all trials much higher than HI, as it has been reported in the chilling storage of tuna.<sup>38</sup>

Although TY is a BA more commonly associated with the fermentation processes than with food spoilage, TY levels were generally higher than those for HI. It has been previously described that some species of lactic acid bacteria are able to decarboxylate tyrosine and produce TY *in vitro*.<sup>14</sup> OC and DO evolution mirrored that of TY, though they appeared later and at lower levels. This concord with the suggestion that OC and DO are TY metabolites.<sup>6</sup> No

previous data have been reported on the presence of OC or DO in anchovy or other fish species.

AG was the first BA to appear, the concentration of which increased during storage, reaching variable maximum values between 24.5 and 82.7 mg·kg<sup>-1</sup>, within the period of 9-12 days of storage, depending on the trial (Table 2). Afterwards, AG amounts decreased producing a peak profile, as it has been previously described for other fish species.<sup>39,19</sup> The most significant aspect of AG behaviour was that its production started within the first days of storage. Thus, this amine may be a chemical indicator of the earliest changes occurring during ice storage of anchovies. Nevertheless, AG would be inappropriate as an indicator of freshness since low values can be found equally in both fresh as well as slightly or highly spoiled fish.

PHE and TR were only detected in one of the three performed trials and always at very low levels (below 2.5 mg·kg<sup>-1</sup> and 1 mg·kg<sup>-1</sup>, respectively). High levels of these monoamines have only been found in spoiled samples of fish stored at room temperature,<sup>8,20</sup> suggesting that the storage in ice might delay and reduce PHE and TR formation. SE was found in some samples but no temporal relationship could be found.

### **Suitability of volatile and non-volatile amines as chemical freshness indicators of anchovies stored in ice.**

To evaluate the appropriateness of volatile and non-volatile amines as freshness indicators, the correlations between microbial counts and TMA-N, TBN-N as well as the main BAs accumulated during ice storage of anchovies (CA, PU TY, and HI) were studied (Table 3). Significant correlations ( $P < 0.01$ ) were found in all cases, which is consistent with the microbial origin of both volatile amines and BAs, but correlation coefficients ( $r$ ) with microbial counts and their significances were higher for BAs than for TMA-N and TVB-N. In general, better  $r$ -values were found for correlations involving BAs and overall psychrotrophic and mesophilic counts, rather than for more specific counts. The correlations between BAs and such specific microbial groups improved when correlations were analysed trial-by-trial. This can be explained by the variability in the development of specific microbial groups across trials, which was higher than that for psychrotrophic and mesophilic bacterial counts. Thus, consistently to the reported ability of *Enterobacteriaceae* to decarboxylate histidine, this microbial group showed the best correlation coefficient against to HI, the  $r$  being

even higher (0.921,  $P < 0.01$ ; 0.983,  $P < 0.01$ ) in a trial-by-trial treatment. In the case of TY, the correlation with LAB was less satisfactory, which can be attributed to the high variability of TY accumulation among trials. Consistent with this, two of the performed trials showed a higher correlation coefficient ( $r = 0.814$ ,  $P < 0.01$  and  $r = 0.967$ ,  $P < 0.01$ ), whereas correlation was not significant in the trial with the lowest TY accumulation. A weak TY accumulation of this later trial could be explained because the LAB growing in some iced anchovy did not show tyrosine decarboxylase ability. Indeed, it is well known that microbial amino acid-decarboxylase capability is not only dependent on the microbial group, but also on the genera, species, and even strain.

**Table 3.** Correlation coefficients ( $r$ )<sup>a</sup> between microbial counts (log (cfu.g<sup>-1</sup>)) and volatile (mg·kg<sup>-1</sup>), and biogenic amines(mg·kg<sup>-1</sup>).

	Psychrotrophic	Mesophilic	LAB	Pseudomonads	Micro/Staphylococci	Enterobacteria
<b>TMA-N</b>	0.748	0.731	0.748	0.761	0.764	0.582
<b>TVB-N</b>	0.728	0.747	0.750	0.629	0.692	0.725
<b>HI</b>	0.822	0.806	0.805	0.781	0.648	0.843
<b>TY</b>	0.819	0.809	0.663	0.677	0.720	0.815
<b>PU</b>	0.912	0.921	0.862	0.846	0.905	0.842
<b>CA</b>	0.914	0.904	0.800	0.849	0.912	0.736

<sup>a</sup> Statistical significance of correlation was always  $p < 0.01$

The suitability of a BA index (BAI) to evaluate the freshness of anchovies stored in ice was studied by comparison of the different reported criteria related with BA contents. Aside from the HI limits set by the FDA<sup>34</sup> and the EU<sup>3</sup>, the individual or combined use of several BA to rate the hygienic quality of fish has also been reported. Yamanaka *et al*<sup>40</sup> proposed the use of CA as a quality indicator, Stede and Stoeckmer<sup>41</sup> the use of CA+PU and Mietz and Karmas<sup>42</sup> proposed a more complex index calculated as the sum of BAs HI + CA + PU over 1 + (SD + SM). More recently, Veciana-Nogués *et al*<sup>19</sup> proposed the sum of HI, TY, PU and CA as a BAI to evaluate the hygienic quality of tuna.

Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis is a standard approach to evaluate the accuracy of a diagnostic test using the value of the area under the curve (AUC).<sup>23,24</sup> According to Swets<sup>23</sup> a minimum value of AUC=0.70 is required. We used the ROC curve to evaluate the ability of each of the above mentioned BAI to correctly classify anchovy samples as acceptable or

unacceptable for consumption with a maximum threshold count of enterobacteria of  $10^3$  cfu·g<sup>-1</sup>, corresponding to the shelf-life limit of the samples according to current Spanish regulations.<sup>26</sup> Among the four BAI examined, the sum of (HI+TY+PU+CA) showed the highest AUC value (0.925) with an Interval of Confidence (IC95%) between 0.84 and 1.01, indicating a higher accuracy in comparison with other BAI. In addition, and differently to other authors, BAI originally defined by Veciana-Nogués *et al.* aside from CA and PU, which are quantitatively the most important BAs accumulated during anchovy spoilage, also includes TY, as it is also often formed in considerable amounts during spoilage. In addition, TY is the main amine occurring during the manufacture of anchovy derivatives.<sup>20</sup>

ROC curves also help in selecting a specific acceptability threshold value for a given index, allowing one to ensure balanced sensitivity and specificity over 75%.<sup>24</sup> Considering hygienic-sanitary concerns and the freshness of raw anchovies, sensitivity is more important than specificity. Taking this into consideration, values of BAI ranging from 12 to 17 mg·kg<sup>-1</sup> show acceptable accuracy ( $\geq 80\%$  for both sensitivity and specificity). Thus, we suggest an acceptability limit of BAI for anchovy stored in ice of 15 mg·kg<sup>-1</sup>. However further studies are needed to finally evaluate the suitability of the suggested limit according to the sensory analysis.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank QUALPOISS2 (FAIR.CT 96.3253) and the “Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (CIRIT, 2001 SGR-00132) of the *Generalitat de Catalunya* (Spain) for their financial support.

### REFERENCES

1. Hernández-Herrero MM, Roig-Sagués AX, López-Sabater EI, Rodríguez-Jerez JJ and Mora-Ventura MT, Influence of raw fish quality on some physicochemical and microbiological characteristics as related to ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus* L.). *J Food Sci* **67**:2631-2640 (2002).

2. Careche M, García R, and Borderías J, Anchovy Shelf life as affected by different chilling methods during distribution. *J. Food Prot.* **65**: 353-361 (2002)
3. European Community, 91/493/EEC, Directive of July, 22, 1991, concerning the normative for production and merchandising of fishery products. *DOCE L286*:15-34 (1991).
4. Ministerio de Sanidad y Consumo, Real Decreto 1437/1992. Normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de los productos pesqueros y de la acuicultura. Anexo Capítulo V: Controles sanitarios e inspección de las condiciones de producción. *BOE* **11**:808-820 (1992).
5. Civera T, Turi RM, Bisio C, Paris E and Fazio G, Sensory and chemical assessment of marine teleosts. *Sciences des Aliments* **13**:109-117 (1993).
6. Huss H H, Quality and quality changes in fresh fish, in *FAO Fisheries Technical Paper*, 348, Ed by HH Huss, Technological Laboratory Ministry of Agriculture and Fisheries, Denmark, pp 195 (1995).
7. Raguene N, Aminas biógenas, in *Microbiología alimentaria 1. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria*, Ed by Bourgeois C M, Mescle J F, Zucca J, Acribia, Zaragoza, pp 140-153 (1994).
8. Mariné-Font A, Vidal-Carou MC, Izquierdo-Pulido M, Veciana-Nogués MT and Hernández-Jover T, Les amines biogènes dans les aliments: leur signification, leur analyse. *Ann Fals Exp Chim* **88**: 119-140 (1995)
9. Lehane L and Olley J, Histamine fish poisoning revisited. Review. *Int J Food Microbiol* **58**:1-37 (2000).
10. Stratton JE and Taylor SL, Scombroid poisoning, in *Microbiology of marine products*, Ed by D R Ward & C Hackney, AUI Publishing Co, New York, pp 331-351 (1991).
11. Pascual-Anderson MR and Calderón-Pascual V, *Microbiología alimentaria. Metodología para alimentos y bebidas*, Ed by Díaz de Santos, S. A., Madrid, pp 441 (2000).
12. López-Sabater E I, Rodríguez-Jerez JJ, Roig-Sagués AX and Mora-Ventura MT, Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for

- canning: Effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. *J Food Protect* **57**:318-323 (1994).
13. Koutsoumanis K, Lampropoulou K and Nychas GJE, Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) stored aerobically at 0, 8 and 15°C. *J Food Protect* **62**:398-402 (1999).
  14. Dapkevicius MLNE, Nout MJR, Rombouts FM, Houben JH and Wymenga W, Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *Int J Food Microbiol* **57**:107-114 (2000).
  15. Du WX, Lin CM, Phu AT, Cornell JA, Marshall MR and Wei CI, Development of biogenic amines in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*): Effect of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. *J Food Sci* **67**:292-301 (2002).
  16. Albrecht-Ruiz M, Clark-Leza D and Aleman-Polo M, Rapid method for biogenic amine evaluation in fish meal. *J Aquat Food Product Technol* **8**:71-83 (1999).
  17. Ababouch LH, Soubri L, Rhaliby K, Ouahdi O, Battal M and Busta FF, Quality changes in sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature. *Food Microbiol* **13**:123-132 (1996).
  18. López-Sabater EI, Rodríguez-Jerez JJ, Hernández-Herrero MM, Roig-Sagués AX and Mora-Ventura MT, Sensory quality and histamine formation during controlled decomposition of tuna (*Thunnus thynnus*). *J Food Protect* **59**:167-174 (1996).
  19. Veciana-Nogués MT, Mariné-Font A and Vidal-Carou MC, Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationship with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines and organoleptic changes. *J Agr Food Chem* **45**:2036-2041 (1997).
  20. Veciana-Nogués MT, Albalá-Hurtado S, Mariné-Font A and Vidal-Carou MC, Changes in biogenic amines during the manufacture and storage of semipreserved anchovies. *J Food Protect* **59**:1218-1222 (1996).
  21. Pons-Sánchez-Cascado S, Izquierdo-Pulido M, Mariné-Font A, Veciana-Nogués MT and Vidal-Carou MC, Reliability of trimethylamine and total volatile basic nitrogen determinations by flow injection-gas diffusion

- techniques in pelagic fish: *Engraulis encrasicolus*. *Química Analítica* **19**:165-170 (2000).
22. Veciana-Nogués MT, Hernández-Jover T, Mariné-Font A and Vidal-Carou MC, Liquid chromatographic method for determination of biogenic amine in fish and fish products. *J AOAC Int* **78**:1045-1050 (1995).
23. Swets JA, Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* **240**:1285-1293 (1988).
24. Morrison AM, Coughlin K, Shine JP, Coull BA and Rex AC, Receiver Operating Characteristic curve analysis of beach water quality indicator variables. *Appl Environ Microbiol*, **69**:6405-6411 (2003).
25. Fuselli SR, Casales MR, Fritz R and Yeannes MI, Microbiology of the marination process used in anchovy (*Engraulis anchoita*) production. *Lebensm Wiss U Technol* **27**:214-218 (1994).
26. Ministerio de Sanidad y Consumo, RD 1521/1991, Directiva del 15 de agosto 1991, Orden del 2 de agosto de 1991 por la que se aprueban las normas microbiológicas, los límites de contenido en metales pesados y los métodos analíticos para la determinación de metales pesados para los productos de la pesca y de la acuicultura, *BOE*, **195**:27513-27515 (1991).
27. Monteagudo-Torres S, de la Montaña-Miguélez J and Miguez-Bernárdez M, Comparación de métodos organolépticos y físico-químicos al evaluar la calidad y vida comercial de pescado magro (*Trisopterus luscus*) y graso (*Trachurus trachurus*) comercializado en Pontevedra. *Alimentaria* **334**:73-79 (2002).
28. Pacheco-Aguilar R, Lugo-Sánchez ME and Robles-Burgueño MR, Postmortem biochemical and functional characteristic of Monterey sardine muscle stored at 0°C. *J Food Sci* **65**:40-47 (2000).
29. Castell C, Geenough M, Rodgers R and Macfarland A, Grading fish for quality. I. Trimethylamine values of fillet cut from graded fish. *J Fish Res Bd Can* **28**:1-25 (1958).
30. Sikorski ZE, Kolakiwska A and Burt JR, Postharvest biochemical and microbial changes, in *Seafood: Resources, nutritional composition and preservation*, Ed by Z E Sikorski, CRC Press, Inc Boca Raton, Fl., pp 256 (1990).

31. European Community, 95/149/EEC, Determinación de la concentración de bases nitrogenadas volátiles (NBVT) en pescados y productos de la pesca. *DOCE L97*:84-87 (1995).
32. Soudan F, La conservation par le froid des poissons, crustacés et mollusques, Ed by J Baillière et Fils, París, pp 43-45 (1965).
33. Bardócz S, Polyamines in food and their consequences for quality and human health. *Trends Food Sci Technol* **6**:341-346 (1995).
34. Food and Drug Administration (FDA), Decomposition and histamine-raw, frozen tuna and mahi-mahi, canned tuna and related species, revised compliance policy guide, availability. *Federal Register* **149**:39754-39756 (1995).
35. Hernández-Herrero M, Roig-Sagués AX, Rodríguez-Jerez JJ and Mora-Ventura MT, Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *J Food Sci* **62**:509-514 (1999).
36. Kim SH, Price RJ, Morrissey MT, Field KG, Wei CI and An H, Occurrence of histamine-forming bacteria in albacore and histamine accumulation in muscle at ambient temperature. *J Food Sci* **67**:1515-1521 (2001).
37. Ababouch L, Afilal M E, Benabdeljelil H and Busta F F, Quantitative changes in bacteria, amino acids and biogenic amines in sardine (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25-28 °C) and in ice. *Int J Food Sci Tech* **26**: 297-306 (1991).
38. Rossi S, Lee C, Ellis PC and Pivarnik L F, Biogenic amines formation in bigeye tuna steaks and whole skipjack tuna. *J Food Sci* **67**:2056-2060 (2002).
39. Baixas-Nogueras S, Bover-Cid S, Vidal-Carou MC and Veciana-Nogués MT, Volatile and nonvolatile amines in mediterranean hake as a function of their storage temperature. *J Food Sci* **66**: 83-88 (2001).
40. Yamanaka H, Polyamines as potential indexes for freshness of fish and squid. *Food Rev Int* **6**:591-602 (1991).
41. Stede M and Stockemer J, Biogenic amines in marine fish (Biogene amines in seefischen). *Lebensm Wiss U Technol* **19**:283-287(1986).

42. Mietz JL and Karmas E, Chemical quality index of canned tuna as determined by HPLC. *J Food Sci* **42**:155-158 (1977).



## **12. ACTIVIDAD AMINOÁCIDO DESCARBOXILASA DE BACTERIAS AISLADAS DEL BOQUERÓN**

**Pons-Sánchez-Cascado, S.; Bover-Cid, S.; Veciana-Nogués, M. T.; Vidal-Carou, M. C. (2005).** Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from ice-preserved anchovies. *Eur Food Res Technol*, 220: 312-315.

### **12.1. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO**

El deterioro del pescado se debe principalmente a la actividad bacteriana. Tal y como se ha mencionado en capítulos anteriores, esta carga bacteriana puede dar lugar a la acumulación de aminas biógenas, compuestos que pueden ser útiles como indicadores de la calidad higiénica del pescado. La mayoría de las enterobacterias, ciertos lactobacilos, pediococos y enterococos son particularmente activos en la formación de aminas biógenas (Halász y col., 1994). Tanto el tipo de aminas biógenas que se formará en el boquerón como su cantidad, dependerá del tipo de microorganismos que se desarrollen en el pescado.

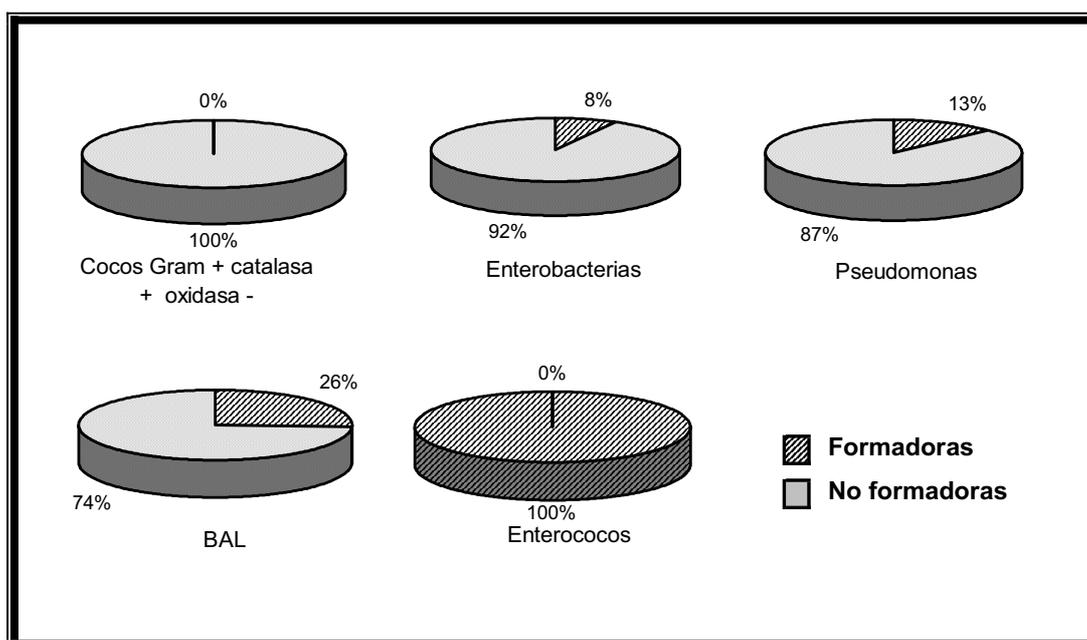
En este trabajo se planteó un triple objetivo:

- Conocer los microorganismos responsables de la alteración del boquerón conservado en hielo y valorar su capacidad para formar aminas biógenas.
- Investigar posibles asociaciones entre los grupos bacterianos estudiados y algunas aminas biógenas.
- Valorar cuáles de las cepas identificadas contribuyen más significativamente a la formación de aminas biógenas.

Para alcanzar estos objetivos, se determinaron las aminos biógenas y se hizo un recuento de enterobacterias, pseudomonas, cocos Gram + catalasa + oxidasa -, bacterias del ácido láctico (BAL) y enterococos de boquerones conservados en hielo durante 23 días. Posteriormente se aislaron algunas de las cepas de los microorganismos pertenecientes a los grupos bacterianos anteriormente citados, se determinó su capacidad aminoácido descarboxilasa y se identificaron aquellas bacterias capaces de producir aminos biógenas *in vitro*.

### 12.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron un total de 140 colonias bacterianas: 37 enterobacterias, 49 cocos Gram+ catalasa + oxidasa -, 23 pseudomonas, 27 BAL y 4 enterococos durante los 23 días de almacenamiento del boquerón en hielo. La figura 12.1 muestra el porcentaje de colonias capaces de producir aminos biógenas *in vitro* entre las cepas aisladas. Así, podemos observar que ningún coco Gram+ catalasa + oxidasa - presentó capacidad aminoácido descarboxilasa, mientras que la totalidad de las cepas aisladas de enterococos fueron productoras de aminos biógenas.



**Figura 12.1.** Porcentaje de colonias capaces de producir aminos biógenas *in vitro*.

En general, todos los grupos microbianos presentaron un aumento en sus recuentos a lo largo del almacenamiento. Sin embargo, el porcentaje de bacterias con capacidad aminoácido descarboxilasa no aumentó. Sólo el 12% de las 140 cepas aisladas fueron productoras. Este porcentaje tan bajo se podría explicar, ya que la mayoría de las bacterias descritas en la literatura que presentan esta actividad son mesófilas y el hielo no es seguramente el medio más propicio para su desarrollo.

La tabla 12.1 muestra la identificación de las bacterias aisladas de cada grupo bacteriano estudiado, así como su capacidad aminogénica. Las enterobacterias produjeron putrescina y cadaverina *in vitro*, las pseudomonas fueron capaces de descarboxilar la ornitina y tanto las BAL como los enterococos produjeron tiramina. No se encontró actividad histidina descarboxilasa a pesar de que algunas especies identificadas han sido descritas como productoras de histamina y de que el boquerón es un pescado de la familia *Engraulidae* caracterizada por presentar cantidades elevadas de histidina en su músculo.

**Tabla 12.1.** Capacidad aminogénica de las cepas identificadas.

Especies	TI <sup>(1)</sup>	PU	CA	HI
<b>Enterobacterias</b>				
<i>E. cloacae</i>	ND <sup>(2)</sup>	592-814 <sup>(3)</sup>	852-1160	ND
<b>Pseudomonas</b>				
<i>P. cepacia</i>	ND	16 - 661	ND	ND
<i>P. fluorescens</i>	ND	347 - 386	20 - 21	ND
<b>Bacterias del Ácido Láctico</b>				
<i>Lactobacillus brevis</i>	ND - 826	ND - 20	ND - 42	ND
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	789 - 797	ND	ND	ND
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	796 - 810	ND	ND	ND
<b>Enterococos</b>				
<i>Enterococcus spp</i>	320 - 2010	ND	ND	ND

<sup>(1)</sup> TI=Tiramina, PU=Putrescina, CA=Cadaverina, HI=Histamina

<sup>(2)</sup> No detectado

<sup>(3)</sup> Concentración en mg/l

Como regla general, las bacterias Gram – (enterobacterias y pseudomonas) con capacidad aminoácido descarboxilasa produjeron diaminas y fueron aisladas sólo durante las dos primeras semanas de almacenamiento. Por el

## Resultados y Discusión

contrario, las bacterias Gram + (BAL y enterococos) fueron productoras de tiramina y solamente se aislaron al final del almacenamiento (Tabla 12.2).

**Tabla 12.2.** Distribución de las cepas productoras durante el almacenamiento del boquerón en hielo.

Días de almacenamiento en hielo	0	2	5	7	9	12	15	19	23
Enterobacterias		PU, CA <sup>(1)</sup>							
Pseudomonas	PU, CA				PU				
BAL								TI	
Enterococos									TI

<sup>(1)</sup> TI=Tiramina, PU=Putrescina, CA=Cadaverina

La espermidina y la espermina son poliaminas naturales que se encontraron en concentraciones bajas en todos los medios de cultivo correspondientes a los grupos bacterianos estudiados. Los bajos niveles detectados demuestran que no son producidas por los microorganismos, sino que su presencia se debe a que son aminas fisiológicas necesarias para el crecimiento celular (Pollach y col., 1992).

**Pons-Sánchez-Cascado, S.; Bover-Cid, S.; Veciana-Nogués, M. T.; Vidal-Carou, M. C. (2005).** Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from ice-preserved anchovies. *Eur Food Res Technol*, 220: 312-315.



Sofia Pons-Sánchez-Cascado · Sara Bover-Cid ·  
M. Teresa Veciana-Nogués · M. Carmen Vidal-Carou

## Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from ice-preserved anchovies

Received: 13 September 2004 / Published online: 8 December 2004  
© Springer-Verlag 2004

**Abstract** The amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from *Engraulis encrasicolus* preserved in ice was investigated throughout 23 days of storage. A total of 140 bacterial isolates were studied, including 37 enterobacteria, 23 pseudomonads, 49 Gram+ catalase+ cocci, 27 lactic acid bacteria and 4 enterococci. The percentage of strains that decarboxylated amino acids was low, 12% on average. None of the Gram+ catalase+ cocci showed aminogenic activity, but all enterococci isolates did. The enterobacteria with aminogenic capacity were identified as *Enterobacter cloacae* and they simultaneously produced putrescine and cadaverine (up to 500 mg/l), but not histamine. Among pseudomonads, two species decarboxylated ornithine (producing 350–650 mg/l putrescine): *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas fluorescens*. Lactic acid bacteria decarboxylated tyrosine, yielding up to 2,000 mg/l tyramine, and they were identified as *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus* and *Enterococcus* spp. As a general rule, the positive Gram-negative isolates (enterobacteria and pseudomonads) were diamine producers and they were found only during the first 2 weeks of storage. In contrast, lactic acid bacteria and enterococci were mainly tyramine producers and they were isolated only at the end of storage.

**Keywords** Anchovy · Amino acid-decarboxylase · Putrescine · Cadaverine · Histamine · Biogenic amines

Part of this study was presented at the “XIII Congreso de Microbiología de los Alimentos” held in Bilbao (Spain), 17–19 September 2002.

S. Pons-Sánchez-Cascado · S. Bover-Cid · M. T. Veciana-Nogués ·  
M. C. Vidal-Carou (✉)  
Departament de Nutrició i Bromatologia. Facultat de Farmàcia,  
Universitat de Barcelona,  
Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain  
e-mail: mcvidal@ub.edu.es  
Tel.: +34-93-4024513  
Fax: +34-93-4035931

### Introduction

Biogenic amines (BA) are basic nitrogenous compounds that can cause food poisoning if ingested in large amounts or if human detoxification systems are inhibited or genetically deficient. They are formed by bacterial enzymes through the decarboxylation of precursor amino acids during food fermentation, which is due to technologically desirable microorganisms, but also to contamination through defective or improper handling, raw material or food spoilage [1]. BA formation not only requires precursors and the bacteria responsible for decarboxylation, but it is also influenced by several factors such as pH, water activity and temperature, which condition the growth and expression of the amino acid-decarboxylase activity of microorganisms [1, 2].

Fish spoilage is mainly caused by bacterial activity and some compounds, such as BA, can be formed by bacterial decarboxylation of precursor amino acids. In fact, BA are absent or found at very low levels in fresh fish and their formation is usually associated with spoilage [3]. Therefore, poor hygiene is probably the main factor involved in the formation of these compounds. Contamination with microorganisms bearing amino acid-decarboxylase activity can occur in any phase of the merchandise chain: aboard ship (in reused boxes or other potentially contaminated materials), during transport, at retail outlets and in the household. Fresh fish can be contaminated by a mixed bacterial population consisting of psychrotrophic Gram-negative bacteria like pseudomonads and enterobacteria and Gram-positive bacteria like micrococci, staphylococci and lactic acid bacteria (LAB) [4, 5].

The type of microorganisms present in food determines the type and amount of BA formed. Many enterobacteria and certain lactobacilli, pediococci and enterococci are particularly active during the formation of BA in food [6]. Indeed, enterobacteria have been mostly described as strong producers of histamine (HI) in fish [2, 7] and the diamines putrescine (PU) and cadaverine (CA) [8]. LAB have been mainly associated with the formation

of tyramine (TY) in fermented food such as dry sausages and cheese [9, 10].

Most reports have focused on HI because it is the main BA in fish, especially in pelagic species, associated with histaminic intoxication. Although HI is the only amine with a legally established maximum for fish [11, 12], other BA associated with fish decomposition, such as PU and CA, may enhance the toxic effects of HI [13].

Anchovy (*Engraulis encrasicolus*) is a pelagic fish particularly appreciated in Mediterranean countries. It can be consumed fresh, salted or marinated in oil or vinegar, and anchovies may accumulate HI and other BA during long storage times and throughout the ripening process [14]. However, the amino acid-decarboxylase activity of bacteria has been studied only in isolates from the ripened product. Thus, there is no information available about the aminogenic potential of microorganisms during the storage of fresh anchovies. We thus aimed to study the amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from anchovy (fresh fish) preserved in ice during 23 days of storage.

## Material and methods

### Samples

Anchovies (*Engraulis encrasicolus*) were stored in self-draining boxes covered with flake ice (0 °C) replaced daily inside a refrigerator at 4 °C. Four anchovies were randomly sampled every 2–4 days throughout storage. Two trials were performed in the same conditions.

### Microbiological analysis and isolation of colonies

Ten grams of a sample was mechanically homogenized with 90 ml 0.1% tryptone water (Merk, Darmstadt, Germany) for 2 min. Decimal dilutions were prepared and the appropriate dilution was inoculated to the corresponding medium [5]. Enterobacteria were enumerated in violet-red bile agar (VRBG, Oxoid, Unipath, Basingstoke, UK) and incubated with a double layer at 37 °C for 24 h; pseudomonads were enumerated on cetrimide agar (Sharlau, Barcelona, Spain) at 32 °C for 72 h; Gram+ catalase+ cocci (micrococci and staphylococci) on mannitol salt agar (Oxoid) at 32 °C for 72 h; LAB on Man Rogosa Sharpe agar (MRS, Oxoid) at 30 °C for 48 h anaerobically and enterococci on kanamycin aesculin azide agar base (Oxoid) at 37 °C for 48 h.

Several colonies of each microbial group were picked up and streaked on tryptone soy agar (Oxoid) (enterobacteria, pseudomonads, Gram+ catalase+ cocci) or MRS (LAB and enterococci) at 30 °C to obtain pure isolates.

### Determination of the amino acid-decarboxylase activity

Pure cultures were incubated in decarboxylase broth as described by Bover-Cid and Holzappel [15] and aminogenic activity was quantified throughout the analysis of BA following the high-performance liquid chromatography method reported by Veciana-Nogués et al. [16].

### Identification of bacterial isolates

The colonies producing BA from the precursor amino acids were identified on the basis of the Gram and oxidase reaction, catalase production and biochemical tests using the appropriate API system (API 20E, API 20 NE or API 50 CH from Bio-mérieux, Marcy-l'Étoile, France).

## Results and discussion

Table 1 shows the time course of microbial counts throughout 23 days of anchovy storage in ice. A total of 140 bacteria were isolated during storage, 17 of which formed noticeable amounts of BA. These microorganisms were identified and their amino acid-decarboxylase capacity was quantified (Table 2).

The number of enterobacteria increased throughout storage, achieving counts higher than 6log(cfu/g) at the end of the study period; however, only 8% of the isolates were decarboxylase positive. Ice-storage may have hindered the growth of BA-producing bacteria, since the microorganisms showing this ability are mainly mesophilic bacteria [17]. Therefore, the enterobacteria isolated here were mainly non-BA producers. Enteric microorganisms with amine-forming ability constitute a minor proportion of the fish flora and are difficult to isolate in high yields [18, 19]. All amine-forming enterobacteria found in this study were identified as *Enterobacter cloacae*. They simultaneously produce both diamines, especially CA. In contrast, none of the *Enterobacter cloacae* isolates showed the ability to form HI, in agreement with the observations of Lakshmanan et al. [8], who isolated bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family that produced both CA and PU from fresh emperor fish. Likewise, *Enterobacter cloacae* strains isolated from salted anchovies lack histidine decarboxylase ability [20]. Although enterobacteria isolated from fish are frequently regarded as HI-forming bacteria, they are mostly isolates from fish kept under refrigeration or stored at excessive temperatures [7, 17, 21, 22]. In contrast, Kim et al. [19]

**Table 1** Microbial counts, in log(cfu/g), throughout ice storage of anchovy. The values are the average  $\pm$  the standard deviation of the two trials performed. Not detected (ND)

Days in ice	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	Gram+ catalase+ cocci	Lactic acid bacteria	<i>Enterococcus</i>
0	2.55 $\pm$ 0.16	2.54 $\pm$ 0.51	3.14 $\pm$ 0.76	2.74 $\pm$ 0.01	ND
2	2.49 $\pm$ 0.81	2.92 $\pm$ 0.54	3.45 $\pm$ 0.07	2.95 $\pm$ 0.20	ND
5	2.96 $\pm$ 0.50	3.74 $\pm$ 0.39	3.55 $\pm$ 0.78	2.57 $\pm$ 0.12	ND
7	2.56 $\pm$ 1.51	3.79 $\pm$ 0.20	4.79 $\pm$ 0.39	3.49 $\pm$ 0.29	ND
9	3.58 $\pm$ 0.64	5.05 $\pm$ 0.35	5.64 $\pm$ 0.06	3.74 $\pm$ 0.36	ND
12	4.84 $\pm$ 0.13	5.17 $\pm$ 0.15	6.48 $\pm$ 0.77	4.05 $\pm$ 0.99	ND
15	5.73 $\pm$ 0.21	4.88 $\pm$ 0.14	6.94 $\pm$ 0.84	5.30 $\pm$ 0.07	ND
19	6.67 $\pm$ 0.23	5.50 $\pm$ 0.35	6.74 $\pm$ 0.98	5.48 $\pm$ 0.04	ND
23	6.36 $\pm$ 0.71	6.28 $\pm$ 0.45	7.09 $\pm$ 0.61	5.59 $\pm$ 0.23	1.48 $\pm$ 0.43

**Table 2** Aminogenic potential of bacteria isolated from anchovies stored in ice. The concentration in the decarboxylase broth is in units of milligrams per liter.

Species	No. of positives Total isolates	Tyramine	Putrescine	Cadaverine	Histamine
<i>Enterobacteriaceae</i>	3/37				
<i>Enterobacter cloacae</i>		NEG <sup>a</sup>	592–814	852–1,160	NEG
<i>Pseudomonas</i>	3/23				
<i>Pseudomonas cepacia</i>		NEG	16–661	ND	NEG
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		NEG	347–386	20–21	NEG
Gram+ catalase+ cocci	0/49	NEG	NEG	NEG	NEG
Lactic acid bacteria	7/27				
<i>Lactobacillus brevis</i>		NEG-826	NEG-20	NEG-42	NEG
<i>Lactococcus lactis</i>		789–797	NEG	NEG	NEG
<i>Pediococcus pentosaceus</i>		796–810	NEG	NEG	NEG
Enterococci	4/4				
<i>Enterococcus</i> spp		320–2,010	NEG	NEG	NEG

<sup>a</sup> Negative: not able to decarboxylate any amino acid in vitro

reported that no HI-forming bacteria were isolated from VRBG medium during the storage of pacific mackerel at 0 °C for up to 14 days. In agreement with these findings, there are fewer studies reporting HI accumulation in fish stored at 0 °C than during storage under refrigeration or at excessive temperatures. Indeed, the formation of HI at 0 °C has been generally reported when fish become unacceptable for human consumption [7, 23].

The levels of pseudomonads increased from 2log(cfu/g) to values close to 6log(cfu/g) and were slightly higher than those of enterobacteria during the first fortnight of storage. Thirteen percent of the isolates were amino acid-decarboxylase positive and were identified as *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas fluorescens*. Both species decarboxylated ornithine, producing significant amounts of PU. *Pseudomonas cepacia* was a stronger PU producer than *Pseudomonas fluorescens*, which was also able to decarboxylate lysine, producing small amounts of CA. Lakshmanan et al. [24] also isolated pseudomonas from salted sardines able to decarboxylate both ornithine and lysine. In contrast, Du et al. [21] described HI production by *Pseudomonas fluorescens* isolated from tuna.

The Gram-negative bacteria isolates (both enterobacteria and pseudomonads) were potential producers of diamines (CA and PU) and they were isolated only during the first 2 weeks of ice storage.

The dominating group of Gram-positive bacteria was the Gram+ catalase+ cocci (staphylococci and micrococci), whose counts surpassed even those of Gram-negative populations; however, none of the isolates showed significant production of BA. Gram+ catalase+ cocci isolated from salted fish, however, have been reported to produce BA. Lakshmanan et al. [24] described that *Micrococcus luteus* isolated from salted sardines was the dominant halophilic amine-forming bacteria during ripening and produced CA. Hernández-Herrerero et al. [20] found that *Staphylococcus epidermidis* and *S. capitis* isolated during the ripening of salted anchovies are powerful HI-producing bacteria (up to 400 mg/l). In fresh fish, Baixas-Nogueras et al. [25] reported that most Gram+ catalase+ cocci isolates from hake stored in ice do not produce BA, although they grow to high counts throughout storage.

Twenty-eight percent of the 27 LAB isolates were able to decarboxylate amino acids, especially tyrosine. Two isolates showing a great tyrosine-decarboxylase activity were identified as *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. The other five positive isolates were *Lactobacillus brevis* and their aminogenic potential was variable, since three isolates were TY producers, while the remaining two did not decarboxylate tyrosine, but produced small amounts of CA and PU (lower than 50 mg/l). This variability confirms that the amino acid-decarboxylase capacity of bacteria depends on the strain. Dapkevicius et al. [26] found several LAB isolated from fermented mackerel that produced HI, TY, PU and/or CA.

Enterococci were found only at the last sampling point (day 23 of storage in ice). The four isolates were TY producers, the microbial group with the highest capacity to decarboxylate tyrosine (up to 2,000 mg/l TY). All enterococci were also able to produce  $\beta$ -phenylethylamine, but in much lower yields (below 50 mg/l), as described by Straub et al. [27] and Bover-Cid et al. [9]. Joosten and Northold [28] suggested the participation of the same enzyme in the production of both BA when TY is produced in large amounts, because the precursors phenylalanine and tyrosine have a similar chemical structure.

As a general rule, the Gram-positive bacteria (LAB and enterococci) isolates showed a higher potential to produce TY than diamines. Moreover, unlike Gram-negative bacteria, the decarboxylase positive strains among Gram-positive isolates were detected only after 2 weeks of storage. These findings are in agreement with the low and late occurrence of TY during the storage of anchovy [14].

Other BA (serotonin, agmatine and tryptamine) were analyzed, but they were not produced by any of the bacterial groups studied under the in vitro conditions applied. Spermidine and spermine were found at very low levels (below 5 mg/l) in the culture broth of all isolates. They are considered physiological amines needed for cellular growth [29]. These polyamines were also detected in the sterile decarboxylase medium at equivalent levels (data not shown), probably owing to the meat and yeast extract added.

Anchovy belongs to the *Engraulidae* family, which, like other pelagic fish, is characterized by a large quantity of free histidine in muscular tissue. This has been related to its high susceptibility to accumulate HI during spoilage, owing to the activity of histidine-decarboxylase positive microorganisms [7]. However, none of the isolated microorganisms studied decarboxylated histidine. Our results are in agreement with those of Lakshmanan et al. [24], who recorded PU- and CA-forming bacteria, but failed to detect HI-forming bacteria in sardine stored in ice. The lack of histidine-decarboxylating microorganisms may be due to the fact that prolific HI producers are mostly mesophilic bacteria, whose growth is not favored in the ice storage conditions used in this study.

**Acknowledgements** This study was supported by grant QUAL-POISS2 (FAIR.CT 96.3253). We thank the Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (CIRIT, 2001SGR-00132) of the Generalitat de Catalunya (Spain) for financial support.

## References

1. Mariné-Font A, Vidal-Carou MC, Izquierdo-Pulido M, Veciana-Nogués T, Hernández-Jover T (1995) *Ann Fals Exp Chim Toxicol* 88:119–140
2. Beutling D (1996) Biogenic amine in nutrition (Biogene Amine in der Ernährung). Springer, Berlin Heidelberg New York
3. Fernández-Salguero J, Mackie IM (1987) *Int J Food Sci Tech* 22:409–412
4. Huss HH (1995) FAO Fisheries Technical Paper 348:195
5. Pascual-Anderson MR, Calderón-Pascual V (2000) *Microbiología alimentaria. Metodología para alimentos y bebidas*. Díaz de Santos, S.A., Madrid, Spain
6. Halász A, Baráth A, Simon-Sarkadi L, Holzzapfel W (1994) *Trends Food Sci Tech* 5:42–49
7. López-Sabater EI, Rodríguez-Jerez JJ, Hernández-Herrero M, Roig-Sagués AX, Mora-Ventura MT (1996) *J Food Sci* 59:167–174
8. Lakshmanan R, Jeya Shakila R, Jeyasekaran G (2002) *Food Microbiol* 19:617–625
9. Bover-Cid S, Hugas M, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou MC (2001) *Int J Food Microbiol* 66:185–189
10. Novella-Rodríguez S, Veciana-Nogués MT, Roig-Sagués AX, Trujillo-Mesa AJ, Vidal-Carou MC (2002) *J Dairy Sci* 85:2471–2478
11. FDA (1995) Federal Register 149:39754–39756
12. EEC/91/493 (1991) *Diario Oficial Comunidades Europeas* L286:15–34
13. Stratton JE, Taylor SL (1991) *Microbiology of marine food products*. Kvenberg JE, New York
14. Veciana-Nogués MT, Albalá-Hurtado S, Mariné-Font A, Vidal-Carou MC (1996) *J Food Prot* 59:1218–1222
15. Bover-Cid S, Holzzapfel WH (1999) *Int J Food Microbiol* 53:33–41
16. Veciana-Nogués MT, Hernández-Jover T, Mariné-Font A, Vidal-Carou MC (1995) *J AOAC Int* 78:1045–1050
17. Kim SH, Price RJ, Morrissey MT, Field KG, Wei CI, An H (2001) *J Food Sci* 67:1515–1521
18. Kim SH, Price RJ (1999) *J Food Sci* 64:340–343
19. Kim SH, Field KG, Chang DK, Wei CI, An H (2001) *J Food Prot* 64:1556–1564
20. Hernández-Herrero M, Roig-Sagués AX, Rodríguez-Jerez JJ, Mora-Ventura MT (1999) *J Food Sci* 62:509–514
21. Du WX, Lin CM, Phu AT, Cornell JA, Marshall MR, Wei CI (2002) *J Food Sci* 67:292–301
22. Kim SH, Price RJ, Morrissey MT, Field KG, Wei CI, An H (2002) *J Food Sci* 67:1522–1528
23. Bennour M, El Marrakchi A, Bouchriti N, Hamana A, El Ouadaa M (1991) *J Food Prot* 54:784, 789–792
24. Lakshmanan R, Shakila RJ, Jeyasekaran G (2002) *Food Res Int* 35:541–546
25. Baixas-Nogueras S, Bover-Cid S, Veciana-Nogués MT, Vidal-Carou MC (2003) *Eur Food Res Tech* 217:164–167
26. Dapkevicius MLNE, Nout MJR, Rombouts FM, Houben JH, Wymenga W (2000) *Int J Food Microbiol* 57:107–114
27. Straub BW, Kicherer M, Schilcher SM, Hammes WP (1995) *Z Lebensm Unters Forsch* 201:79–82
28. Joosten HJ, Northold MD (1987) *Neth Milk Dairy J* 41:259–280
29. Bardócz S (1995) *Trends Food Sci Tech* 6:341–346

## **13. EFECTO DE LA EVISCERACIÓN EN EL PERFIL DE AMINAS BIÓGENAS DURANTE LA MADURACIÓN DE ANCHOAS EN SAL**

**Pons-Sánchez-Cascado, S.; Veciana-Nogués, M. T.; Vidal-Carou, M. C. (2003).** Effect of delayed gutting on biogenic amine contents during ripening of European anchovies. *Eur Food Res Technol*, 216: 489-493.

### **13.1. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO**

El 80% de la captura del boquerón se destina a la elaboración de anchoas maduras en sal (Pérez-Villareal y Pozo, 1992). La forma de preparación de este tipo de semiconserva tan apreciada en los países mediterráneos se remonta a tiempos antiguos y consiste básicamente en un proceso de salazón y fermentación.

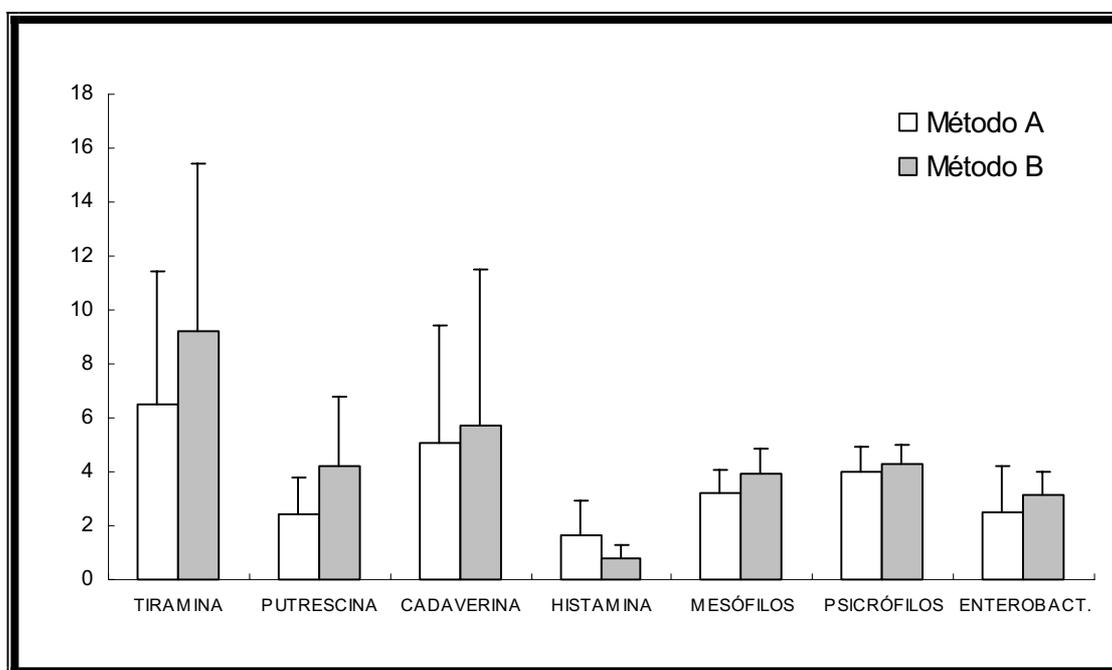
Habitualmente, cuando el pescado llega a la industria, se lava y posteriormente se descabeza y eviscera antes de su inmersión en sal, donde el boquerón irá madurando en un tiempo comprendido entre 3 meses y un año en función de diferentes factores como la temperatura y la presión aplicada. Cuando llegan grandes cantidades de pescado a las industrias, es común que el pescado sea inmerso en sal a su llegada y poco tiempo después se descabece y eviscere.

Este estudio se planteó con el objetivo de valorar si existen diferencias significativas en parámetros microbiológicos y aminas biógenas entre las dos formas más habituales del procesado de las semiconservas de anchoas en sal. Para ello, se tomaron y analizaron muestras iniciales y a las semanas 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 de siete lotes que fueron eviscerados y descabezados a su

llegada a la industria (Método A) y siete lotes más que previamente a su evisceración y descabezado fueron inmersos en sal (Método B).

### 13.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El valor promedio de los recuentos microbianos y los valores de aminas biógenas iniciales fueron bastante similares entre los 7 lotes utilizados para cada uno de los métodos, con lo que se asumió que la contribución de la materia prima en la producción de aminas biógenas fue similar para los dos métodos utilizados (Figura 13.1).



**Figura 13.1.** Recuentos bacterianos (log ufc/g) y contenidos de las principales aminas biógenas (mg/kg) en materia prima.

Las enterobacterias desaparecieron a partir de la segunda semana de maduración. En cambio las bacterias mesófilas y psicrófilas fueron decreciendo durante los primeros 15 días hasta alcanzar un nivel de 2,5 log ufc/g que se mantuvo constante hasta el final del proceso.

Respecto a las aminas biógenas, se pudo observar dos comportamientos diferentes:

- Los niveles de espermina, espermidina, serotonina, feniletilamina y triptófano se mantuvieron constantes durante todo el proceso y no se observaron diferencias entre los métodos.
- Los niveles de histamina, tiramina, putrescina, cadaverina y agmatina aumentaron a lo largo de la maduración, siendo su concentración superior en las anchoas elaboradas con el método B. Esto significa que la evisceración o la no evisceración en la etapa inicial del proceso tiene una importancia significativa en la producción de estas aminas biógenas.

Dentro de este 2º grupo de aminas, la histamina y la putrescina no superaron los 10 mg/kg, mientras que la cadaverina, agmatina y tiramina mostraron valores en la 5ª semana de maduración de 20-30 mg/kg. Estos niveles se mantuvieron constantes y posteriormente descendieron entre 5-10 mg/kg durante las semanas 14-16. (Tabla 13.1).

**Tabla 13.1.** Evolución de las aminas biógenas (mg/kg) durante la maduración de las anchoas.

SEMANAS	HISTAMINA		TIRAMINA		PUTRESCINA		CADAVERINA		AGMATINA	
	Mét. A	Mét. B	Mét. A	Mét. B	Mét. A	Mét. B	Mét. A	Mét. B	Mét. A	Mét. B
0	1,63	0,78	6,48	9,21	2,45	4,21	5,05	6,63	13,14	13,08
2	1,06	3,02	4,54	18,07	2,14	3,06	3,31	15,05	6,89	17,21
4	2,00	6,31	12,55	21,5	5,22	5,14	7,39	25,11	14,85	27,86
6	2,2	5,08	11,8	20,82	4,49	6,2	7,6	24,3	13,08	28,85
8	1,17	3,55	15,9	18,9	4,01	6,98	10,31	20,43	17,02	25,8
10	1,64	5,51	12,02	20,05	4,73	7,61	11,7	22,8	15,6	22,6
12	1,64	4,31	15,21	18,33	4,81	6,38	10,45	19,35	17,13	22,33
14	1,66	4,72	11,81	18,53	6,03	5,35	6,58	22,72	20,23	24,35
16	1,86	4,6	11,2	15,9	4,37	6,4	7,78	12,8	14,95	17,22

Por tanto, el retraso en la evisceración produce un aumento en los niveles de histamina, tiramina, putrescina, cadaverina y agmatina.



**Pons-Sánchez-Cascado, S.; Veciana-Nogués, M. T.; Vidal-Carou, M. C. (2003).** Effect of delayed gutting on biogenic amine contents during ripening of European anchovies. *Eur Food Res Technol*, 216: 489-493.



Sofia Pons-Sánchez-Cascado ·  
M. Teresa Veciana-Nogués · M. Carmen Vidal-Carou

## Effect of delayed gutting on biogenic amine contents during ripening of European anchovies

Received: 4 November 2002 / Revised: 9 January 2003 / Published online: 20 March 2003  
© Springer-Verlag 2003

**Abstract** The effect of delayed gutting on biogenic amine formation during ripening of European anchovies (*Engraulis encrasicolus*) was studied. The main difference between the two processes was the use of gutted or ungutted fish in the first step of ripening. Biogenic amines and microbial counts were studied in seven batches of samples taken during manufacturing from fresh anchovies and from anchovies throughout ripening. The formation of amines commonly related to fish spoilage (histamine, tyramine, cadaverine, putrescine and agmatine) was significantly higher in the first step of ripening of batches in ungutted fish. In contrast, no differences were observed between the content of the natural polyamines spermine and spermidine.

**Keywords** Anchovy · Ripening · Biogenic amines · Histamine · Cadaverine · Tyramine

### Introduction

Biogenic amines are essential for many physiological functions but their consumption can be hazardous in high quantities [1]. The toxic effects of biogenic amines are strongly dependent on the efficiency of detoxification mechanisms [2]. Certain drugs, such as monoamine oxidase inhibitors, decrease the efficiency of these detoxification systems. Some food migraines are related to biogenic amines, particularly tyramine (TY) and  $\beta$ -phenylethylamine (PHE) [3]. Histaminic intoxication is the main health problem associated with high biogenic amine content in fish. Other amines, such as putrescine (PU) or cadaverine (CA), can also be dangerous because they increase histamine toxicity [2]. Some biogenic amines, mainly HI, TY, PU, CA and agmatine (AG) can

be indicators of freshness or spoilage in fish [4]. However, a legal limit has been established only for HI. The European Union regulations set a maximum average value of 100 mg/kg in fresh and canned fish, whereas in ripened products, like anchovies, the average histamine content must be lower than 200 mg/kg [5].

Ripened anchovies are semi preserved products that are particularly appreciated in Mediterranean countries. They are prepared from fresh anchovies (*Engraulis encrasicolus*) by salting and ripening, following traditional methods that differ slightly from region to region. The values reported for histamine and other biogenic amines from commercial samples vary greatly from undetected to higher than 1000 mg/kg [6, 7, 8, 9, 10, 11]. In most cases HI contents in anchovies surpass the contents found in other fish derivatives [6, 9, 11]. However, ripened anchovies are not a common cause of histamine intoxication; only one outbreak has been reported [12].

The high variability in biogenic amine contents in ripened anchovies has not been fully explained but it appears to depend on multiple factors. The quality of the raw material (fresh anchovy), ripening conditions and the time and the storage conditions could be critical to the accumulation of these amines. For example, the extent of amine formation may depend on the pressure applied during ripening [13]; storage temperature also modifies the biogenic amine content [14, 15].

The ripening of anchovies is a complex process based upon enzymatic activity. A strong decrease in water activity is due to the immersion of fish in solutions with high concentrations of NaCl, which inhibits the growth of undesirable microorganisms. Some microorganisms, especially yeast, grow during the ripening period but their role in biogenic amine formation is not significant [16]. The intestines of anchovy are crucial for ripening. Partial evisceration is commonly applied because complete evisceration followed by rigorous rinsing delays ripening; the product does not acquire its characteristic flavour [17].

S. Pons-Sánchez-Cascado · M. T. Veciana-Nogués ·  
M. C. Vidal-Carou (✉)  
Unitat de Nutrició i Bromatologia, Facultat de Farmàcia,  
Universitat de Barcelona,  
Av. Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, Spain  
e-mail: mcvidal@farmacia.far.ub.es

The effect of fish evisceration on biogenic amine formation is controversial. The formation of PU and CA is higher in whole (ungutted) fish than in separated fillets [18]. However, reverse results were observed in gutted fish, where the contents of HI, CA and PU were higher in fillets [19].

There are two traditional methods to process fish in the manufacturing plant. In one method, the head is removed and the fish is partially gutted before immersion in brine, immediately after arrival at the plant. In the second method, the whole fish is immersed in brine and the head and gut are removed afterwards. This late removal implies that the first days of ripening occur in presence of the whole anchovy gut. We study whether this factor is critical to the variability in biogenic amine contents in semi-preserved anchovies.

## Materials and methods

**Samples.** Fresh anchovies (*E. encrasicolus*) caught in the Mediterranean Sea (Golfo de Rosas) from May to September were used. The fish, refrigerated in flaked ice, reached the factory within a maximum of 6–8 h. First, the fish is dry salted to prevent the development of microorganisms and to facilitate manipulation. Then it is beheaded, gutted and immersed in brine until the end of the ripening period (Method A). However, when the amount of fish exceeds the factory's capacity to process it in a short time (maximum one day), whole anchovies are directly immersed in brine. After no more than a week the fish is beheaded, gutted and immersed in a new brine solution to finish the ripening process (Method B). In both cases, the length of ripening depends on the season but not on the method. High temperatures imply shorter ripening periods but these must always exceed two months. Once ripening is completed, the anchovies can be preserved in oil or brine.

Seven monitored processes followed Method A and another seven followed Method B. Samples were taken from fresh anchovies upon delivery to the factory (time zero) and from samples immersed in brine after 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 and 16 weeks.

**Analytical methods.** Ten biogenic amines were measured by high performance liquid chromatography [20]. The method involves an ion-pair chromatographic procedure on a C<sub>18</sub> reversed-phase column with a post-column reaction with *o*-phthalaldehyde. The

following microorganisms were found: mesophilic microorganisms in Tryptic Soy Agar (TSA) medium incubated at 32 °C for 72 h, psychrotrophic microorganisms in TSA at 20 °C for 4 days and microorganisms belonging to the *Enterobacteriaceae* family in Violet Red Bile Glucose agar (VRBG) at 37 °C for 18–24 h [21]. Data were analysed using SPSS 10.0 for Windows.

## Results and discussion

Fresh anchovies (*E. encrasicolus*) showed high variability in microbial counts and total biogenic amine contents between batches (Table 1). This fish spoils quickly because of its small size and also due to the spread of gut enzymes and microbes when the stomach bursts [22]. This could explain the variability observed in biogenic amine content and microbial counts. In spite of the variability, mesophilic, psychrotrophic and enterobacteria microbial counts were in the same range as those reported for fresh *E. encrasicolus* [15, 23, 24]. There was no significant difference in total biogenic amine contents in raw fish from Methods A and B (Table 1). The contribution of the raw material to the total biogenic amine content in final products was low and the same for both methods. Counts of enterobacteria, which are considered producers of HI and CA, were slightly higher in samples from method B. However, these higher counts were not associated with higher amine contents of the initial samples from this method. This result is consistent with the lack of significant differences of microbial counts between samples from the two methods.

AG was the prevailing amine, which is consistent with previous studies reporting this amine as the first produced during the storage of *E. encrasicolus* [4]. Contents of HI, TY, PU and CA, which are frequently the main amines found in food, were lower than those usually reported for ripened anchovies [6, 7, 8, 9, 10, 11], but similar to those in fresh anchovies [15, 25] and in fresh samples of other fish [14, 26].

In the samples taken during ripening, the microbial counts differed significantly from those in fresh *E.*

**Table 1** Contents of biogenic amines (mg/kg) and microbial counts (log CFU/g) in samples of fresh anchovies used as raw material

	Method A (n=7)		Method B (n=7)	
	Average (SD) <sup>a</sup>	Range	Average (SD)	Range
Spermidine	6.40 (4.15)	1.35–12.02	6.05 (3.15)	1.35–10.70
Spermine	5.05 (2.20)	2.20–7.20	4.90 (2.02)	2.20–7.10
Serotonin	0.85 (0.85)	nd–2.25	0.80 (1.05)	nd–2.20
Phenylethylamine	0.05 (0.10)	nd–0.30	0.40 (0.90)	nd–2.40
Tryptamine	–	nd <sup>b</sup>	0.30 (0.45)	nd–0.90
Agmatine	13.14 (12.70)	0.65–35.00	13.08 (0.16)	0.65–24.70
Putrescine	2.45 (1.35)	0.40–4.00	4.20 (2.60)	0.40–8.50
Cadaverine	5.05 (4.40)	nd–10.95	5.65 (5.75)	nd–15.75
Histamine	1.65 (1.30)	0.40–3.50	0.80 (0.50)	nd–1.40
Tyramine	6.50 (4.95)	0.80–8.50	9.20 (6.20)	nd–2.40
TBA <sup>c</sup>	41.90 (23.59)	10.10–68.10	42.14 (21.99)	11.60–75.80
Mesophiles	3.25 (0.85)	2.50–5.00	3.95 (0.88)	3.20–4.90
Psychrotrophes	4.00 (0.95)	2.30–4.95	4.30 (0.70)	3.80–5.50
Enterobacteria	2.50 (1.72)	nd–3.80	3.13 (0.89)	2.50–4.30

<sup>a</sup> Standard deviation

<sup>b</sup> Not detected

<sup>c</sup> Total biogenic amines

**Table 2** Contents of natural polyamines and minor amines (mg/kg) in ripening samples

	Method A (n=54)		Method B (n=56)	
	Average (SD) <sup>a</sup>	Range	Average (SD)	Range
Spermine	3.42 (1.65)	0.45–6.60	3.69 (3.25)	0.40–9.00
Spermidine	4.60 (3.32)	0.80–11.15	5.75 (3.32)	0.90–13.65
Serotonin	1.44 (0.46)	nd–4.50	1.15 (1.08)	nd–3.50
$\beta$ phenylethylamine	0.92 (0.15)	nd–3.70	1.05 (0.82)	nd–2.75
Tryptamine	0.04 (0.30)	nd–1.10	0.77 (0.50)	nd–2.70

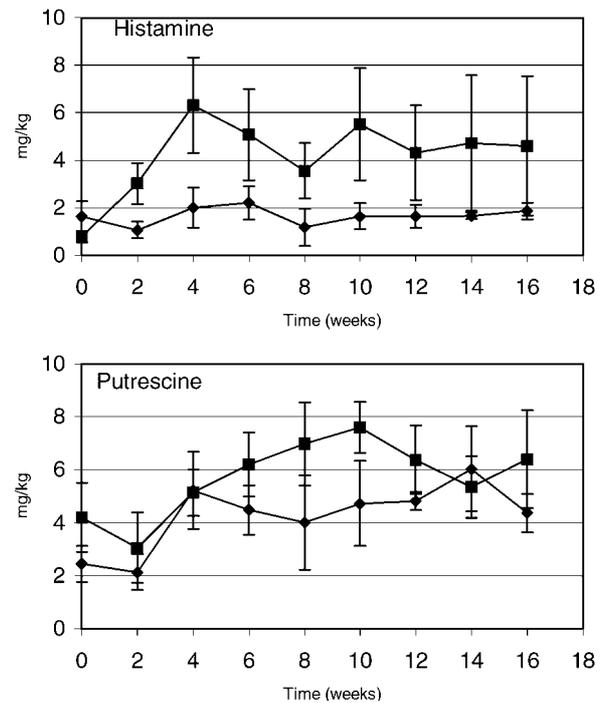
*encrasicholus*. After day 15, enterobacteria had disappeared and mesophilic and psychrotrophic counts decreased until an average value of less than 2.5 log CFU/g. These microbial counts were constant until the end of the study. These changes followed the standard pattern for a ripening process. The first phase corresponded to salt penetration in the muscle until saturation and the second to maturation [27]. The time required to achieve the effect of salt saturation depends on temperature but, in general, one to two weeks are enough to prevent the development of the usual fish flora [16, 24].

Concerning biogenic amine contents and taking into account their behaviour during ripening, two groups can be differentiated: one, which includes natural polyamines and minor amines (SE, PHE and TR), has constant levels during ripening and the other, which includes the remaining amines, shows an increase throughout this period.

For natural polyamines and the minor amines no significant differences between samples from the two methods were found (Table 2). SE was detected in a high number of samples during ripening but at lower concentrations than other amines. In contrast, PHE and TR were found only in a few samples, with contents generally lower than 1 mg/kg.

For AG, CA, TY, HI and PU, in spite of the wide variability, statistical differences were found between contents of samples from the two methods, the average contents being higher in method B, in which the first days of ripening occur in presence of the whole anchovy gut. The accumulation of AG, CA, TY, HI and PU has been related to the first days of anchovy spoilage, whereas the occurrence of high levels of PHE and TR has been associated with the use of spoiled anchovies as raw material or processed anchovies stored for a long time [4, 14]. Therefore, the occurrence of low levels of these minor amines in ripened anchovies could be associated with the use of fresh raw fish.

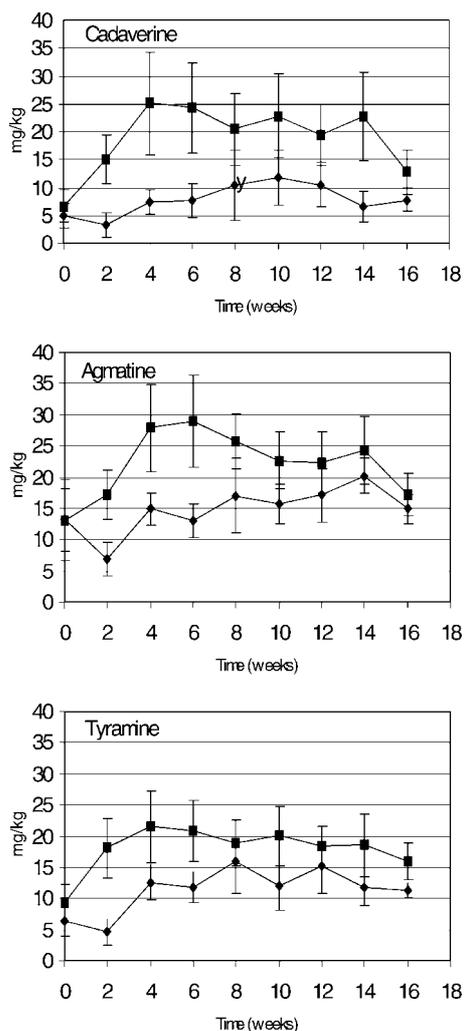
The differences in some biogenic amine production between the two methods have been associated with the first stage of ripening. According to the state of amine formation during this stage, we could also differentiate two groups—HI and PU whose contents did not exceed 10 mg/kg (Fig. 1) and CA, AG and TY (Fig. 2), which reached 20–30 mg/kg. In general, these figures show that amine production was higher in Method B. The greater formation of CA, AG, TY and HI corresponded to the first days of ripening as their contents after five weeks had little variation. Thus, the major formation of amines

**Fig. 1** Contents of histamine and putrescine in samples taken during ripening from Method A (filled circles) and Method B (filled squares)

occurred before the fish was saturated with salt. After this, the amine production stopped or decreased. The exception was PU (Fig. 1), whose levels increased slowly until ten weeks of ripening.

Although we did not find previous data about differences in biogenic amine contents of ripened anchovy with and without gut, some authors reported a higher formation of HI in other ungutted fish products when compare to those gutted, salted and dried or ripened [28, 29, 30]. Enterobacteria are related to biogenic amine production in fish but other bacteria, such as Lactobacilli [31] could also be involved. In addition, amine formation is related to the remaining enzyme activity from halophilic microorganisms, even when low bacterial counts were found [31].

The lack of statistical differences between microbial counts in samples from the two methods, due to the high variability observed, makes it difficult to associate the production of amines with the growth of a particular group of microorganisms. However, as endogenous amino acid decarboxylase have not been described in fish, we



**Fig. 2** Contents of cadaverine, agmatine and tyramine in samples taken during ripening from Method A (filled circles) and Method B (filled squares)

conclude that small differences in bacterial counts during the first weeks of ripening could be responsible for the significant differences in the contents of some biogenic amines in the final products. In addition, the large formation of these amines in Method B, in which ripening starts in the presence of gut, is consistent with higher proteolytic enzyme activity. The degree of proteolysis is higher in partially and totally ungutted than in gutted fish [23].

In any case the final levels of biogenic amines in salted anchovies, even those obtained in Method B, were lower than those accumulated in anchovy spoilage [4]. Likewise, these levels were lower than those reported by other authors for ripened anchovies from local markets [5, 7, 11]. Therefore, the formation of biogenic amines during the two ripening processes studied is considered as moderate. Thus, the highest HI content was less than 20 mg/kg and the mean content of the final products was 20 times lower than the maximum allowed by European

regulation [5]. Moderate increases of HI throughout ripening have also been reported for Italian anchovies [15] together with moderate increases in TY and CA and high increases in PU, mainly when ripening occurred without pressure [13].

In conclusion, the delay in gutting anchovies before ripening increases formation of AG, TY, CA, HI and PU, particularly in the first stage of ripening. The higher microbial or bacterial enzyme activity in ungutted anchovies than in partially gutted fish could explain the higher production of some biogenic amines. Therefore, this study confirms that the delay in gutting during manufacturing may contribute to the high variability in biogenic amine contents of semi-preserved anchovies. Likewise, gutting fish immediately after arrival at the factory seems to reduce the formation of these compounds, which mainly occurred in the first weeks of ripening before the fish reached salt saturation. The techniques that favour rapid salt saturation of fish flesh (by applying pressure, for instance) can also be useful in reducing the undesirable accumulation of some biogenic amines.

## References

1. Brink B, Damick C, Joosten HML (1990) *Int J Food Microbiol* 11:73–84
2. Lehane L, Olley J (2000) *Int J Food Microbiol* 58:1–37
3. Joosten HML (1988) *Neth Milk Dairy J* 42:25–42
4. Veciana-Nogués MT, Albalá-Hurtado S, Mariné-Font A, Vidal-Carou MC (1996) *J Food Protect* 59:1218–1222
5. Consejo de la Comunidad Económica Europea (CEE) (1991) 91/493/CEE. *Diario Oficial Comunidades Eur* L286:15–34
6. Veciana-Nogués MT, Vidal-Carou MC, Mariné-Font A (1989) *J Food Sci* 54:1653–1655
7. Yen GC, Hsieh CL (1991) *J Food Sci* 56:158–160
8. Soares VFM, Glória MBA (1994) *J Food Compos Anal* 7:102–109
9. Yeannes MI, Casales MR (1995) *Alimentaria* 262:93–98
10. Marabelli R, Iovino F, Ferrantelli V (1999) *Ing Alimentare Conserve Anim* 15:29–31
11. Valls JE, Bello RA, Kodaira MS (1999) *J Aquat Food Prod Technol* 8:79–91
12. Murray CK, Hobbs G, Gilbert RJ (1982) *J Hyg Cam* 88:215–220
13. Draisci R, Marchiafava C, Cecilia A, Palleschi G, Augelli R, Cavalli S (1999) *Ital J Food Sci* 11:347–354
14. Veciana-Nogués MT, Mariné-Font A, Vidal-Carou MC (1997) *J Agr Food Chem* 45:1385–1389
15. Sebastio P, Ambroggi F, Baldratti G, Gola S, Saccani G, Draisci R, Lucentini L (1998) *Ind Conserve* 73:193–205
16. Vieites JM, González V, Delgado ML, Leira F (1996) *Alimentaria* 275:121–126
17. Voskresensky NA (1965) In: Borstrom G (ed) *Fish as food*. Academic Press, New York, vol 3, pp 107–131
18. Haaland H, Arnesen E, Njaa LR (1990) *Int J Food Sci Technol* 25:82–87
19. Fernández-Salguero J, Mackie IM (1987) *Int Food Sci Technol* 22:385–390
20. Veciana-Nogués MT, Hernández-Jover T, Mariné-Font A, Vidal-Carou MC (1995) *J AOAC Int* 78:1045–1050
21. Pascual Anderson MR, Calderón Pascual V (2000) *Microbiología de los alimentos: metodología analítica para alimentos y bebidas*. Editorial Díaz de Santos, pp 122–125

22. Martínez A, Gildberg A (1988) *Int J Food Sci Technol* 23:185–194
23. Pérez-Villarreal B, Pozo R (1992) In: *Quality assurance in the fish industry*. Elsevier Science Publishers, pp 157–167
24. Hernández-Herrero MM, Roig-Sagués AX, López-Sabater EI, Rodríguez-Jerez JJ, Mora-Ventura T (1999) *J Food Sci* 64:344–347
25. Draisci R, Volpe G, Lucentini L, Cecilia A, Federico R, Palleschi G (1998) *Food Chem* 62:225–232
26. Ingles DL, Back JF, Gallimore D, Tindalle R, Shaw KJ (1985) *J Food Sci* 36:402–406
27. Cheftel H (1965) In: *Fish as food*. Academic Press, vol 3, pp 219–225
28. Mendes R, Gonçalves A, Nunes ML (1999) *J Biochem* 23:295–306
29. Chakrabarti R (1991) *Fish Technol* 28:59–62
30. Hanson SW, Knowles MJ, Al-Kasadi AS (1985) *FAO Fish Rep* 317:386–392
31. Karnop G (1988) *Arch Lebensmittelhyg* 39:54–84



## **14. EVOLUCIÓN DE PARÁMETROS QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS DURANTE LA ELABORACIÓN INDUSTRIAL DE SEMICONSERVAS DE ANCHOAS EN SAL**

**Pons-Sánchez-Cascado, S.; Veciana-Nogués, M. T.; Bover-Cid, S.; Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, M. C. (2005).** Volatile and biogenic amines, microbiological counts, and bacterial amino acid decarboxylase activity throughout the salt-ripening process of anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *J Food Protect*, 68 (7). (En prensa).

### **14.1. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO**

Tal y como se ha comentado en el capítulo anterior, existen dos formas de preparación de las anchoas en sal: una es eviscerándolas al llegar a la industria y en la segunda, la evisceración se realiza tras un corto período de tiempo en el que el pescado ha estado sumergido en sal. Una vez comprobado que el retraso en la evisceración producía un aumento en la concentración de algunas aminas biógenas en el producto final pero que sus contenidos estaban lejos de ser tóxicos, siguiendo criterios tanto legislativos (CEE/439/91) como propuestos por algunos autores (Brink y col., 1990), se planteó el estudio conjunto de la evolución de diversos parámetros físicos, químicos y microbiológicos y sus relaciones en el proceso del anchoado. Hay que destacar que existen trabajos anteriores en los que se estudia la formación de aminas biógenas durante la maduración de anchoas en sal (Veciana-Nogués y col., 1996) y otros que abordan el estudio de la capacidad aminoácido descarboxilasa de microorganismos aislados a lo largo del proceso de maduración (Rodríguez-Jerez y col., 1993; Rodríguez-Jerez y col., 1994b;

Hernández-Herrero y col., 1999a), pero no existe hasta el momento, según nuestros datos, ningún trabajo que trate el estudio comparativo de estos dos aspectos en el proceso de anchoado a nivel industrial.

En este trabajo se contempló el seguimiento del pH, contenido de agua, índice de proteólisis, nitrógeno básico volátil total, aminas biógenas, recuentos y aislamientos de microorganismos e identificación de aquellas bacterias capaces de producir aminas biógenas *in vitro* en tres lotes (1, 2 y 3) de anchoas marinadas en sal, elaboradas por un industrial artesano de la costa barcelonesa a lo largo de un mismo período de tiempo. Este productor realizaba la maduración en salmuera bajo presión durante un tiempo de 26 semanas, tiempo sensiblemente más largo al necesario para la maduración cuando no se aplica presión. Se tomaron muestras de la materia prima (boquerón fresco) y tras 0,5, 1, 2, 3, 8, 12, 17, 22 y 26 semanas de maduración. Igualmente se tomaron muestras (correspondientes a 31 semanas post-captura) del producto final listas para el consumo, envasadas en aceite y al vacío después de que el producto madurado en salmuera fuera parcialmente desalado y fileteado.

### **14.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los recuentos microbianos en los boquerones usados como materia prima fueron generalmente superiores en uno de los lotes (lote 1), especialmente en el caso de enterobacterias y enterococos. Durante la maduración los contenidos de tiramina, amina biógena de formación mayoritaria, incrementaron alcanzando niveles superiores a los de las materias primas (Figura 14.1). Los valores más elevados de esta amina se alcanzaron en el lote 1 (hasta 90 mg/kg) en el que la carga bacteriana inicial fue claramente superior. Los niveles de histamina, putrescina, cadaverina y agmatina también incrementaron significativamente en el lote 1, mientras que se mantuvieron constantes o mostraron un ligero aumento en los lotes 2 y 3. Los niveles de histamina, única amina biógena cuyo máximo está regulado, no superaron en ningún caso los 20 mg/kg.

El músculo del boquerón se fue acidificando durante la maduración y los niveles del índice de proteólisis y el nitrógeno básico volátil total fueron aumentando. Tal y como muestra la figura 14.2 no se detectaron diferencias entre lotes en cuanto a los valores de pH, pero éstas sí se manifestaron al

determinar el índice de proteólisis y el nitrógeno básico volátil total. El lote 1, igual que había pasado para las aminas biógenas, mostró los valores superiores. Ésto significa que la carga inicial tiene especial relevancia para la acumulación de determinados compuestos durante la maduración en salmuera, ya que los recuentos de los tres lotes después de 1 semana no mostraron diferencias.

En las muestras fileteadas y listas para el consumo, tanto los niveles de algunas aminas biógenas como los recuentos de microorganismos resultaron superiores a los correspondientes al punto final de maduración (26 semanas, figura 14.3). El incremento en la carga bacteriana se puede asociar a una doble causa: el riesgo de contaminación que comporta la manipulación del producto para filetearlo y la disminución de la protección frente al desarrollo de microorganismos ligada al proceso de desalado. Los resultados indican que las formas de comercialización demandadas por el consumidor actual, comportan un incremento en el riesgo de acumulación de aminas biógenas frente al que implicaba la comercialización tradicional del producto sumergido en salmuera. El envasado al vacío, aplicado por el productor como medida adicional, no parece suficiente para controlar la formación de estos compuestos en el período transcurrido desde el final de la elaboración hasta el consumo.

Finalmente, de las muestras estudiadas se aislaron 172 colonias, de las cuales sólo 20 mostraron capacidad para descarboxilar aminoácidos *in vitro*. La tabla 14.1 muestra los microorganismos identificados y las aminas biógenas que produjeron en las condiciones *in vitro* establecidas. Aunque la tiramina fue la amina biógena predominante durante la evolución del marinado, ésta sólo fue producida por el 12 % de las bacterias identificadas y en niveles muy inferiores al de la formación de otras aminas como la histamina que fue producida por el 70 % de las cepas identificadas.

Los resultados muestran una aparente discordancia entre las concentraciones de aminas biógenas formadas durante la maduración y la capacidad *in vitro* de producir éstas por parte de los microorganismos aislados, que podría estar relacionada con diferentes factores. La expresión de la actividad aminoácido descarboxilasa puede estar afectada por las diferentes condiciones *in vitro* / *in vivo* ya que tanto la temperatura como las condiciones del medio son distintas. Además, los cambios más significativos se dan en el lote que presenta una mayor carga microbiana. Esta carga inicial y no un aumento en el contenido de microorganismos con capacidad aminoácido descarboxilasa,

quizás es la responsable de los niveles de aminas biógenas, índice de proteólisis y nitrógeno básico volátil total que se dan durante la maduración.

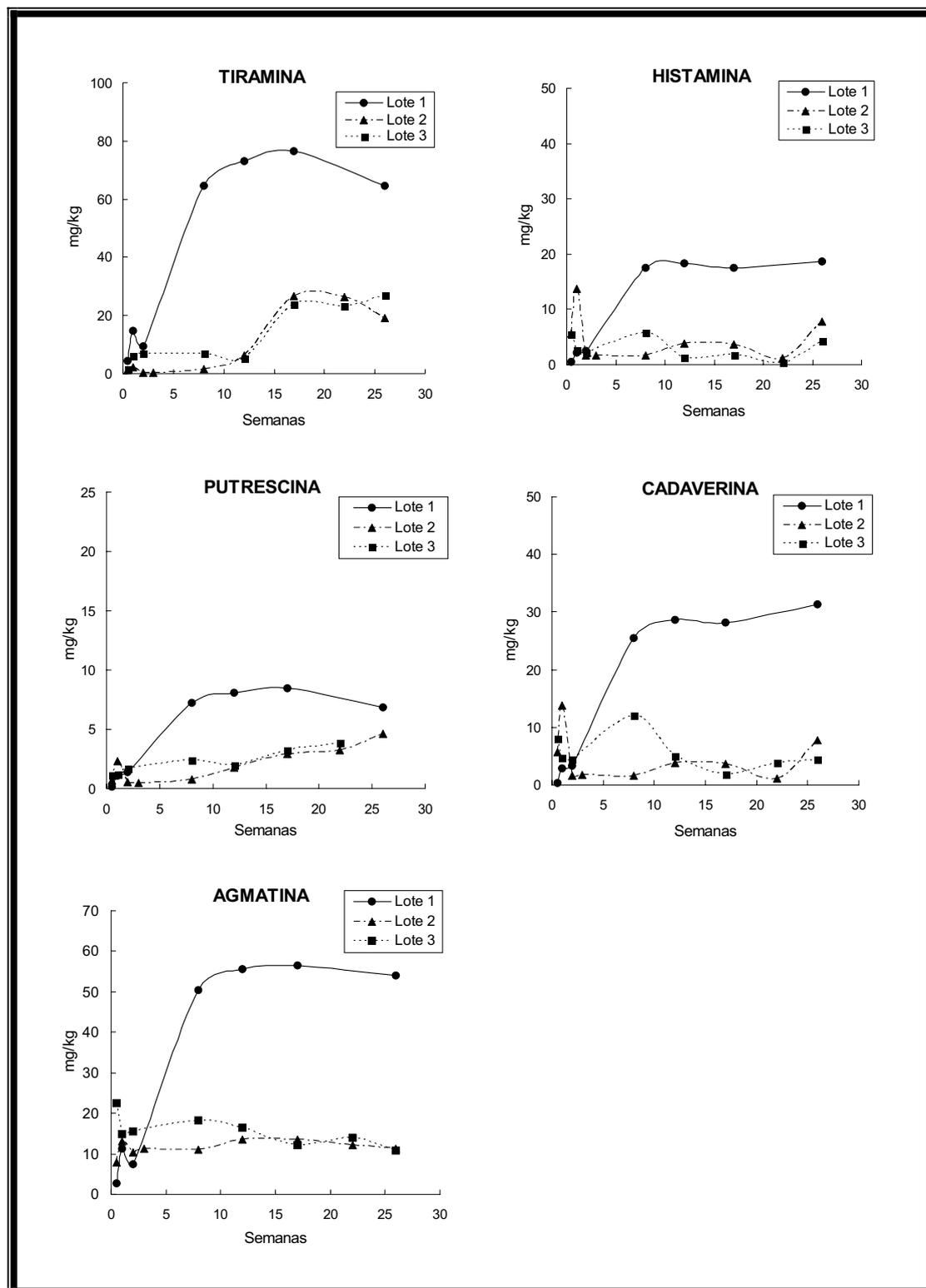


Figura 14.1. Evolución de las principales aminas biógenas (mg/kg) durante la maduración de anchoas en sal.

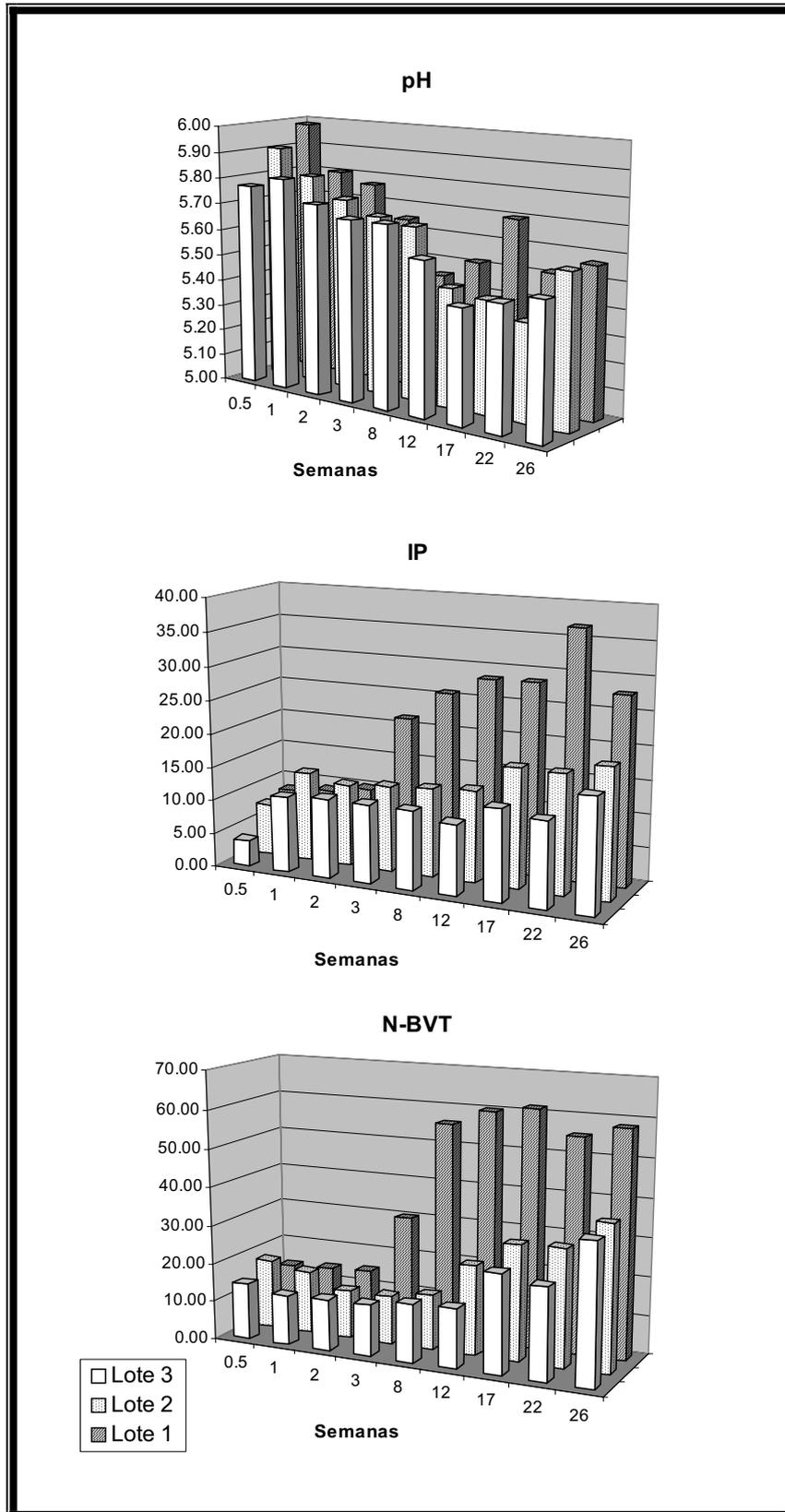
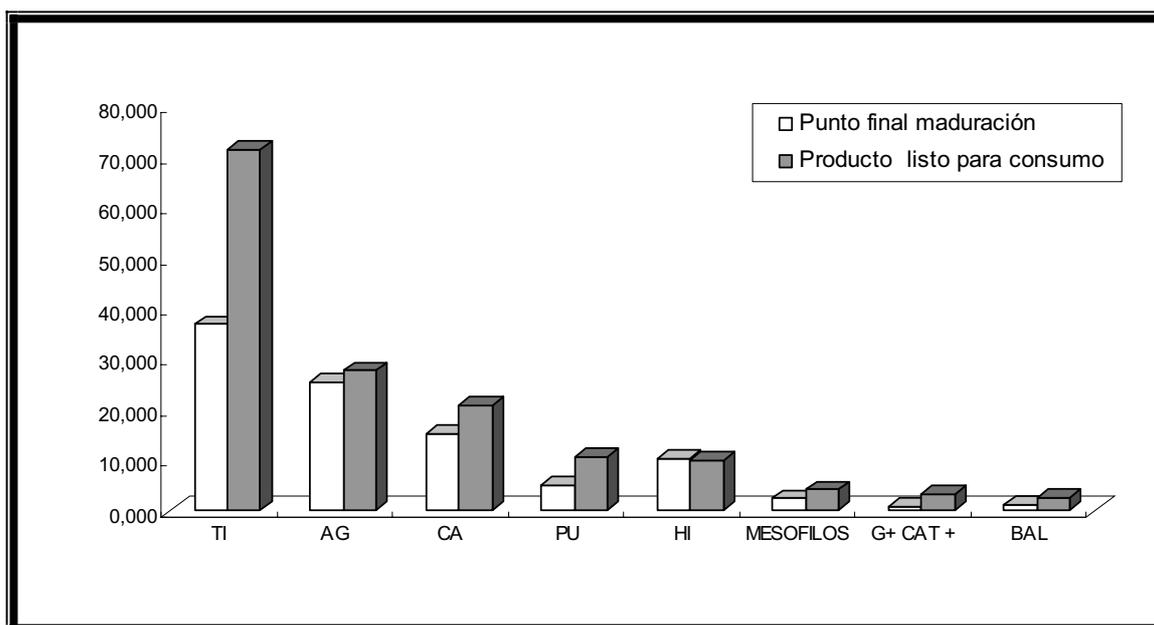


Figura 14.2. Evolución del pH, índice de proteólisis (IP, %) y nitrógeno básico volátil total (N-BVT; mg/100 g) durante la maduración de anchoas en sal.



**Figura 14.3.** Promedio de los contenidos de tiramina (TI), agmatina (AG), cadaverina (CA), putrescina (PU) e histamina (HI) expresados en mg/kg y bacterias mesófilas, cocos gram positivos catalasa positiva y bacterias del ácido láctico (BAL) expresados en log ufc/g en muestras en el punto final de la maduración de anchoas en sal y en producto listo para el consumo.

**Tabla 14.1.** Capacidad aminogénica de las cepas aisladas e identificadas durante el proceso de marinación de anchoas en sal.

Especies	TI <sup>(1)</sup>	PU	CA	HI
<i>Enterobacter cloacae</i>	ND <sup>(2)</sup>	20-150 <sup>(3)</sup>	ND	ND
<i>Kocuria varians</i>	ND - 50	ND	ND	325 - 530
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	ND - 115	15 - 1450	40 - 90	ND - 485
<i>Aerococcus viridans</i>	ND	465 - 825	44 - 55	ND

<sup>(1)</sup> TI=Tiramina, PU=Putrescina, CA=Cadaverina, HI=Histamina

<sup>(2)</sup> No detectado

<sup>(3)</sup> Concentración en mg/l

**Pons-Sánchez-Cascado, S.; Veciana-Nogués, M. T.; Bover-Cid, S.; Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, M. C. (2005).** Volatile and biogenic amines, microbiological counts, and bacterial amino acid decarboxylase activity throughout the salt-ripening process of anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *J Food Protect*, 68 (7). (En prensa).



# Volatile and Biogenic Amines, Microbiological Counts, and Bacterial Amino Acid Decarboxylase Activity throughout the Salt-Ripening Process of Anchovies (*Engraulis encrasicolus*)

S. PONS-SÁNCHEZ-CASCADO, M. T. VECIANA-NOGUÉS, S. BOVER-CID, A. MARINÉ-FONT, AND  
M. C. VIDAL-CAROU\*

Departament de Nutrició i Bromatologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n 08028 Barcelona, Spain

MS 04-481: Received 12 October 2004/Accepted 19 February 2005

## ABSTRACT

Chemical and microbiological parameters were studied during the industrial production of salt-ripened anchovies (*Engraulis encrasicolus*). Gradual acidification and increases in the proteolysis index and in total volatile basic nitrogen were observed. At the end of the maturing process, the values reached pH  $5.55 \pm 0.03$ ,  $21.33 \pm 5.82\%$ , and  $44.06 \pm 12.47$  mg per 100 g, respectively. In the three studied anchovy batches, the biogenic amines tyramine, histamine, putrescine, cadaverine, and agmatine increased during ripening. The highest values were found in the batch where initial microbial load was highest (batch 1), especially for enterobacteria and enterococci. Tyramine was the most abundant amine, reaching values from non-detectable to 90 mg/kg, whereas histamine did not surpass 20 mg/kg. Among the microorganisms isolated, *Enterobacter cloacae*, *Aerococcus viridans*, *Kocuria varians*, and *Staphylococcus chromogenes* were able to decarboxylate amino acids and produce biogenic amines in vitro. Most (70.59%) of the microorganisms identified were able to produce histamine, 23.53% were able to produce the diamines putrescine and cadaverine, and only 11.76% were able to produce tyramine, although this substance was the major biogenic amine found in anchovy samples.

*Engraulis encrasicolus* is a pelagic fish belonging to the family *Engraulidae*. From ancient times, *E. encrasicolus* has been used to produce semipreserved anchovies in the Mediterranean area. A process of salting, pressing, and ripening leads to a succulent and tasty product by developing a specific flavor and prevents the growth of both pathogenic and fish-spoiling bacteria (15).

Biogenic amines (BA) are organic basic compounds whose presence in food is generally recognized as being of microbial origin (26). BA formation in foods is dependent on the total microbial load, the species, specific strains, and environmental conditions. Salt-ripened anchovies, like other ripening foods such as sausages, cheeses, and wines, have for years been suspected of carrying histamine (HI) and other BA. In this sense, the current European regulations set a maximum average HI value of 200 mg/kg for ripened anchovies, which is twice the maximum allowed for fresh or frozen fish (14). Although concentrations of HI and other BA in ripened anchovies are reported in a wide range of values, the product is not often associated with histaminic fish poisoning (28). HI is the BA most frequently associated with health problems after fish consumption, but its potential toxicity can be enhanced by other BA such as the diamines putrescine (PU) and cadaverine (CA) (39) or monoamines such as tyramine (TY) (26).

Anchovies that have been prepared following a traditional salt-ripening process without any thermal treatment generally have lower microbial loads than do nonprocessed

fish (44). Legal regulations allow counts up to 5 log CFU/g for mesophilic microorganisms and 2 log CFU/g for enterobacteria for salted fish products (27). Both the hygienic quality of the raw material and the intrinsic factors linked to ripening (high NaCl concentration, low water activity, and relatively low pH) will determine the microbial flora in salted anchovies (2, 48). Specifically, pH can affect the amino acid decarboxylase activity; a pH of 4.0 to 5.5 is optimum for the highest activity (38).

Some authors have proposed use of the proteolysis index (PI) as an objective measure of ripening; values between 21 and 40% indicate that the process is finished (10, 16, 32). In the same way, total volatile basic nitrogen (TVB-N) has been used to determine the grade of proteolysis of Thai fish sauce, a fermented product that is produced from small pelagic fish mixed with salt and stored at room temperature (8).

There are many published reports of the changes that occur in some chemical and microbiological parameters during the anchovy ripening process (11, 13, 18, 23, 32, 35, 45). In most of these studies, the ripening process has been evaluated only in a laboratory or on a pilot plant scale (15, 18). In contrast, there are not many studies in which BA concentrations throughout ripening have been monitored along with the characteristics of microbial flora involved in this process. Likewise, studies of the capacity to form BA by bacteria isolated during the salt ripening process are scarce and mainly have focused on the production of HI, PU, and CA (19, 36). TY has been reported as the major BA of ready-to-eat salt-ripened anchovies (41) and

\* Author for correspondence. Tel: +34 93 402 45 13; Fax: 34 93 403 59 31; E-mail: mcvidal@ub.edu.

the major BA found during the salt ripening process (34); however, no data are available on the ability of ripening flora to decarboxylate tyrosine to produce TY.

The aim of the research described here was to analyze changes in BA, microbial activity, and other indicators of ripening (water content, pH, TVB-N, and PI) during the actual production of salt-ripened anchovies, from the raw material to the end product. In all samples, the relationship between BA production and microbial counts was studied. Special emphasis was placed on TY production and on the microorganisms able to produce TY, because there is less information for TY than for other BA. We also investigated the *in vitro* ability of microbial strains to produce BA from isolated of samples throughout the ripening.

## MATERIALS AND METHODS

**Samples.** An artisan producer provided samples from three batches of ripened anchovies that had been produced during the catching season and were immersed in oil and vacuum packed. The fish had been refrigerated in flaked ice and reached the factory within a maximum of 6 to 8 h after being caught. Each fish was first dry salted to prevent the development of microorganisms and to facilitate manipulation and then was beheaded, gutted, and immersed in saturated brine under pressure until the end of ripening. Samples for analysis included raw material (fresh fish) and salted anchovies after 0.5, 1, 2, 3, 8, 12, 17, 22, and 26 weeks of ripening. Samples of vacuum-packed ready-to-eat product corresponding to 31 weeks after catch also were analyzed. At each sampling point, 10 anchovies were removed at random for analysis.

**Chemical analysis.** The BA TY, HI, serotonin (SE),  $\beta$ -phenylethylamine, tryptamine (TR), PU, CA, agmatine (AG), spermidine (SD), and spermine (SM) (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) were analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC) (42). Water content was determined by drying the samples at 100 to 105°C until constant weight was reached (25). The pH was measured directly from samples using a pH meter (model 2001, Crison, Allela, Spain) by inserting a Xerolyt electrode (Crison). The PI was calculated as the quotient of the nonprotein nitrogen fraction divided by total nitrogen and the multiplied by 100 (3). Total nitrogen and nonprotein nitrogen were determined by the Kjeldahl method. Nonprotein nitrogen was previously extracted from 5 to 10 g of anchovies with 0.6 N perchloric acid (Panreac, Monteadá i Reixac, Spain) (13). TVB-N was measured by a flow injection-gas diffusion technique (33).

**Microbiological analysis.** Ten grams of sample was mechanically homogenized with 90 ml of 0.1% tryptone water (Merck, Darmstadt, Germany) for 2 min. Decimal dilutions were prepared, and the appropriate solutions were inoculated onto the corresponding medium (31): aerobic mesophilic microorganisms on plate count agar (PCA, Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, UK) at 32°C for 72 h, enterobacteria on violet red bile glucose agar (Oxoid) at 37°C for 24 h, gram-positive catalase-positive cocci on mannitol salt agar (Oxoid) at 32°C for 72 h, lactic acid bacteria (LAB) on deMan Rogosa Sharpe agar (MRS, Oxoid) incubated anaerobically at 30°C for 48 h, and enterococci on kanamycin aesculin azide agar base (Oxoid) at 37°C for 48 h. Halotolerant and halophilic bacteria were counted on PCA plus 3% and 10% NaCl (Panreac), respectively, at 32°C for 72 h (17).

To obtain pure isolates, several of the enumerated colonies of aerobic mesophilic microorganisms, enterobacteria, and gram-

positive catalase-positive cocci were transferred to tryptone soy agar (Oxoid), and colonies of LAB and enterococci were transferred to MRS agar. To study the amino acid decarboxylase activity of microorganisms, pure isolates were incubated in the broth described by Bover-Cid and Holzapfel (6). The aminogenic activity was quantified throughout the analysis of BA in the broth by means of HPLC (42). Isolates with the ability to produce BA were identified on the basis of Gram, oxidase, and catalase reactions and biochemical tests using the appropriate API system (API 20E, API 20 NE, or API 50 CH, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). A total of 172 isolates were obtained: 66 from batch 1, 60 from batch 2, and 46 from batch 3.

**Statistical analysis.** Data were analyzed using the procedures of SPSS 11.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Ill.). Nonparametric tests were applied when data were not normally distributed (significant Shapiro Wilks test). The Kruskal-Wallis test was applied to examine differences among trials and the Mann-Whitney U test was used to compare chemical values and microbial counts obtained in samples of fresh fish and samples corresponding to different ripening times.

## RESULTS AND DISCUSSION

Microbial counts in fresh anchovy samples used as raw material were in general higher in batch 1 than in the other two batches, especially for enterobacteria ( $>3.5$  log CFU/g) and enterococci, which were found only in samples from this batch (Table 1). Total mesophilic counts did not surpass the maximum set by Spanish fish regulations (27). In spite of these differences in microbial counts, BA, TVB-N, pH, and water content were similar in all three batches (Table 1). The BA concentrations were always less than 1 mg/kg, except for the polyamines SD, SM, and AG. SD and SM are ubiquitous in foods, and their presence is not associated with microbial spoilage of fish (4, 26). AG has been previously described as the first BA whose concentration increases during fish spoilage (43). BA concentrations, pH, and TVB-N of samples from all the batches were in agreement with those previously reported for fresh fish (17, 20, 34, 42).

In samples taken throughout ripening, no differences among batches were found for SE, TR, SM, and SD, whereas TY, AG, CA, PU, and HI concentrations were always higher in batch 1 ( $P < 0.005$ ) than in batches 2 and 3. The production of BA throughout ripening followed two patterns: some BA either were not detected or their concentrations did not change and other BA concentrations increased significantly. SE and TR were not detected or had concentrations lower than 1 mg/kg. Values of SD and SM, remained constant during ripening, at  $3.37 \pm 1.59$  mg/kg for SD and  $4.03 \pm 1.26$  mg/kg for SM without significant differences among batches ( $P > 0.05$ ). These polyamine concentrations agree with the data reported by Bardócz (4), who described higher concentrations of SM than of SD in foods of animal origin.

TY was the most abundant BA and the only one that increased in all batches during ripening. The formation of TY is characteristic of fermented food such as cheese and fermented sausages, where salt concentration is similar to that in ripened anchovies (7, 29). CA, AG, PU, and HI increased during ripening but only in batch 1 (Fig. 1); their

TABLE 1. Biogenic amines, total volatile basic nitrogen, pH, water content, and microbial counts in samples of fresh anchovies<sup>a</sup>

Parameter	Batch 1	Batch 2	Batch 3
Tyramine (mg/kg)	ND	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01
Histamine (mg/kg)	0.45 ± 0.032	0.60 ± 0.12	ND
Putrescine (mg/kg)	0.02 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01
Cadaverine (mg/kg)	0.53 ± 0.001	0.99 ± 0.18	0.70 ± 0.05
Agmatine (mg/kg)	2.85 ± 0.04	3.85 ± 0.43	2.57 ± 0.06
Spermidine (mg/kg)	2.33 ± 0.42	1.57 ± 0.15	4.78 ± 0.16
Spermine (mg/kg)	4.23 ± 0.96	3.99 ± 0.19	5.06 ± 0.23
Total volatile basic nitrogen (mg/100 g)	3.79 ± 0.30	14.78 ± 1.49	13.65 ± 0.46
pH	6.19 ± 0.01	6.13 ± 0.01	6.10 ± 0.01
Water content (%)	68.21 ± 0.05	68.77 ± 0.79	68.43 ± 0.15
Mesophilic bacteria (log CFU/g)	4.94 ± 0.34	4.42 ± 0.37	4.29 ± 0.30
Enterobacteria (log CFU/g)	3.66 ± 0.08	3.03 ± 0.05	2.66 ± 0.10
Enterococci (log CFU/g)		ND	ND
Lactic acid bacteria (log CFU/g)	2.09 ± 0.12	3.46 ± 1.27	2.74 ± 0.61
Gram-positive catalase-positive cocci (log CFU/g)	4.32 ± 0.27	3.46 ± 0.12	2.60 ± 0.15

<sup>a</sup> Values are means ± SD (n = 3). ND, not detected.

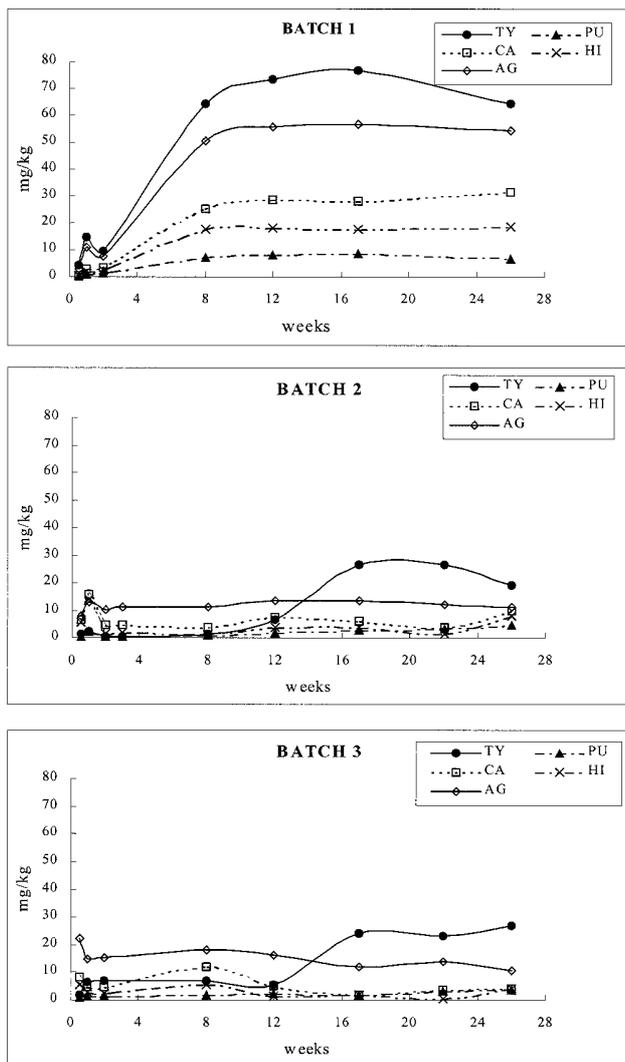


FIGURE 1. Changes in tyramine (TY), histamine (HI), putrescine (PU), cadaverine (CA), and agmatine (AG) in anchovy muscle during ripening in salt.

concentrations in batches 2 and 3 were not significantly different ( $P > 0.05$ ) throughout ripening. All these amines have been reported in the literature as BA associated with fish spoilage, especially HI (2, 5), but an increase in BA concentration has also been described in the ripening of anchovies (21, 34, 41).

HI is the only BA with an established maximum legal concentration (14). Although fish of the family *Engraulidae* are characterized by a large concentration of free histidine (HI precursor) in muscle (46), the maximum concentration of HI in our samples was  $18.67 \pm 0.10$  mg/kg, which is more than 10 times lower than the maximum allowed for ripened fish products. Fuselli et al. (15) also found that HI concentration was below 40 mg/kg at every stage of the *E. encrasicolus* marinating process. Karaçam et al. (21) reported that HI was extremely variable and its production was a function of time, temperature, and microflora present.

Gradual acidification and increases in PI and TVB-N were observed throughout ripening (Table 2) in accordance with previous findings (9, 31). The pH values were very similar in the three trials ( $P > 0.05$ ), from  $5.89 \pm 0.11$  at the start of the ripening (0.5 weeks) to  $5.55 \pm 0.03$  at the end (Table 2), and were always in the range reported as optimum for the expression of microbial decarboxylase activity. Consequently, the effect of pH on BA production would have been similar in all three batches. After 3 weeks of ripening, PI values were much higher in batch 1 than in batches 2 and 3. The higher PI of batch 1 is in accordance with the higher concentrations of BA in this batch, probably favored by the availability of BA amino acid precursors.

In all batches, during the first period of ripening concentrations of TVB-N were similar to those found in fresh fish (Table 2). In batch 1, a significant increase ( $P < 0.05$ ) was already observed after 3 weeks of ripening, whereas for batches 2 and 3 a longer ripening period was needed for such an increase (12 and 17 weeks, respectively). As reported by Hernández-Herrero et al. (17), the increases in

TABLE 2. Changes in pH, proteolysis index (PI), and total volatile basic nitrogen (TVB-N) during ripening of anchovies<sup>a</sup>

Week	pH			PI (%)			TVB-N (mg/100 g)		
	Batch 1	Batch 2	Batch 3	Batch 1	Batch 2	Batch 3	Batch 1	Batch 2	Batch 3
0.5	5.99 ± 0.01	5.91 ± 0.01	5.77 ± 0.01	8.43 ± 0.33	7.64 ± 0.53	3.86 ± 0.11	13.96 ± 0.30	18.05 ± 0.38	14.68 ± 0.22
1	5.81 ± 0.01	5.81 ± 0.02	5.81 ± 0.01	9.00 ± 1.06	13.34 ± 0.15	11.31 ± 1.03	14.36 ± 1.09	16.31 ± 0.27	12.85 ± 0.46
2	5.77 ± 0.04	5.73 ± 0.01	5.73 ± 0.01	9.96 ± 1.06	12.21 ± 0.53	11.77 ± 1.05	15.03 ± 0.38	12.50 ± 0.48	13.23 ± 0.97
3	5.65 ± 0.01	5.68 ± 0.01	5.69 ± 0.01	21.47 ± 0.58	12.72 ± 0.15	11.70 ± 0.67	30.47 ± 0.51	12.51 ± 0.23	13.47 ± 0.25
8	5.45 ± 0.01	5.66 ± 0.01	5.69 ± 0.01	25.86 ± 0.47	13.19 ± 0.21	11.61 ± 0.86	56.21 ± 0.15	14.27 ± 0.66	14.99 ± 0.19
12	5.52 ± 0.01	5.45 ± 0.01	5.58 ± 0.01	28.44 ± 0.75	13.65 ± 0.53	10.49 ± 0.71	60.08 ± 0.18	23.24 ± 0.29	15.45 ± 1.01
17	5.70 ± 0.01	5.43 ± 0.01	5.43 ± 0.05	28.56 ± 1.14	17.72 ± 2.13	13.55 ± 0.06	61.62 ± 1.74	29.90 ± 0.75	25.60 ± 0.74
22	5.52 ± 0.01	5.37 ± 0.01	5.47 ± 0.01	36.87 ± 1.27	17.62 ± 0.50	12.69 ± 0.11	55.39 ± 1.95	30.29 ± 0.07	23.65 ± 0.03
26	5.57 ± 0.01	5.58 ± 0.01	5.51 ± 0.01	27.90 ± 2.09	19.31 ± 0.14	16.79 ± 0.22	58.44 ± 0.92	37.62 ± 0.37	36.13 ± 0.17

<sup>a</sup> Values are means ± SD (n = 3).

TABLE 3. Mesophilic (M), halotolerant (HT), and halophilic (HP) microbial counts during ripening<sup>a</sup>

Week	Batch 1			Batch 2			Batch 3		
	M	HT	HP	M	HT	HP	M	HT	HP
0.5	4.03 ± 0.24	3.73 ± 0.11	2.91 ± 0.13	3.42 ± 0.19	3.25 ± 0.25	3.25 ± 0.35	3.09 ± 0.13	3.37 ± 0.17	2.30 ± 0.01
1	3.25 ± 0.30	3.09 ± 0.07	3.19 ± 0.16	3.81 ± 0.04	3.66 ± 0.06	3.37 ± 0.24	3.27 ± 0.52	2.95 ± 0.67	2.57 ± 0.38
2	3.58 ± 0.15	3.49 ± 0.14	2.84 ± 0.09	2.90 ± 0.43	3.29 ± 0.25	2.65 ± 0.07	2.78 ± 0.25	2.00 ± 0.01	2.00 ± 0.01
3	2.58 ± 0.14	2.64 ± 0.10	2.22 ± 0.08	2.30 ± 0.33	2.90 ± 0.08	2.30 ± 0.01	2.67 ± 0.24	2.60 ± 0.01	2.43 ± 0.05
8	2.69 ± 0.12	2.48 ± 0.01	2.30 ± 0.01	2.30 ± 0.01	2.30 ± 0.01	2.03 ± 0.04	2.72 ± 0.17	2.54 ± 0.09	2.00 ± 0.01
12	2.00 ± 0.01	2.00 ± 0.01	2.30 ± 0.01	2.28 ± 0.03	2.65 ± 0.07	2.95 ± 0.07	2.54 ± 0.09	2.54 ± 0.34	2.85 ± 0.01
17	2.15 ± 0.21	2.15 ± 0.21	1.70 ± 1.41	2.54 ± 0.76	2.15 ± 0.21	3.15 ± 0.27	2.74 ± 0.37	2.69 ± 0.12	2.15 ± 0.21
22	4.31 ± 0.01	4.30 ± 0.01	4.26 ± 0.04	3.56 ± 0.04	3.63 ± 0.07	3.52 ± 0.01	3.73 ± 0.03	3.74 ± 0.10	3.52 ± 0.03
26	2.15 ± 0.21	2.43 ± 0.61	2.00 ± 0.01	2.24 ± 0.34	2.15 ± 0.21	2.15 ± 0.21	2.30 ± 0.01	2.00 ± 0.01	2.00 ± 0.01
31	3.00 ± 0.06	2.93 ± 0.04	2.78 ± 0.01	3.80 ± 0.09	2.65 ± 0.07	3.64 ± 0.13	2.70 ± 0.01	2.15 ± 0.21	2.00 ± 0.01

<sup>a</sup> Values are mean ± SD log CFU/g (n = 3).

TABLE 4. Biogenic amines produced by microorganisms isolated from ripened anchovies<sup>a</sup>

Species	TY	PU	CA	HI
<i>Enterobacter cloacae</i>	NEG	20–150	NEG	NEG
<i>Kocuria varians</i>	NEG–50	NEG	NEG	325–530
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	NEG–115	15–1,450	40–90	NEG–485
<i>Aerococcus viridans</i>	NEG	465–825	44–55	NEG

<sup>a</sup> Values are concentration (mg/liter) in the decarboxylase broth. NEG, negative (not able to decarboxylate any amino acid in vitro).

TVB-N can be attributed to bacterial growth, particularly halophilic bacteria. The TVB-N concentration of 100 mg per 100 g, which is relatively high compared with other values reported for fresh fish, has been proposed as a limit of acceptability for salted fish (12). TVB-N concentrations in all three batches remained clearly below this limit during ripening and in the final packed products (22.5 to 40.6 mg per 100 g).

The higher values for BA, TVB-N, and PI correspond to the batch with the highest initial microbial load (batch 1), especially for gram-positive catalase-positive cocci and enterobacteria. However, differences in microbial counts in fresh fish were maintained only during a short period of ripening; counts obtained from later samples were similar in all three trials. Enterobacteria were not detected in any of the ripening samples of batches 2 and 3, whereas in batch 1 they decreased by 3 log until they disappeared after 1 week of ripening. The early decreases of enterobacterial counts during ripening can be explained by their low tolerance to the high-salt environment (19, 34, 36). The water activity values dropped dramatically during the first week of ripening (2, 17) as the salt concentration increased (17, 45), clearly modifying the bacterial environment. In contrast to enterobacteria, gram-positive catalase-positive cocci were the dominant population in all batches, and their populations and those of LAB remained constant during ripening at  $3.02 \pm 0.66$  and  $1.88 \pm 0.45$  log CFU/g, respectively. Mesophilic bacterial counts also were constant during ripening, at  $2.92 \pm 0.53$  log CFU/g. Enterococci, which were found only in samples from batch 1, were not detected after 1 week of ripening.

Table 3 shows counts of mesophilic bacteria and halotolerant and halophilic microorganisms during ripening of samples from the three batches. The use of growth media enriched in salt has been suggested to better mimic the changes in microbial loads in salt-ripened fish products (17, 22). However, counts in standard PCA medium (mesophilic bacteria) and in medium enriched with 3% NaCl (halotolerant bacteria) or 10% NaCl (halophilic bacteria) were very similar; thus, salt enrichment of the medium did not result in better recovery of bacteria.

A total of 172 strains (140 gram-positive catalase-positive cocci, 29 LAB, 2 enterobacteria, and 1 enterococci) were isolated during ripening. The isolates able to produce noticeable amounts of BA from their amino acid precursors in vitro were identified (Table 4).

Among the gram-positive catalase-positive cocci isolated, only 15% were amine producers: 12 of them were identified as *Kocuria varians* (formerly *Micrococcus vari-*

*ans*) and the other 4 were identified as *Staphylococcus chromogenes*. Although *K. varians* was able to produce HI in vitro, high concentrations of this amine in fish samples were not found. Brillantes et al. (8) reported that in salt-fermented sardines halophilic HI-forming bacteria produced high concentrations of this amine only when counts exceeded 4 log CFU/g, which was never achieved in our study. *K. varians* also was weak at TY formation, coinciding with the findings of Leuschner and Hammes (24) for isolates from fermented sausages and the findings of Fuselli et al. (15) in raw *Engraulis anchoita*, a species very close to *E. encrasicholus*.

*S. chromogenes* produced TY, PU, CA, and HI in vitro. The different strains isolated could produce different BA because decarboxylase activity is more closely associated with strain than with species. Most of the *Staphylococcus* isolates from fermented salted sardines and anchovies are HI producers (19, 47), and Lakshmanan et al. (22) isolated *Staphylococcus epidermidis* from salt-drying sardines able to produce PU.

Among bacteria isolated from MRS medium, only two were amine-producing bacteria and were identified as *Aerococcus viridans*. Both isolates produced higher amounts of PU than CA. This species has been found in guts of some fish commonly sold in Egypt (30), but no data regarding its capacity for BA production have been published.

The two enterobacteria isolates that were able to produce TY were identified as *Enterobacter cloacae*. This finding is in agreement with that of Rodríguez-Jerez et al. (37), who also isolated ornithine decarboxylating *E. cloacae* from salted anchovies.

An apparent discordance is noted between concentrations of BA during ripening and the in vitro ability of isolates to produce them. Thus, batch 1, which had the highest BA concentrations, had the same number of isolates with amino acid decarboxylase activity as did the other two batches, and none of the isolates had a greater ability to form BA. Likewise, from the total of positive isolates, 70% were able to produce HI, 24% were able to produce the diamines PU and CA, and only 12% were able to produce TY, although this last amine was the major BA in anchovy samples. This lack of concordance could be related to several factors. The expression of amino acid decarboxylase activity could be affected by the different conditions in the in vitro study and the original environment (temperature and composition of the growth media) where bacteria grow throughout ripening. In the present study, we planned to isolate microorganisms throughout the ripening process; however, the main microbial changes occurred in the raw

TABLE 5. Biogenic amine concentrations and microbial counts in anchovy samples at the end of ripening (26 weeks) and in ready-to-eat product<sup>a</sup>

Parameter	Batch 1		Batch 2		Batch 3	
	26 weeks	Ready to eat	26 weeks	Ready to eat	26 weeks	Ready to eat
Tyramine (mg/kg)	64.43 ± 0.45	89.48 ± 3.35	19.05 ± 0.85	40.20 ± 1.35	27.00 ± 0.10	84.75 ± 1.00
Agmatine (mg/kg)	54.11 ± 0.80	12.78 ± 0.40	11.24 ± 0.95	12.69 ± 0.35	10.70 ± 0.35	57.45 ± 0.30
Cadaverine (mg/kg)	31.35 ± 0.15	7.05 ± 0.15	9.77 ± 0.10	7.16 ± 0.20	4.35 ± 0.70	47.84 ± 1.00
Putrecine (mg/kg)	6.80 ± 0.10	8.30 ± 0.10	4.64 ± 0.45	6.45 ± 0.15	3.80 ± 0.10	17.20 ± 0.25
Histamine (mg/kg)	18.60 ± 0.10	4.50 ± 0.25	7.80 ± 0.15	5.60 ± 0.20	4.35 ± 0.30	19.35 ± 0.15
Mesophilic bacteria (log CFU/g)	2.61 ± 0.60	3.89 ± 0.10	2.18 ± 0.35	4.14 ± 0.01	2.00 ± 0.01	4.10 ± 0.01
Gram-positive catalase-positive cocci (log CFU/g)	2.00 ± 0.01	3.08 ± 0.25	ND	2.00 ± 0.10	ND	4.10 ± 0.01
Lactic acid bacteria (log CFU/g)	1.70 ± 0.45	2.31 ± 0.01	1.00 ± 0.01	2.44 ± 0.01	0.70 ± 0.40	2.69 ± 0.01
Enterococci (log CFU/g)	ND	ND	ND	ND	ND	ND

<sup>a</sup> Values are means ± SD (*n* = 3). ND, not detected.

materials and in the first week of ripening. Therefore, the higher production of BA in batch 1 could not be explained by more microorganisms with amino acid decarboxylating ability. Higher BA production is mainly attributed to the higher microbial load found in initial samples from this batch.

In the ready-to-eat product (31 weeks), which was filleted, immersed in oil, and vacuum packed, BA concentrations and microbial loads were generally higher than those found in samples at the end of ripening (26 weeks) (Table 5), but these values were always lower than the maximum allowed by current regulations (14, 27). The manipulation applied after ripening included desalting and filleting before oil immersion, which could result in recontamination of the product. The 5 weeks of refrigerated storage of the ready-to-eat product could allow microbial growth and amine formation. The increases in microbial counts were more evident in batches 2 and 3, where the microbial load at the end of the ripening was lower than that in the ready-to-eat product. In agreement with the increases in microbial counts, the BA concentrations also increased more in batches 2 and 3 than in batch 1. The assigned shelf life of the ready-to-eat product is 6 months, which is much longer than the 5 weeks assayed in this work. Thus, increases in BA concentrations may continue to the expiration date of the commercial product. Similarly, in ready-to-eat anchovies (immersed in oil and not vacuum packed) high BA concentrations during storage at both room and refrigeration temperatures have been reported (43). The findings for stored ready-to-eat product confirm the increased risk of BA accumulation when ripened anchovies are manipulated to prepare the ready-to-eat commercialized product; however, they also indicate that the use of vacuum packaging is not enough to prevent BA formation in the final product.

The highest concentrations of TY, 90 mg/kg, were found in samples of ready-to-eat product; this value is below but near the range of 100 to 800 mg/kg reported as toxic by Brink et al. (9). In patients receiving classical monoamine oxidase inhibitor drug therapy, an intake of 120 g of these anchovies would be necessary to obtain the 6 mg of TY reported as hazardous when these drugs are used.

However, it is more common to use reversible monoamine oxidase inhibitor drugs that allow ingestion of higher concentrations of TY (40). In these cases, the intake calculated to surpass risky ingestion levels of TY is about 0.8 to 2.4 kg, an amount well above that found in the usual serving of anchovies.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank QUALPOISS2 (FAIR.CT 96.3253) and the Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (CIRIT, 2001 SGR-00132) of the Generalitat de Catalunya (Spain) for financial support of this study. S. Pons-Sánchez-Cascado was recipient of a predoctoral grant awarded by the Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (CIRIT) of the Generalitat de Catalunya (Spain).

#### REFERENCES

- Ababouch, I., M. E. Afilal, H. Benabdeljelil, and F. F. Fusta. 1991. Quantitative changes in bacteria, amino acids and biogenic amines in sardine (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25–28°C) and in ice. *Int. J. Food Sci. Technol.* 26:297–306.
- Arkoudeulos, J. S., F. J. Samaras, and C. C. Tassou. 2003. Survival of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis on salted sardines (*Sardina pilchardus*) during ripening. *J. Food Prot.* 66:1479–1481.
- Astiasarán, I., R. Villanueva, and J. Bello. 1990. Analysis of proteolysis and protein insolubility during the manufacture of some varieties of dry sausage. *Meat Sci.* 28:111–117.
- Bardócz, S. 1995. Polyamines in food and their consequences for quality and human health. *Trends Food Sci. Technol.* 6:341–346.
- Ben-Gigirey, B., J. M. Vieites Baptista de Sousa, T. G. Villa, and J. Barros-Velázquez. 1998. Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *J. Food Prot.* 5:608–615.
- Bover-Cid, S., and W. H. Holzapfel. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 53:33–41.
- Bover-Cid, S., M. Izquierdo-Pulido, and M. C. Vidal-Carou. 2000. Mixed starter cultures to control biogenic amine production in dry fermented sausages. *J. Food Prot.* 63:1556–1562.
- Brillantes, S., S. Paknoi, and A. Totakien. 2002. Histamine formation in fish sauce production. *Food Chem. Toxicol.* 67:2090–2094.
- Brink, B., C. Damirik, H. M. L. J. Joosten, and J. H. J. Huis in't Veld. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 11:73–84.
- Campello, F. 1985. Approche microbiologique de l'anchoitage [Microbiological approach of the maturation of Mediterranean anchovies]. *Rev. Trav. Inst. Peches Marit.* 47:217–226.

11. Cheftel, H. 1965. The processing of the anchovy, p. 219–225. In G. Borgstrom (ed.), *Fish as food*, vol. 3. Academic Press, New York.
12. Connell, J. J. 1978. Methods of assessing and selecting for quality, p. 135–144. In *Control of fish quality*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
13. Dierick, N., P. Vanderkerckhove, and D. Demeyer. 1974. Changes in nonprotein nitrogen compounds during dry sausage ripening. *J. Food Sci.* 39:301–304.
14. European Economic Commission. 1991. Directive 91/439/CEE of July 22, 1991, concerning the normative for production and merchandising of fishery products. *Diario Of. Comun. Eur.* L286:15–34.
15. Fuselli, S. R., M. R. Casales, R. Fritz, and M. I. Yeannes. 1994. Microbiology of the marination process used in anchovy (*E. anchoita*) production. *Lebensm. Wiss. Technol.* 27:214–218.
16. Hernández-Herrero, M. M., A. X. Roig-Sagués, E. I. López-Sabater, J. J. Rodríguez-Jerez, and M. T. Mora-Ventura. 1999. Protein hydrolysis and proteinase activity during the ripening of salted anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.): a microassay method for determining the protein hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.* 47:3319–3324.
17. Hernández-Herrero, M. M., A. X. Roig-Sagués, E. I. López-Sabater, J. J. Rodríguez-Jerez, and M. T. Mora-Ventura. 1999. Total volatile basic nitrogen and other physico-chemical and microbiological characteristics as related to ripening of salted anchovies. *J. Food Sci.* 64:344–347.
18. Hernández-Herrero, M. M., A. X. Roig-Sagués, E. I. López-Sabater, J. J. Rodríguez-Jerez, and M. T. Mora-Ventura. 2002. Influence of raw fish quality on some physicochemical and microbiological characteristics as related to ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus* L.). *J. Food Sci.* 67:2631–2640.
19. Hernández-Herrero, M. M., A. X. Roig-Sagués, J. J. Rodríguez-Jerez, and M. T. Mora-Ventura. 1999. Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *J. Food Prot.* 62:509–514.
20. Huss, H. H. 1995. Quality and quality changes in fresh fish. Fisheries technical paper no. 348. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
21. Karaçam, H., S. Kutlu, and S. Köse. 2002. Effect of salt concentrations and temperature on the quality and shelf-life of brined anchovies. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37:19–28.
22. Lakshmanan, R., R. Jeya Shhakila, and G. Jeyasekaran. 2002. Changes in the halophilic amine forming bacterial flora during salt-drying of sardines (*Sardinella gibbosa*). *Food Res. Int.* 35:541–546.
23. Lakshmanan, R., R. Jeya Shhakila, and G. Jeyasekaran. 2002. Survival of amine-forming bacteria during the ice storage of fish and shrimp. *Food Microbiol.* 19:617–625.
24. Leuschner, R. G. K., and W. P. Hammes. 1998. Tyramine degradation by micrococci during ripening of fermented sausage. *Meat Sci.* 49:289–296.
25. Madrid-Vicente, A. (ed.). 1994. Métodos oficiales de análisis de los alimentos y bebidas. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
26. Mariné-Font, A., M. C. Vidal-Carou, M. Izquierdo-Pulido, M. T. Veciana-Nogués, and T. Hernández-Jover. 1995. Les amines biogènes dans les aliments: leur signification, leur analyse. *Ann. Fals Exp. Chim.* 88(931):119–140.
27. Ministerio de Sanidad y Consumo. 1991. RD 1521/1991. Directiva del 15 de Agosto 1991, Orden del 2 de Agosto de 1991 por la que se aprueban las normas microbiológicas, los límites de contenido en metales pesados y los métodos analíticos para la determinación de metales pesados para los productos de la pesca y de la acuicultura. *Bol. Of. Estado* 195:27513–27515.
28. Murray, C. K., G. Hobbs, and R. J. Gilbert. 1982. Scombrototoxic-like poisoning from canned fish. *J. Hyg. Camb.* 88:215–220.
29. Novella-Rodríguez, S., M. T. Veciana-Nogués, A. X. Roig-Sagués, A. J. Trujillo-Mesa, and M. C. Vidal-Carou. 2003. Comparison of biogenic amine profile in cheeses manufactured from fresh and stored (4°C, 48 hours) raw goat's milk. *J. Food Prot.* 67:110–116.
30. Osman, K. M., M. Abd-El-Ghani, W. A. Gad-El-Said, and F. Off. 1980. Gut microflora of some commercially common fishes in Egypt. *Vet. Med. J.* 28:109–119.
31. Pascual-Anderson, M. R. 2000. Microbiología alimentaria, p. 000–000. In S. A. Díaz de Santos (ed.), *Metodología para alimentos y bebidas*, 2nd ed. Madrid.
32. Pérez-Villareal, B., and R. Pozo. 1992. Ripening of salted anchovy (*Engraulis encrasicolus*): study of the sensory, biochemical and microbiological aspects, p. 157–167. In H. H. Huss, M. Jakobsen, and J. Liston (ed.), *Quality assurance in the fish industry*. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
33. Pons-Sánchez-Cascado, S., M. Izquierdo-Pulido, A. Mariné-Font, M. T. Veciana-Nogués, and M. C. Vidal-Carou. 2000. Reliability of trimethylamine and total volatile basic nitrogen determinations by flow injection–gas diffusion techniques in pelagic fish: *Engraulis encrasicolus*. *Química Anal.* 19:165–170.
34. Pons-Sánchez-Cascado, S., M. T. Veciana-Nogués, and M. C. Vidal-Carou. 2003. Effect of delayed gutting on biogenic amine contents during ripening of European anchovies. *Eur. Food Res. Technol.* 216:489–493.
35. Rodríguez-Jerez, J. J., E. I. López-Sabater, M. M. Hernández-Herrero, and M. T. Mora-Ventura. 1994. Histamine, putrescine and cadaverine formation in Spanish semipreserved anchovies as affected by time/temperature. *J. Food Sci.* 59:993–997.
36. Rodríguez-Jerez, J. J., E. I. López-Sabater, A. X. Roig-Sagués, and M. T. Mora-Ventura. 1993. Evolution of histidine decarboxylase bacterial groups during the ripening of Spanish semipreserved anchovies. *J. Vet. Med. B* 40:533–543.
37. Rodríguez-Jerez, J. J., E. I. López-Sabater, A. X. Roig-Sagués, and M. T. Mora-Ventura. 1994. Histamine, cadaverine and putrescine forming bacteria from ripened Spanish semipreserved anchovies. *J. Food Sci.* 59:998–1001.
38. Silla-Santos, M. H. S. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29:213–231.
39. Stratton, J. E., and S. L. Taylor. 1991. Scombroid poisoning, p. 331–351. In D. R. Ward and C. Hackney (ed.), *Microbiology of marine products*. AUI Publishing Co., New York.
40. Tailor, S. A., K. I. Shulman, S. E. Walker, J. Moss, and D. Gardner. 1994. Hypertensive episode associated with phenelzine and tap beer. A reanalysis of the role of the pressor amines in beer. *J. Clin. Psychopharmacol.* 14:91–128.
41. Veciana-Nogués, M. T., S. Albalá-Hurtado, A. Mariné-Font, and M. C. Vidal-Carou. 1996. Changes in biogenic amines during the manufacture and storage of semipreserved anchovies. *J. Food Prot.* 59:1218–1222.
42. Veciana-Nogués, M. T., T. Hernández-Jover, A. Mariné-Font, and M. C. Vidal-Carou. 1995. Liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in fish and fish products. *J. AOAC Int.* 78:1045–1050.
43. Veciana-Nogués, M. T., A. Mariné-Font, and M. C. Vidal-Carou. 1997. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationship with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines and organoleptic changes. *J. Agric. Food Chem.* 45:2036–2041.
44. Vieites, J. M., V. González, M. L. Delgado, and F. Leira. 1995. Análisis microbiológico de semiconservas de anchoa en salazón y en aceite fabricadas en España. *Alimentaria* 266:61–64.
45. Vieites, J. M., V. González, M. L. Delgado, and F. Leira. 1996. Study of microbiological parameters associated with the ripening of anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *Alimentaria* 275:121–126.
46. Yamanaka, H., K. Shimakura, K. Shiomi, and T. Kikuchi. 1986. Changes in non-volatile amine contents of the meats of sardine and saury pike during storage. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 52:127–130.
47. Yatsunami, K., and T. Echigo. 1991. Isolation of salt tolerant histamine-forming bacteria from commercial rice-bran pickled sardine. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 57:1723–1728.
48. Yeannes, M. I., and M. R. Casales. 1995. Estudio de las variables de proceso de marinados de anchoita (*E. anchoita*). *Alimentaria* 262:87–91.



## **15. UTILIDAD DE LAS AMINAS COMO MARCADORES DE FRESCURA DE LA MATERIA PRIMA UTILIZADA EN LA ELABORACIÓN DE BOQUERONES EN VINAGRE**

**Pons-Sánchez-Cascado, S.; Vidal-Carou, M. C.; Mariné-Font, A.; Veciana-Nogués, M. T.** Usefulness of volatile and biogenic amines as raw material quality markers for marinated anchovies. Enviada al *J Agric Food Chem.*

### **15.1. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO**

Los boquerones en vinagre son una forma muy popular de consumo de este pescado en los países mediterráneos. Su preparación consiste en la adición de vinagre, generalmente de vino, a boquerones frescos, limpios, descabezados y eviscerados que se dejan marinar durante un tiempo que oscila entre 2 – 20 días.

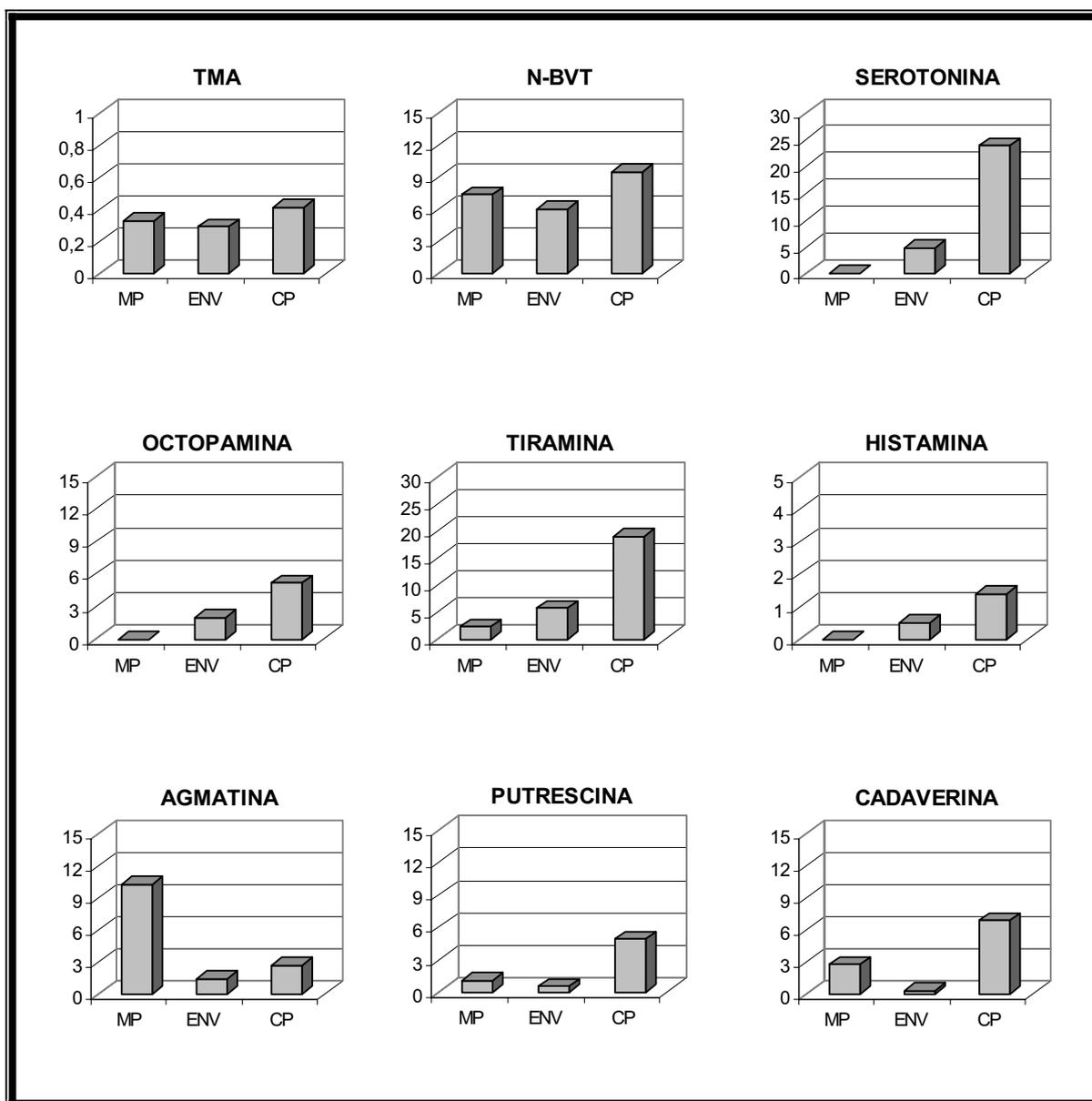
A diferencia de lo que ocurre con las anchoas maduras en sal, el estudio de los cambios químicos en el proceso de elaboración de pescados madurados en vinagre ha sido abordado muy pocas veces. Concretamente sólo se han efectuado estudios puntuales sobre la evolución de compuestos volátiles o aminas biógenas en sardinas maduras en vinagre y preparadas a nivel de laboratorio.

En este trabajo se pretendía analizar si las aminas volátiles y/o las biógenas pueden ser útiles como marcadores de frescura de la materia prima utilizada en la elaboración de este tipo de semiconservas. Para ello se determinaron los contenidos de aminas volátiles y biógenas en muestras de dos tipos:

- Muestras obtenidas de un elaborador artesanal pertenecientes a tres lotes de elaboración distintos y correspondientes a materias primas (boquerón y vinagre), producto correspondiente al final del marinado (boquerón y vinagre) y producto sumergido en aceite y envasado al vacío, almacenado en refrigeración durante el período de vida comercial máximo asignado por el elaborador. El objetivo era conocer cuáles son los niveles habituales de las aminas y su evolución en este tipo de semiconserva.
- Muestras preparadas en el laboratorio (boquerones y vinagre), simulando el proceso de marinado aplicado por el elaborador artesanal. Para ello se partió de boquerón fresco adquirido en el mercado y clasificado sensorialmente como de categoría extra (E). El total del pescado se dividió en dos fracciones: la primera se sumergió inmediatamente en vinagre (muestras clase E) y la segunda se marinó tras unas horas de mantenimiento del pescado a temperatura ambiente hasta alcanzar la categoría C (no apto para el consumo humano). Este estudio tenía como finalidad dilucidar los efectos de la calidad del pescado empleado como materia prima en el perfil de las aminas en el producto marinado.

### **15.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En las muestras correspondientes a los 3 lotes industriales no se detectaron aminas volátiles en el vinagre durante todo el proceso. Los niveles de nitrógeno de trimetilamina (N-TMA) y nitrógeno básico volátil total (N-BVT) determinados en el músculo del pescado fueron constantes y muy bajos, tanto en la materia prima como en el producto envasado (Figura 15.1). En cuanto a las aminas biógenas, en la materia prima no se detectaron o sus niveles fueron muy bajos. Durante el marinado, se pudo observar un leve incremento de la octopamina, tiramina, serotonina e histamina. Los contenidos de estas aminas fueron algo superiores después de envasar el producto, detectándose también un aumento de los niveles de agmatina, putrescina y cadaverina, debido seguramente, a contaminaciones secundarias durante el fileteado del producto (Figura 15.1).



**Figura 15.1.** Niveles de aminas volátiles (mg/100g) y aminas biógenas (mg/kg) en la materia prima (MP), producto recién envasado (ENV) y final de la fecha de consumo preferente del producto (CP).

Se planteó el estudio de laboratorio para discernir si los bajos niveles de aminas volátiles y biógenas en los productos marinados se debían al efecto extractivo del vinagre o a una baja formación durante el proceso de elaboración. Los contenidos de aminas volátiles en el músculo del pescado disminuyeron tanto en las muestras elaboradas a partir de materia prima de clase E como C demostrando el efecto extractivo que tiene el vinagre sobre estos compuestos. Niveles elevados de N-TMA o N-BVT en vinagre, serían por

tanto indicativos de que la materia prima de partida no tenía la calidad adecuada. El mismo comportamiento extractivo del vinagre fue observado para las aminas biógenas. En la materia prima de las muestras de clase C, las aminas biógenas mayoritarias fueron la cadaverina y la histamina seguidas por la agmatina, tiramina y putrescina (Figura 15.2). Teniendo en cuenta la suma de las aminas biógenas del pescado más el vinagre, octopamina, serotonina, histamina, tiramina y agmatina aumentaron durante el marinado de las muestras de clase C, mientras que el resto de las aminas biógenas se mantuvieron constantes. El mayor incremento fue observado en la serotonina y la tiramina para las muestras de clase E (tal y como ocurría en los lotes industriales) y agmatina e histamina en los lotes C. Esto indica que la calidad del pescado afecta tanto a los niveles como al tipo de amina que predominará (Figura 15.2).

El porcentaje de aminas biógenas que fue capaz de extraer el vinagre estuvo comprendido entre el 43% - 71 %. Esto es aplicable a la histamina (el vinagre extrajo el 60 %), lo que implica que los niveles legislados para esta amina en semiconserva (200 mg/kg) quizás deberían revisarse.

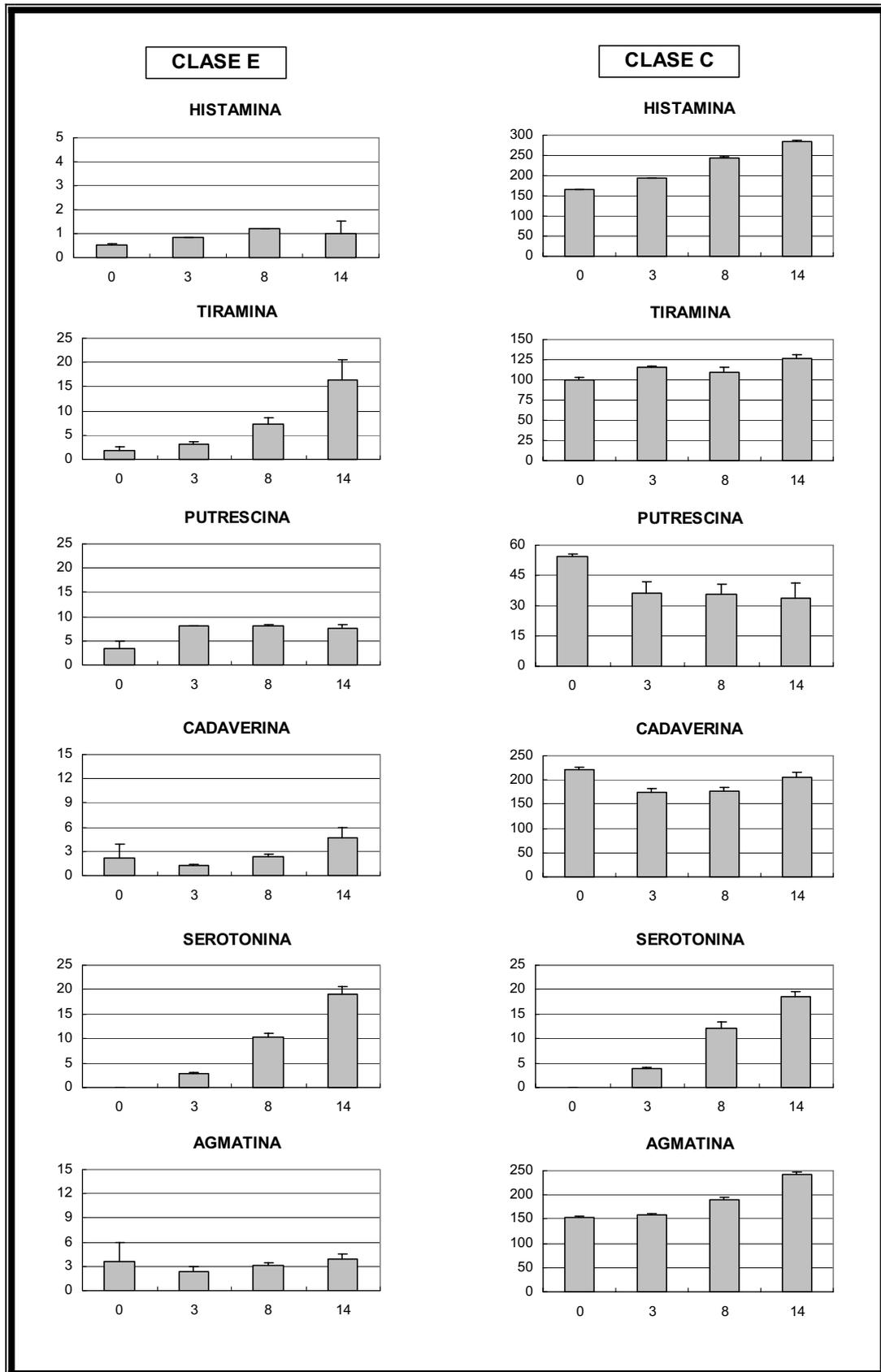


Figura 15.2. Contenido total de aminas biógenas (mg/kg) (vinagre + músculo del pescado) durante la maduración en vinagre de boquerones de clase E y C.



**Pons-Sánchez-Cascado, S.; Vidal-Carou, M. C.; Mariné-Font, A.; Veciana-Nogués, M. T.** Usefulness of volatile and biogenic amines as raw material quality markers for marinated anchovies. Enviada al *J Agric Food Chem.*



----- Original Message -----

**From:** <JAFC@ucdavis.edu>

**To:** <mcvidal@ub.edu>

**Sent:** Tuesday, April 19, 2005 5:00 PM

**Subject:** Manuscript jf050867m assignment

Dear Dr. Vidal-Carou:

Your manuscript jf050867m, entitled "USEFULNESS OF VOLATILE AND BIOGENIC AMINES AS RAW MATERIAL QUALITY MARKERS FOR MARINATED ANCHOVIES", has been assigned to the following Journal of Agricultural and Food Chemistry

Editor: Peter Schieberle

Email: jafceurope@Lrz.tum.de

Mailing Address:

Institut für Lebensmittelchemie der

Technische Universität München

Lichtenbergstrasse 4

D-85748 Garching, GERMANY

Telephone: +49 89 289 13265

Fax: +49 89 289 13227

PLEASE ADDRESS ALL FUTURE CORRESPONDENCE REGARDING THIS MANUSCRIPT TO THE ABOVE EDITOR.

IMPORTANT NOTE: Please fax your completed and signed copyright form to the editor at the above fax number immediately. You can also mail the signed form to the address above, but a faxed signature is acceptable. The form can be found on the web at:

<http://pubs.acs.org/instruct/copyright.pdf>. If you have hardcopy supporting information or permissions correspondence or forms (<http://pubs.acs.org/instruct/permform.pdf>), please mail or fax these to the editor's office.

Submission of a manuscript to Journal of Agricultural and Food Chemistry implies that the work reported therein has not received prior publication and is not under consideration for publication elsewhere in any medium, including electronic journals and computer databases of a public nature. This manuscript is being considered with the understanding that it is submitted on an exclusive basis. If otherwise, please advise.



## **USEFULNESS OF VOLATILE AND BIOGENIC AMINES AS RAW MATERIAL QUALITY MARKERS FOR MARINATED ANCHOVIES**

PONS-SÁNCHEZ-CASCADO, S.; VIDAL-CAROU, M.C.\*; MARINE-FONT, A; VECIANA-NOGUES, M. T.

### **ABSTRACT**

Volatile and non-volatile amines from three batches of anchovies, marinated in vinegar, were studied. The anchovies had been vacuum-packed and kept in refrigerated storage for three months. Trimethylamine and total volatile basic nitrogen levels were very low and constant throughout the marinating and storage process: less than 1 mg/100g and 10 mg/100g, respectively. Certain amine levels, mainly tyramine and serotonin, increased slightly during these processes, particularly during storage. However, even the highest recorded levels were much lower than those considered hazardous for human consumption. To study the influence of raw material freshness in the amine profile, two laboratory trials using fresh and non-fresh anchovies, and simulating the industry standard marinating process, were carried out. Levels for both volatile and biogenic amines were dependent of raw material quality, proving consistently higher in those deriving from non-fresh fish. Vinegar marinating leads a decrease in the accumulation of amines in anchovy while their concentration in the vinegar solution increases due to the vinegar effect as solvent extractor.

**Key words:** Anchovy, semi-preserves, trimethylamine, total basic volatile nitrogen, biogenic amines, histamine.

---

\* To whom correspondence should be addressed. Unitat de Nutrició i Bromatologia. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona. Av. Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, SPAIN. Tel.: +34 93 402 45 13; *E-mail address*: mcvidal@ub.edu

### INTRODUCTION

Anchovy (*Engraulis encrasicolus*) is a pelagic fish belonging to the *Engraulidae* family. Anchovies caught off the Bay of Biscay and Mediterranean coasts are commonly consumed in Spain as fresh fish between May and October. They can be also consumed as semi-preserves marinated in vinegar. Marinades are made by treating fresh or frozen fish, or portions of them, with edible acids (usually acetic acid) and salt, before placing them in brine, sauces, creams or oils (1). Marinating increases ionic strength and decreases pH, not only preventing microorganisms growth, but also involving changes in taste, and in the textural and structural properties of fish (2).

Although in general quality of raw materials affects the quality of fish derivatives, few data on marinated fish are currently available. Trimethylamine (TMA-N) and Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N) have been proposed in several studies (3-5) as objective markers to evaluate the freshness of marine fish. TMA-N is a volatile basic compound, mainly responsible for the characteristic fishy odour (6) that accumulates during fish spoilage from the reduction of trimethylamine oxide (TMA-O) by bacterial enzymes (7, 8). TMA-N, ammonia, and other basic compounds constitute TVB-N.

Biogenic amines (BAs), which are basic organic compounds of low molecular weight, have also been proposed as markers of freshness in fish (9-11). BAs stem from decarboxylation of precursor amino acids by bacterial enzymes (12, 13). In fish marinades, acetic acid reduces bacterial growth and enzyme action, resulting in products with extended but limited shelf life. Some BA accumulation in marinades could be expected, as they are semi-preserves wherein certain microorganisms or enzymes may remain active. In addition, acidic conditions make the tissue cathepsins more active, yielding higher amino acid release from proteins (14).

Besides their use as freshness markers, BA levels can also warn consumers to potential health hazards related to fish consumption. Migraine headaches and HI intoxication are directly produced by the intake of BA (15-17). Moreover, there are also indirect toxic effects related to BA, mainly tyramine (TY), intake such as their interaction with monoamine oxidase inhibitor (MAOI) drugs (18). MAOI drugs block the oxidative deamination pathway of BA, giving rise to their accumulation and causing hypertensive crises, which can be mortal (19).

Histamine (HI), the most widely studied BA in fish, is the only one with established legal limits. However, the Food and Drug Administration (FDA), for

example, recommends determining other BA together with HI (20) since they are known to aggravate HI toxicity (21).

Fish marinades incorporating vinegar have been popular in Mediterranean countries since antiquity, but their consumption has historically been limited to the fishing season. Today, however, anchovies marinated in vinegar are also manufactured in factories, making them available to consumers year round. Although several studies address BA content and evolution in salt-ripened anchovies or marinades from other fish species (14, 22-25), none examine anchovies marinated in vinegar.

The aim of the present work was to study the usefulness of volatile amines and BA as quality markers of raw materials in anchovies marinated in vinegar. Samples of raw materials and their corresponding end products were analyzed. As end products are not thermally treated, possible changes stemming from the storage process were also examined. In addition, a laboratory trial simulating the industrial marinating process was carried out to investigate the effects of raw material quality on the amine profile.

## MATERIALS AND METHODS

### ***Factory samples***

Samples were provided by an artisan producer who elaborates anchovies marinated in vinegar as follows: Immediately upon arrival, the fresh fish (*E. encrasicholus*) is cleaned, beheaded, gutted manually, and then immersed in a vinegar solution (20% acetic acid v/v). A maceration period of two weeks is maintained, during which fish are refrigerated. Anchovies are then manually filleted, immersed in oil, and vacuum-packed. Three different batches were studied, including samples of fish and vinegar of both raw materials and end products. To determine whether changes occurred during BA storage, end product samples were divided into two groups: the first were analyzed upon arrival to the laboratory, and the second after being refrigerated for 3 months, which is the manufacturer's recommended shelf life.

### ***Laboratory trial samples***

Anchovies (2-3 kg) caught along the Mediterranean coast were obtained from a fish market in Barcelona and marinated in the laboratory following the same procedure used by the artisan producer. Individual fish weighed 11-16 g and

were 10-15 cm in length. Upon arrival at the laboratory, anchovies were classified as E grade, according to sensory analysis guidelines established by the European Union (26). Whole fish were divided in two batches: a) class E were immediately gutted, beheaded, immersed in a 40:60 mixture of wine vinegar:water, and kept refrigerated for two weeks; b) class C were anchovies kept at room temperature until they met C grade criteria. These fish were gutted, beheaded, and marinated in identical way to those of class E. This laboratory trial was performed in duplicate. Fish and vinegar samples were taken at time zero (non-marinated fish and newly acquired vinegar) and after 3, 8, and 14 days of marinating. At each sampling point, 10-12 anchovies, selected at random, were collected and their flesh homogenized for determination of TMA-N, TVB-N and BA levels.

### **Chemical analysis**

TMA-N and TVB-N levels were measured by flow injection-gas diffusion following extraction from fish with trichloroacetic acid. Alkalinization with NaOH induced a change in the colour of the blue bromothymol solution proportional to the ammonia liberated either from TMA-N or TVB-N, which can be quantified at  $\lambda$  635 nm (27).

BA levels were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using an acidic perchloric extract. This method involves the separation of ion pairs formed between BA and octanosulfonic acid, a post-column derivatization employing o-phthalaldehyde (OPT) and spectrofluorometric detection (28).

All chemical analyses were carried out in duplicate.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis of data was conducted using SPSS 11.0 for Windows software (SPSS Inc., Chicago, IL).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Table 1 shows the TMA-N, TVB-N and BA levels for factory samples both before and following marinating, as well as after three months' storage. As expected, TMA-N and TVB-N were not found in fresh vinegar. In fresh and just-packed marinated anchovies, TMA-N content was less than 1 mg/100g, the maximum allowance for fish graded as excellent (29). Likewise, TVB-N levels were relatively low, similar in both fresh and marinated anchovies, and far from

the 25-35 mg TVB-N/100g that the European Union has set as the maximum level permissible in fish of the *Merlucciidae* and *Gadidae* families, as well as the *Salmo salar* (30). For Engraulidae family there are not legal maximum admissible levels. TMA-N levels in marinated anchovies refrigerated for 3 months were similar to those found in just-packed samples, whereas TVB-N levels were slightly higher. Other authors reported changes in both TMA-N and TBV-N sardines marinated in vinegar and finally packed immersed in oil, but stored for a longer period of time and elaborated using vinegars of low acid acetic concentrations (25).

**Table 1.-** Volatile (mg/100 g) and non volatile (mg/kg) amines in raw materials and in marinated product just packed and stored three months.

		RAW MATERIAL		JUST PACKED		END-DATE
		Vinegar	Fish	Vinegar	Fish	Fish
Volatile amines	TMA	ND <sup>b</sup>	0.33 (0.17)	ND	0.29 (0.24)	0.41 (0.30)
	TVB-N	ND	7.32 (0.81)	ND	6.04 (1.05)	9.43 (0.55)
Non volatile amines	OC	ND	ND	2,05 (0,01)	1.95 (0.26)	5.17 (0.46)
	TY	2.23 (0.02)	ND	5,08 (0,18)	5.61 (0.29)	18.86 (0.63)
	SE	ND	ND	ND	4.85 (0.30)	23.73 (0.72)
	PU	2.99 (0.01)	1.07 (0.89)	3,68 (0,12)	0.51 (0.27)	4.84 (0.25)
	CA	0.18 (0.01)	2.78 (0.35)	1,88 (0,10)	0.37 (0.33)	6.86 (0.52)
	HI	0.84 (0.06)	ND	0,25 (0,01)	0.50 (0.18)	1.37 (0.63)
	AG	ND	10.25 (2.92)	ND	1.43 (0.10)	2.73 (0.15)
	PHE	ND	ND	ND	ND	ND
	TR	ND	ND	ND	ND	ND
	SD	ND	2.98 (0.66)	ND	2.15 (0.29)	1.12 (0.61)
	SM	ND	2.72 (0.13)	ND	2.61 (0.16)	2.57 (0.94)

In general, BAs were very low or not detected in raw material (fish and vinegar). Octopamine (OC), tyramine, serotonin (SE), HI,  $\beta$ -phenylethylamine (PHE), and tryptamine (TR) were not found in fresh fish. Putrescine (PU) and cadaverine (CA) and the natural polyamines SD and SM were all low (<3 mg/kg), whereas AG exhibited the highest content, being ca 10 mg/kg. This BA profile is consistent with that reported for fresh anchovies (22). In vinegar, very low levels of TY, PU, CA, and HI were found. The presence of BA in vinegar has been previously reported (31, 32).

The increased levels of certain BAs (OC, TY, SE, and HI) in anchovies during marinating suggests that even with immersion in vinegar, some enzymatic processes can occur in fish, giving rise to the proteolysis of amino acids and allowing BA formation. BA accumulation in anchovy samples marinated in vinegar, however, was weak. Indeed, higher BA levels have been reported for

sardines marinated in vinegar, over shorter periods of time (24h) (14), as well as for salt-ripened anchovies (22). Although HI is the BA most studied in fish and fish products, TY concentration was higher than HI in anchovies marinated in vinegar, which is also the case for salt-ripened anchovies (22).

PHE and TR, absent in fresh fish, remained undetected in marinated samples. In fact, these amines have only been reported in fish when the levels of other BA were very high (22). SM and SD were quite constant throughout the marinating process, showing average values of  $2.63 \pm 0.07$  mg/kg for SM and  $2.08 \pm 0.93$  mg/kg for SD. These amines, regarded as physiological BAs, are typically detected in fish since they are required for cellular growth (33) and are not related to bacterial spoilage (34).

Certain BAs (OC, TY, PU, and CA) were detected in the vinegar corresponding to just packed anchovies. The fact that PU and CA levels decreased in fish flesh during the marinating process, in tandem with their increased levels in vinegar, suggests that this acidic medium acts as an extractive solvent.

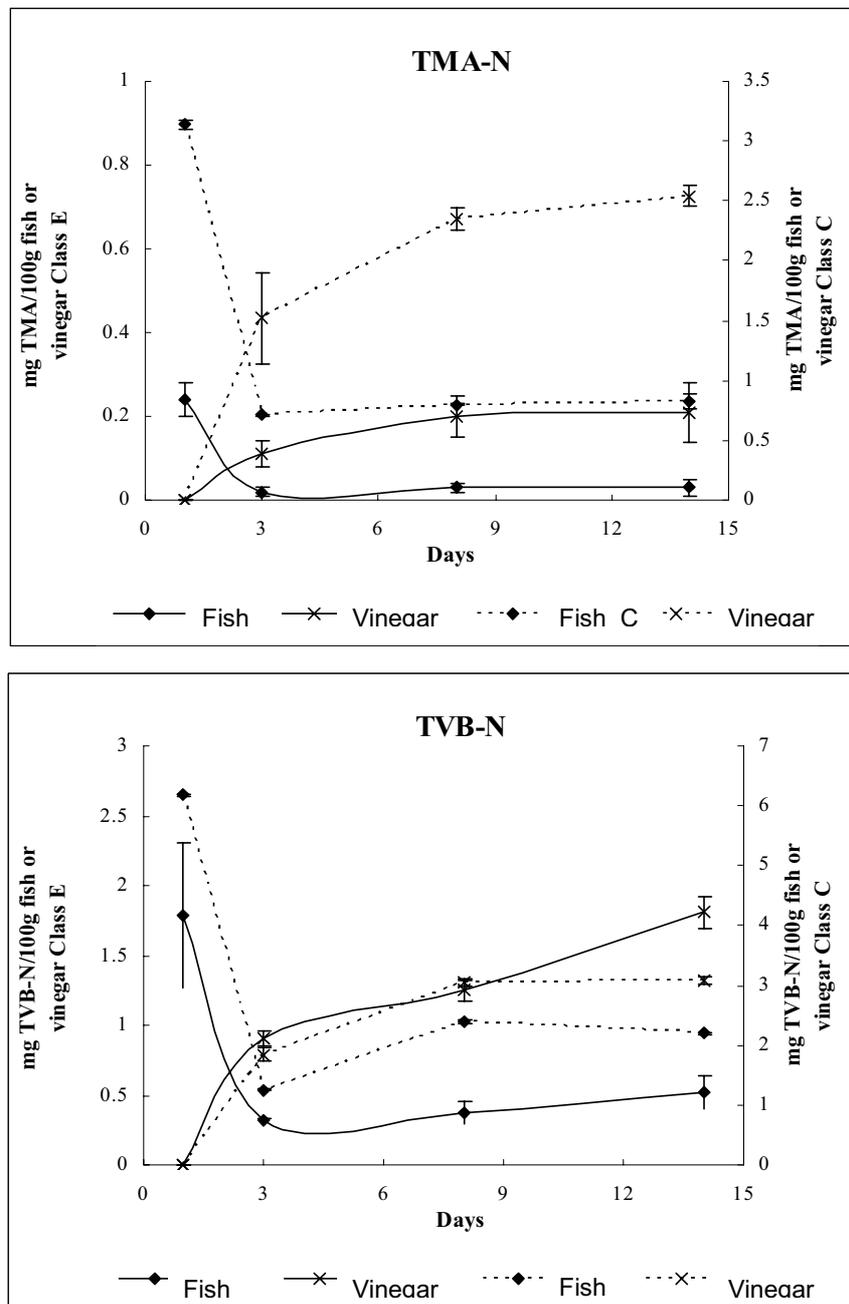
During the storage of marinated products increases in OC, TY, SE, PU, CA, AG, and HI levels were observed. These amines are commonly linked to fish spoilage with the exception of OC and SE, for which there is little available information available on fish products. SD and SM levels remained constant during storage. Although HI levels increased during the storage of marinated anchovies (up to  $1,37 \pm 0,63$  mg/kg), they were still much lower than the maximum values permitted by the European Union for raw and ripened anchovies (35).

Secondary bacterial contamination during the filleting process is probably responsible for the appearance, or increase, of BA in marinated anchovies during their three-month refrigerated storage. However, such increased BA levels were still considerably lower than those reported for salt-ripened anchovies, which had also been filleted, immersed in oil and packed in glass jars (36, 37).

The low levels of volatile and BA detected in just-packed marinated products could reflect the extractive effect of vinegar, and not only a low-level amine formation during the marinating process. To know which of these hypotheses is true; two laboratory trials were performed simulating the industrial marinating process. TMA-N, TVB-N, and BA levels during the marinating of anchovies were similar in duplicate trials ( $P > 0.05$ ). This study confirms the no formation of TMA-N and TVB-N during anchovies marinating and demonstrates the effect of

vinegar as a solvent extractor of these compounds (Figure 1). Consequently, high TMA-N or TVB-N levels should not be expected in anchovies marinated with vinegar. On the contrary, the presence of high TMA-N and TVB-N levels in vinegar can instead be linked to the use of non-fresh fish as raw material. Thus, the volatile amine levels in vinegar from class E batches remained very low, consistent with the low levels detected in raw fish.

**Figure 1.** Evolution of TMA-N and TVB-N (mg/100g) for classes E and C vinegar-marinated anchovies.



Biogenic amine levels in fish and vinegar, as well as total BA levels (content in fish + content in vinegar), detected in the laboratory trial samples are shown in Tables 2 and 3. BA levels in class E raw fish were very similar to those found in the factory samples. BA levels in fish used as raw material in C batches were very high, according to their sensory classification as inedible fish. CA and HI were the major amines in those samples, followed by AG, TY and PU, whereas PHE and TR were detected at lower amounts, and OC and SE not at all. This amine profile matches the biogenic amine accumulation pattern reported for spoiled *E. encrasicholus* (22). As expected, SD and SM levels in C batch samples were similar to those in E batches, due to their non-bacterial origins. Throughout the marinating process, the biogenic amine levels in fish increased, decreased, or remained quite constant, depending on the amine or the quality of fish used as raw material. However, BA levels in vinegar always increased throughout, demonstrating that vinegar effectively acts as an extractive medium for BA.

Taking into account total biogenic amine levels (amount in fish + amount in vinegar), changes throughout the marinating showed two evolution patterns: PU, CA, PHE, TR, SD, and SM either slightly increased or remained quite constant (Table 2) whereas OC, SE, HI, TY, and AG clearly increased (Table 3). OC and SE increased independently of the state of the raw material. In E batches, SE and TY were the biogenic amines showing the highest formation as occurred in factory samples, whereas in C batches the highest formations were found in HI and AG. Thus, the quality of the fish used as raw material affects not only the total amount of BA found in the end product, but also their distribution pattern, with the major amine varying accordingly.

Percentages of total levels retained by fish and extracted by vinegar were calculated for each biogenic amine at the end of the marinating process (Figure 2). The percentage of BA retention in fish was very similar in batches E and C, the extractive efficiency of vinegar proving the same regardless of the total amine level originally present. The percentage of BA extracted in vinegar ranged from 43% to 71%, the average value being approximately 55%. Concerning to HI, at the end of the marinating process nearly 60% of total amount was found in vinegar. HI is the only BA whose maximum levels in fish and fish products are regulated by the European Union, with maximum average value of 100 mg /kg, and nearly twice this value for certain salt-ripened fish products (35). There is, however, no maximum HI level specified for derivatives obtained by marinating in vinegar.

**Table 2.** Contents (mg/kg) of putrescine (PU), cadaverine (CA), phenylethylamine (PHE), tryptamine (TR), spermidine (SD) and spermine (SM) in fish and vinegar during the manufacturing of classes E and C anchovies<sup>a</sup>.

	CLASSE				CLASS C			
	0	3	8	14	0	3	8	14
PU Fish	2,07(1,32)	2,60 (0,12)	2,61 (0,21)	2,56 (0,67)	47,89 (2,40)	16,75 (8,40)	15,34 (5,10)	14,52 (7,20)
Vinegar	6,41 (0,01)	5,38 (0,58)	5,35 (0,59)	4,97 (0,80)	6,41 (0,02)	19,71 (3,06)	20,21 (5,50)	19,24 (8,22)
<b>Total</b>	<b>8,48 (1,58)</b>	<b>7,98 (0,15)</b>	<b>7,96 (0,25)</b>	<b>7,53 (0,73)</b>	<b>54,3 (1,50)</b>	<b>36,46 (5,70)</b>	<b>35,55 (5,35)</b>	<b>33,76 (7,75)</b>
CA Fish	2,11 (1,49)	0,36 (0,16)	0,70 (0,26)	1,72 (0,99)	222,49 (6,70)	66,90 (6,22)	72,51 (9,25)	70,56 (9,25)
Vinegar	0,15 (0,01)	0,88 (0,08)	1,60 (0,54)	2,92 (1,13)	0,15 (0,01)	107,59 (4,30)	104,14 (9,20)	136,23 (6,25)
<b>Total</b>	<b>2,26 (1,70)</b>	<b>1,24 (0,19)</b>	<b>2,30 (0,32)</b>	<b>4,64 (1,22)</b>	<b>222,64 (3,50)</b>	<b>174,59 (6,70)</b>	<b>176,75 (8,25)</b>	<b>206,79 (8,77)</b>
PHE Fish	0,50 (0,25)	0,34 (0,01)	0,44 (0,50)	ND	19,83 (1,31)	8,10 (0,7)	7,52 (0,40)	6,52 (0,01)
Vinegar	ND <sup>b</sup>	ND	ND	ND	0,16 (0,02)	8,07 (0,05)	8,59 (1,00)	8,79 (0,30)
<b>Total</b>	<b>0,50 (0,25)</b>	<b>0,34 (0,01)</b>	<b>0,44 (0,50)</b>	<b>ND</b>	<b>19,19 (1,80)</b>	<b>16,17 (0,30)</b>	<b>16,11 (0,52)</b>	<b>15,31 (0,20)</b>
TR Fish	ND	ND	ND	ND	2,20 (0,11)	1,27 (0,01)	0,87 (0,04)	1,77 (0,07)
Vinegar	ND	ND	ND	ND	ND	1,75 (0,02)	1,50 (0,05)	1,60 (0,06)
<b>Total</b>					<b>2,2 (0,11)</b>	<b>3,02 (0,15)</b>	<b>2,37 (0,35)</b>	<b>3,37 (0,60)</b>
SD Fish	2,09 (0,38)	1,09 (0,27)	0,97 (0,57)	1,87 (0,27)	2,3 (0,31)	1,27 (0,03)	1,26 (0,20)	2,05 (0,30)
Vinegar	ND	0,95 (0,45)	1,8 (0,01)	2,54 (0,01)	ND	3,25 (1,20)	3,09 (0,90)	2,30 (0,05)
<b>Total</b>	<b>2,09 (0,38)</b>	<b>2,04 (0,33)</b>	<b>2,77 (0,69)</b>	<b>4,41 (0,38)</b>	<b>2,3 (0,31)</b>	<b>4,52 (0,60)</b>	<b>4,35 (0,55)</b>	<b>4,35 (0,90)</b>
SM Fish	3,46 (0,52)	2,36 (1,36)	2,31 (0,23)	1,62 (0,43)	5,55 (0,01)	6,60 (0,01)	1,83 (0,21)	2,22 (0,06)
Vinegar	ND	0,63 (0,01)	3,07 (1,68)	3,96 (0,13)	ND	1,10 (0,02)	5,56 (0,90)	2,03 (1,30)
<b>Total</b>	<b>3,46 (0,52)</b>	<b>2,99 (1,65)</b>	<b>5,38 (0,27)</b>	<b>5,58 (0,52)</b>	<b>5,55 (0,01)</b>	<b>7,70 (0,50)</b>	<b>7,39 (0,15)</b>	<b>4,25 (0,70)</b>

<sup>a</sup> Data are given as mean (standard deviations) of two batches. <sup>b</sup> Not detected

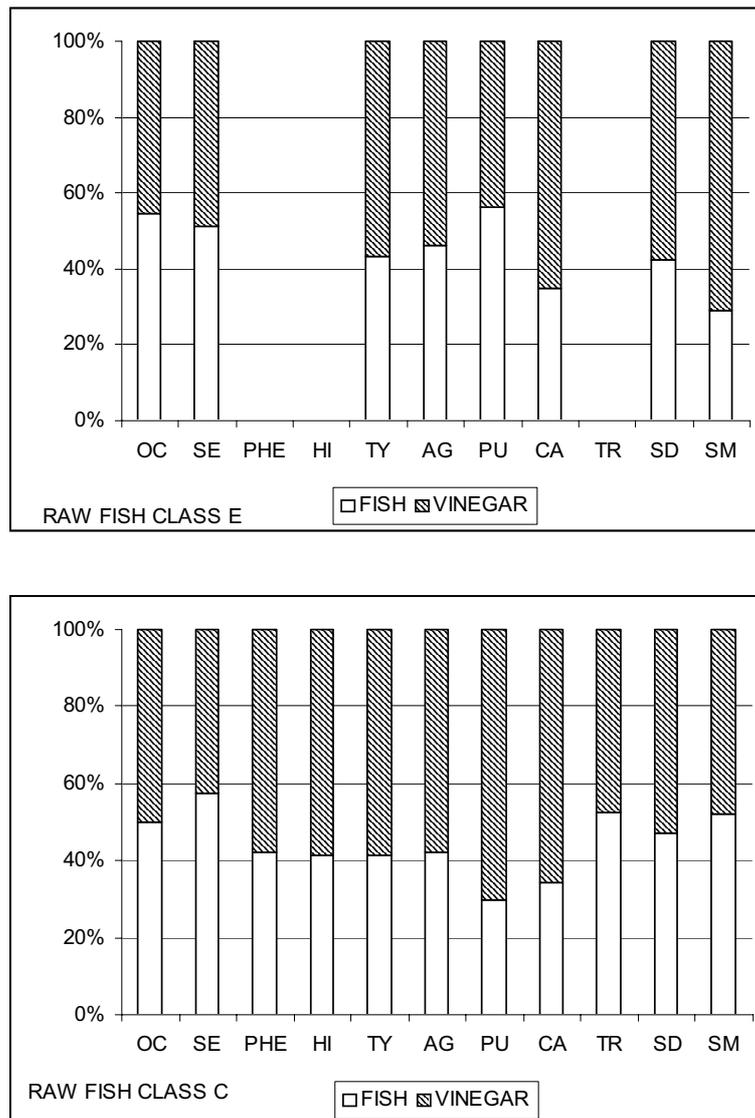
**Table 3.** Contents (mg/kg) of octopamine (OC), serotonin (SE), histamine (HI), tyramine (TY), and agmatine (AG) in fish and vinegar during the marinating of classes E and C anchovies<sup>a</sup>.

	CLASSE					CLASS C				
	0	3	8	14		0	3	8	14	
OC Fish	ND <sup>a</sup>	ND	2,17 (0,23)	3,82 (0,96)		ND	0,89 (0,01)	2,77 (0,01)	3,53 (0,01)	
Vinegar	ND	0,06 (0,01)	1,80 (0,01)	3,15 (0,21)		ND	0,64 (0,03)	1,99 (0,01)	3,56 (0,02)	
<b>Total</b>		<b>0,06 (0,01)</b>	<b>3,97 (0,28)</b>	<b>4,97 (1,73)</b>			<b>1,53 (0,06)</b>	<b>4,76 (0,01)</b>	<b>7,09 (0,20)</b>	
SE Fish	ND	1,90 (0,18)	5,22 (0,71)	9,87 (1,14)		ND	1,88 (0,05)	7,15 (0,02)	10,69 (1,14)	
Vinegar	ND	0,94 (0,36)	5,17 (0,32)	9,32 (0,03)		ND	1,86 (0,02)	5,14 (1,30)	7,93 (1,25)	
<b>Total</b>		<b>2,84 (0,20)</b>	<b>10,39 (0,62)</b>	<b>19,19 (1,39)</b>			<b>3,74 (0,40)</b>	<b>12,19 (1,20)</b>	<b>18,62 (0,95)</b>	
HI Fish	ND	0,22 (0,02)	0,50 (0,04)	0,54 (0,65)		164,33 (8,60)	110,26 (1,00)	126,09 (4,10)	117,76 (4,00)	
Vinegar	0,51 (0,05)	0,62 (0,04)	0,69 (0,21)	0,48 (0,15)		0,51 (1,00)	83,35 (2,30)	118,78 (2,50)	166,88 (2,50)	
<b>Total</b>	<b>0,51 (0,05)</b>	<b>0,84 (0,01)</b>	<b>1,19 (0,03)</b>	<b>1,02 (0,05)</b>		<b>164,84 (1,20)</b>	<b>193,61 (1,35)</b>	<b>244,87 (3,30)</b>	<b>284,64 (4,25)</b>	
TY Fish	0,74 (0,68)	1,55 (0,36)	3,43 (1,10)	7,81 (3,59)		98,67 (5,09)	63,64 (0,80)	57,13 (7,90)	55,43 (1,20)	
Vinegar	1,19 (0,02)	1,54 (0,28)	3,76 (1,45)	8,48 (3,03)		1,19 (0,50)	51,95 (1,25)	52,37 (8,00)	71,18 (2,23)	
<b>Total</b>	<b>1,93 (0,80)</b>	<b>3,09 (0,45)</b>	<b>7,19 (1,35)</b>	<b>16,29 (4,39)</b>		<b>99,86 (3,20)</b>	<b>115,59 (2,30)</b>	<b>109,5 (6,25)</b>	<b>126,61 (4,20)</b>	
AG Fish	3,59 (1,49)	1,10 (0,52)	1,55 (0,32)	1,82 (0,51)		153,83 (5,50)	71,68 (2,20)	92,96 (6,50)	102,32 (1,70)	
Vinegar	0,02 (0,01)	1,20 (0,61)	1,53 (0,99)	2,08 (0,96)		0,02 (0,01)	86,97 (2,10)	96,37 (3,20)	139,6 (5,80)	
<b>Total</b>	<b>3,61 (2,27)</b>	<b>2,31 (0,62)</b>	<b>3,08 (0,38)</b>	<b>3,9 (0,63)</b>		<b>153,85 (2,30)</b>	<b>158,65 (2,20)</b>	<b>189,33 (7,20)</b>	<b>241,92 (4,65)</b>	

<sup>a</sup> Data are given as mean (standard deviations) of two batches. <sup>b</sup> Not detected

The results of this study suggest that the current limits of HI salt-ripening anchovies are not appropriated for marinated anchovies. Taking into account the extractive effects of vinegar, the current 200 mg/kg maximum set for salt-ripened anchovies should be reduced for marinated anchovies. In addition, measurements of HI and other biogenic amines in vinegar of marinated fish samples could serve as a simple and useful tool to verify the freshness of fish used as raw material, since these vinegar amine levels remain low in class E anchovies. However, further studies are needed to set maximum BA levels permissible in anchovies marinated in vinegar and to find levels of BA in vinegar to classify the quality of raw fish used.

**Figure 2.** Distribution of biogenic amines between fish and vinegar detected at the end of the marinating process in samples from classes E and C raw fish.



### LITERATURE CITED

- (1) Meyer, V. Marinades. In *Fish as Food*; Borgstrom G. Ed.; Academic Press: New York, **1965**; Vol. 3, Part 1, pp. 165 – 191.
- (2) Poligne, I.; Collignan, A. Quick marination of anchovies (*Engraulis encrasicolus*) using acetic and gluconic acids. Quality and stability of the end product. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* **2000**, 33, 202-209.
- (3) Pérez-Villareal, B.; Pozo, R. Ripening of salted anchovy (*Engraulis encrasicolus*): Study of the sensory, biochemical and microbiological aspects. In *Quality Assurance in the Fish Industry*; Huss, H.H., Jakobsen, M., Liston, J., Eds.; Elsevier Science Publishers B.V.: Amsterdam, **1992**; pp. 157-167.
- (4) Besteiro, I.; Rodríguez, C.J.; Tilves, F.; Pascual, C. Analisis sensorial, variaciones en la composición y evolución de compuestos nitrogenados durante la elaboración de conservas de atún. *Alimentaria* **1993**, 248, 19-51.
- (5) Civera, T.; Turi, R.M.; Paris, E.; Fazio, G. Further investigations on total volatile Basic nitrogen and trimethylamine in some Mediterranean teleosteans during cold storage. *Sci. Aliments* **1995**, 15 (2), 179-186.
- (6) Ringo, E.; Stenberg, E.; Strom, A.R. Aminoacid and lactate catabolism in trimethylamine oxide respiration of *Alteromonas putrefaciens* NCMB 1735. *Appl. Environ. Microb.* **1984**, 47 (5), 1084-1089.
- (7) Babbitt, J. K.; Crawford, D.L.; Law, D. K. Decomposition of trimethylamine oxide and changes in protein extractability during frozen storage of minced and intact hake (*Merluccius products*) muscle. *J. Agric. Food Chem.* **1972**, 20 (5), 1052-1054.
- (8) Rodríguez, C.; Masoud, T.; Huerta, M. D. Estudio de los principales productos de degradación de la trimetilaminaoxido en cuatro especies de pescado sometidas a refrigeración. *Alimentaria* **1997**, 288, 131-135.
- (9) Hui, J. Y.; Taylor, S. L. High pressure liquid chromatographic determination of putrefactive amines in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1983**, 66 (4), 853-857.
- (10) Veciana-Nogués, M.T; Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, M.C. Biogenic amines in fresh and canned tuna. Effect of canning on biogenic amines content. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 4324-4328.

- (11) Koutsoumanis, K.; Lampropoulou, K.; Nychas, G.J.E. Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) stored aerobically at 0, 8 and 15°C. *J. Food Protect.* **1999**, 62 (4), 398-402.
- (12) Rice, S.; Eitenmiller, R.R.; Koehler, P.E. Biologically active amines in food: a review. *J. Milk Food Technol.* **1976**, 39 (5), 353-358.
- (13) Ababuch, L. Food poisoning by histamine. Review. *Fish Tech. News.* **1991**, 11, 5-9.
- (14) Gökoglu, N. Changes in biogenic amines during maturation of sardine *Sardina pilchardus* marinade. *Fisheries Sci.* **2003**, 69, 823-829.
- (15) Taylor, S.L. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **1986**, 17 (2), 91-128.
- (16) Clifford, M.N.; Walker, R. The aetiology of scombrototoxicosis. *Int. J. Food Sci. Tech.* **1992**, 27, 721-724.
- (17) Arnedo-Pena, A.; Bellido-Blasco, J.B.; Pac-Sa, M.R.; González-Morán, F.; Criado-Juárez, J.; Mesanza del Notario, I.; Rodríguez-Merquero, N.; Balagué- López, A. Escombrointoxicación colectiva por consumo de atún en Castellón. *Med. Clin.* **1996**, 107 (17), 645-648.
- (18) Gardner, D.M.; Shulman, K.I.; Walker, S.E.; Taylor, S.A.N. The making of a user- friendly MAOI diet. *J. Clin. Psychiatry* **1996**, 57, 99-104.
- (19) Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, M.C.; Izquierdo-Pulido, M.; Veciana-Nogués, M.T.; Hernández-Jover, T. Les amines biogenes dans les aliments: Leur signification, leur analyse. *Ann. Fals Exp. Chim.* **1995**, 88 (931), 119-140.
- (20) FDA. Decomposition and histamine-raw, frozen tuna and mahi-mahi; canned tuna and related species; revised compliance policy guide, availability. *Fed. Regist.* **1995**, 14, 39754-39756.
- (21) Middlebrooks, B.L.; Toom, P.M.; Douglas, W.L.; Harrison, R.E.; Mc Dowell, S. Effects of storage time and temperature on the microflora and amine development in Spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*). *J. Food Sci.* **1988**, 53 (4), 1024-1029.
- (22) Veciana-Nogués, M.T.; Albalá-Hurtado, S.; Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, M.C. Changes in biogenic amines during the manufacture and

- storage of semipreserved anchovies. *J. Food Protect.* **1996**, 59 (11), 1218-1222.
- (23) Hernández-Herrero, M.M.; Roig-Sagués, A.X.; López-Sabater, E.I.; Rodríguez-Jerez, J.J.; Mora-Ventura, M.T. Influence of raw fish quality on some physicochemical and microbiological characteristics as related to ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus* L.). *J. Food Sci.* **2002**, 67 (7), 2631-2640.
- (24) Pons-Sánchez-Cascado, S.; Veciana-Nogués, M.T.; Vidal-Carou, M.C. Effect of delayed gutting on biogenic amine contents during ripening of European anchovies. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, 216, 489-493.
- (25) Gökoglu, N.; Cengiz, E.; Yerlikaya, P. Determination of the shelf life of marinated sardine (*Sardina pilchardus*) stored at 4 °C. *Food Control* **2004**, 15, 1-4.
- (26) Consejo de la Comunidad Europea (CCE), 96/2406. Fijación de normas comunes de comercialización de productos de la pesca. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* **1996**, L334: 1229.
- (27) Pons-Sánchez-Cascado, S.; Izquierdo-Pulido, M.; Mariné-Font, A.; Veciana-Nogués, M.T.; Vidal-Carou, M.C. Reliability of Trimethylamine and Total Volatile Basic Nitrogen determinations by Flow Injection-Gas Diffusion Techniques in pelagic fish: *Engraulis encrasicolus*. *Quím. Anal.* **2000**, 19, 165-170.
- (28) Veciana-Nogués, M.T.; Hernández-Jover, T.; Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, M.C. Liquid chromatographic method for determination of biogenic amine in fish and fish products. *J. AOAC Int.* **1995**, 78 (4), 1045-1050.
- (29) Castell, C.; Geenough, M.; Rodgers, R.; Macfarland, A. Grading fish for quality. I. Trimethylamine values of fillet cut from graded fish. *J. Fish Res. Bd. Can.* **1958**, 28, 1-25.
- (30) Consejo de la Comunidad Europea (CCE), 95/149. Determinación de la concentración de Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT) en pescado y derivados. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* **1995**, L97, 84-87.
- (31) Vidal-Carou, M.C.; Isla-Gavin, M.J.; Mariné-Font, A.; Codony-Salcedo, R. Histamine and tyramine in natural sparkling wine, vermouth, cider and vinegar. *J. Food Comp. Anal.* **1989**, 2, 210-218.

- (32) Kirschbaum, J.; Meier, A.; Brückner, H. Determination of biogenic amines in fermented beverages and vinegars by pre-column derivatization with para-nitrobenzyloxycarbonyl chloride (PNZ-Cl) and reversed-phase LC. *Chromatographia* **1999**, 49 (3/4), 117-124.
- (33) Pollack, F.F; Koldovsky, O.; Nishiota, K. Polyamines in human and rat milk and infant formulas. *J. Clin. Nutr.* **1992**, 56, 371-375.
- (34) Hernández-Jover, T.; Izquierdo-Pulido, M.; Veciana-Nogués, M.T; Vidal-Carou, M.C. Ion pair high performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in meat and meat products. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 2710-2715.
- (35) Consejo de la Comunidad Europea (CCE), 91/493. Normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de productos pesqueros. *Diario Oficial Comunidades Europeas* **1991**, L268, 15-34.
- (36) Veciana-Nogués, M.T.; Vidal-Carou, M.C.; Mariné-Font, A. Histamine and tyramine in preserved and semi-preserved fish products. *J. Food Sci.* **1989**, 54, 1653-1655.
- (37) Veciana-Nogués, M.T; Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, M.C. Changes in biogenic amines during the storage of Mediterranean anchovies immersed in oil. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 1385-1389.

## **AKNOWLEDGEMENTS**

We would like to acknowledge grant QUALPOISS2 (FAIR.CT 96.3253) and thank the *Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica* (CIRIT, 2001 SGR-00132) of the *Generalitat de Catalunya* (Spain) for financial support. We would also like to thank the Siro and Xavi & Nassari company for supplying anchovy samples. S. Pons-Sánchez-Cascado is the recipient of a pre-doctoral fellowship from the *Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica* (CIRIT) of the *Generalitat de Catalunya* (Spain).



## **16. ESTUDIO DE LA SIGNIFICACIÓN TOXICOLÓGICA DE LOS CONTENIDOS DE AMINAS BIÓGENAS EN DERIVADOS DE BOQUERÓN**

**Veciana-Nogués, T.; Pons-Sánchez-Cascado, S.; Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, M. C. (2004).** Histamina y otras aminas biógenas en anchoas y boquerones en vinagre. Presentación de una comunicación escrita (Póster) en el “VI congreso de la sociedad española de nutrición comunitaria y IV congreso Íbero-americano de nutrición y salud pública” .

### **16.1. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO**

En personas susceptibles o cuando los mecanismos de detoxificación resultan insuficientes, algunas aminas biógenas pueden provocar variedad de síntomas cutáneos, gastrointestinales, hemodinámicas y/o neurológicos (Lehane y Olley, 2000). Así, por ejemplo, las aminas biógenas aromáticas (histamina, tiramina, serotonina,  $\beta$ -feniletilamina, triptamina) se han asociado a intoxicaciones histamínicas, migrañas y crisis hipertensivas debido a su interacción con medicamentos IMAO y las diaminas (putrescina y cadaverina) pueden generar nitrosaminas cancerígenas en presencia de nitritos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la posible implicación de los contenidos de aminas biógenas presentes en derivados de boquerón en la salud del consumidor. Para ello se realizó un estudio de mercado con 3 tipos de semiconservas: boquerones en vinagre, anchoas maduras en salmuera y envasadas en sal y anchoas maduras en salmuera y envasadas en aceite.

## 16.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los contenidos de aminas biógenas variaron en función del derivado considerado, siendo superiores en los productos madurados en salmuera que en los marinados en vinagre (Tabla 16.1). Dentro de los dos tipos de envasado de las anchoas maduradas en sal, las que fueron envasadas en aceite mostraron una mayor dispersión de los resultados, debido seguramente a la manipulación que comporta el fileteado en este tipo de semiconservas.

**Tabla 16.1.** Contenidos mínimos - máximos de aminas biógenas (mg/kg) en semiconervas de boquerones.

	HI <sup>(1)</sup>	TI	PU	CA	FE	TR	SE
<b>Boquerones en vinagre</b>	ND <sup>(2)</sup> - 1,0	ND - 0,7	ND - 1,4	ND - 2,8	ND - 0,7	ND	ND - 3,0
<b>Anchoas en sal</b>	1,2 - 3,5	6,6 - 30,8	2,7 - 9,2	17,3 - 25,0	ND - 0,7	ND - 0,9	ND - 0,3
<b>Anchoas en aceite</b>	ND - 26,5	13 - 59,3	1,6 - 21,1	ND - 55,8	ND - 5,7	ND - 6,5	ND - 29,8

<sup>(1)</sup> HI: histamina, TI: tiramina, PU: putrescina, CA: cadaverina, FE: feniletilamina, TR: triptamina, SE: serotonina

<sup>(2)</sup> No detectado

Los contenidos encontrados de histamina, hace que sea muy poco probable una intoxicación histamínica con este tipo de productos. Estos resultados están en concordancia con la escasez de brotes descritos por intoxicación histamínica atribuidos al consumo de derivados del boquerón. Sin embargo, debido a los contenidos de tiramina que presentan las anchoas marinadas en sal, sobretodo las envasadas en aceite sería recomendable que pacientes con tendencia a migrañas o bajo tratamientos con IMAOs no consumieran este tipo de semiconservas. En pacientes tratados con IMAOs clásicos (irreversibles) una ingesta de 220 g de anchoas en aceite, sería suficiente para alcanzar los 6 mg de tiramina descritos como cantidad necesaria para desencadenar crisis hipertensivas. En el caso de que el paciente esté tratado con IMAOs reversibles o selectivos, el riesgo disminuye, ya que se necesitan ingestas más elevadas para que se manifiesten los efectos adversos anteriormente descritos.

# HISTAMINA Y OTRAS AMINAS BIÓGENAS EN ANCHOAS Y BOQUERONES EN VINAGRE

Teresa Veciana-Nogués, Sofia Pons-Sánchez-Cascado, Abel Mariné Font, M. Carmen Vidal Carou.



Departament de Nutrició i Bromatologia-CeRTA, University of Barcelona,

Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain



Las aminas biógenas son compuestos cuya presencia en los alimentos en cantidades importantes se asocia tradicionalmente al desarrollo de microorganismos. El aporte exógeno de estas aminas puede tener implicaciones para la salud cuando por algún motivo resultan insuficientes los mecanismos de detoxificación del organismo (Figura 1). El boquerón, materia prima para la elaboración de boquerones en vinagre y anchoas (Figura 2), es un buen sustrato para la formación de histamina (HI) que consumida en cantidades elevadas puede dar lugar a intoxicaciones histaminicas (IH). Así, por ejemplo, en 1981 se registró un brote atribuido al consumo de unas anchoas españolas en el Reino Unido (1). Las anchoas, como otros alimentos madurados, pueden contener también tiramina (TI), y beta-feniletilamina, relacionadas con migrañas o con crisis hipertensivas descritas en individuos especialmente sensibles o bajo tratamiento con medicamentos inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAO) (2). El prospecto de los medicamentos IMAO (Tabla 1), empleados en el tratamiento de depresiones y Parkinson, advierte de su interacción con alimentos ricos en aminas, especificando que los encurtidos de pescado y las salazones (que incluirían los derivados del boquerón) son alimentos de riesgo.

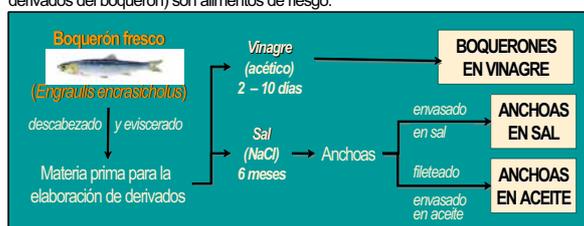


Figura 2. Proceso de elaboración de los derivados del boquerón.

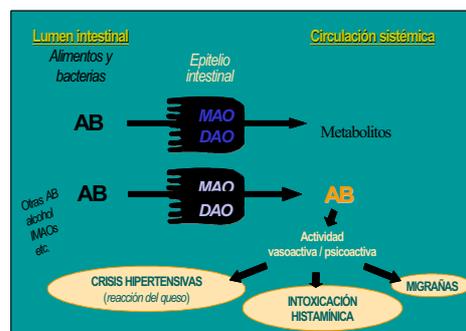


Figura 1. Efectos tóxicos de las AB de los alimentos.

Menerix®, Moclobemida Teva®	Modobemida (IMAO-A irreversible)
Pamate®	Tranicipromina (IMAO no selectivo irreversible)
Plurimen®, Selegilina Davur®, Selegilina	Selegilina (IMAO-B reversible)
Profas®	

Tabla 1. Especialidades farmacéuticas con sustancias IMAO.

## Objetivo

Estudiar los contenidos de histamina y otras aminas biógenas en derivados de anchoa con el fin de evaluar su posible implicación en la salud del consumidor.

## Material y Métodos

**Determinación de AB** por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (3) en: boquerones en vinagre (n=10), anchoas maduras en salmuera y envasadas en sal (n=10) o en aceite (n=30) y adquiridas en el mercado.

Tabla 2. Contenidos de aminas biógenas (mg/kg) en productos derivados del boquerón.

	HI <sup>a</sup>	TI	FE	TR	SE	PU	CA
Boquerón En vinagre	0,9 (0,3) <sup>b</sup> nd - 1,0	0,3 (0,5) nd - 0,7	0,1 (0,2) nd - 0,7	nd	0,3 (0,9) nd - 3,0	1,0 (1,0) nd - 1,4	1,4 (1,2) nd - 2,8
Anchoas en sal	1,3 (0,9) 1,2 - 3,5	16,3 (8,1) 6,6 - 30,8	0,1 (0,2) nd - 0,7	0,3 (0,3) nd - 0,9	0,1 (0,1) nd - 0,3	6,3 (2,3) 2,7 - 9,2	21,8 (4,0) 17,3 - 25,0
Anchoas en aceite	8,2 (9,4) nd - 26,5	27,4 (19,9) 13 - 59,3	2,0 (0,3) nd - 5,7	1,2 (2,3) nd - 6,5	5,1 (0,7) nd - 29,8	5,6 (4,8) 1,6 - 21,1	15,1 (14,5) nd - 55,8

<sup>a</sup>HI, histamina; TI, tiramina; FE, feniletilamina; TR, triptamina; SE, serotonina; PU, putrescina; CA, cadaverina. <sup>b</sup>Media (desviación estándar). <sup>c</sup>Intervalo: mínimo - máximo.

## Resultados y Discusión

Se observaron diferencias claras en el contenido de AB en función del tipo de derivado del boquerón (Tabla 2). En el boquerón en vinagre los niveles de AB fueron siempre muy bajos por lo que su marinado parece efectivo para evitar la proliferación de los microorganismos formadores de estos compuestos. En las anchoas en sal, la HI fue también baja (<3,5 mg/kg), aunque otras AB alcanzaron niveles mucho más altos, llegando p.e. a cerca de 30mg/kg de CA. En las anchoas en aceite se observó una gran variabilidad de contenidos. Así, aunque en una muestra se alcanzaron 26.7 mg/kg de HI, en otras no se detectó. En estos productos destacó también la TI, con valor medio de 27.4±19.8 mg/kg y un valor máximo de cerca de 90 mg/kg. Los mayores contenidos de AB de las anchoas envasadas en aceite pueden en parte atribuirse a la obligada manipulación que comporta su fileteado, etapa que no es necesaria en las anchoas envasadas en sal. Difícilmente el contenido en HI de los productos estudiados podría ser motivo de la aparición de intoxicación histaminica, de acuerdo con los escasos brotes atribuidos al boquerón fresco o sus derivados. Sin embargo, los individuos genéticamente deficientes en el enzima DAO deberían prestar atención al consumo de anchoas envasadas en aceite. En pacientes bajo tratamiento con medicamentos IMAO clásicos (irreversibles) un consumo de 6 mg de TI puede ser suficiente para desencadenar crisis hipertensivas mientras que con los IMAO de generaciones posteriores (reversibles y/o selectivos para uno de los dos isoenzimas de la MAO) se pueden tolerar entre 50-150 mg/kg de TI. Por ello, sólo en el caso de tratamientos con IMAO clásicos, al consumo de anchos en aceite puede suponer riesgo de crisis hipertensivas debido a la interacción entre AB y estos fármacos. Cabe destacar también que en anchoas en aceite y en sal se encontraron también cantidades significativas de otras AB cuya presencia podría potenciar los efectos de HI y TI.

## Conclusión

El relativamente bajo contenido de HI en las muestras concuerda con la falta de registros de intoxicaciones histaminicas relacionados con derivados del boquerón. Sin embargo, los individuos especialmente sensibles deberían prestar atención al consumo de anchoas en aceite. Este estudio revalida la recomendación de no consumir anchoas a pacientes migrañosos o bajo tratamiento con IMAO, aunque teniendo en cuenta los niveles de TI alcanzados y que generalmente la ración de consumo habitual de los derivados del boquerón es pequeña, parece difícil que se den crisis hipertensivas cuando se emplean IMAO de 2ª y 3ª generación.

**Bibliografía (1)** Murray CK y col. Scombrotin and scombrotin-like poisoning from canned fish. J Hyg Camb 1982; 88: 215; **(2)** Brink B y col. Occurrence and formation of biologically active amines in food. Int Food Microbiol 1991; 11: 73-83; **(3)** Veciana-Nogués M T y col. Liquid chromatographic method for determination of biogenic amine in fish and fish products. J AOAC Int 1995; 78 (4): 1045-50.



---

## **V. CONCLUSIONES**

---



## 17. CONCLUSIONES

- **Las técnicas de análisis por inyección de flujo** validadas para la determinación de nitrógeno de trimetilamina y nitrógeno básico volátil total en boquerones, son fiables, precisas y más sensibles que las técnicas tradicionales. Presentan además como ventajas adicionales su rapidez, sencillez y bajo coste, lo que permite su uso rutinario en lonjas e industrias de procesado de pescado.
- **Los esquemas sensoriales** desarrollados para la evaluación del boquerón crudo y cocido resultan adecuados para valorar su frescura, mostrando una buena correlación con los parámetros microbiológicos legalmente establecidos.
- **Las aminas volátiles** no son adecuadas como indicadoras del grado de frescura, ya que no muestran cambios significativos a lo largo del almacenamiento del boquerón en hielo.
- **La cadaverina** es la amina biógena que presentó una mayor formación y la que mostró su incremento de forma más temprana durante la conservación del boquerón en hielo, seguida de putrescina y en menor grado de tiramina e histamina, siendo por tanto estas cuatro aminas las que presentan más interés como indicadoras de la calidad higiénica.
- **Los recuentos microbianos** de todos los grupos estudiados incrementaron durante el almacenamiento del boquerón en hielo, siendo micrococos y estafilococos los grupos dominantes, seguidos por pseudomonas y enterobacterias y por último las bacterias del ácido láctico.
- Para valorar la **calidad microbiológica** del boquerón almacenado en hielo se estima más adecuado el límite de  $10^5$  ufc/g (propuesto por

## Conclusiones

---

algunos autores para microorganismos psicrófilos) que el límite de mesófilos legalmente establecido.

- **El índice de aminas biógenas** que se propone (histamina + tiramina + putrescina + cadaverina) permite la valoración de la calidad higiénico-sanitaria del boquerón, estableciéndose un valor máximo de aceptación de 15 mg/kg.
- Las bacterias Gram negativas aisladas de boquerón en hielo (enterobacterias y pseudomonas) con **capacidad aminoácido descarboxilasa in vitro** fueron productoras de diaminas (putrescina y cadaverina), mientras que las Gram positivas (bacterias del ácido láctico y enterococos) produjeron tiramina. Micrococos y estafilococos no formaron aminas biógenas *in vitro*.
- **El retraso en la evisceración** en la preparación de anchoas maduras en sal se traduce en un aumento de los niveles de algunas aminas biógenas en el producto final.
- **La calidad higiénica de la materia prima** es un factor crítico para la acumulación de aminas biógenas y de nitrógeno básico volátil total durante la maduración de anchoas en sal.
- **Existe cierta discordancia en la formación de aminas biógenas in vitro y durante la elaboración de las anchoas maduras en sal.** La mayoría de microorganismos aislados fueron formadores de histamina *in vitro*, mientras que la tiramina fue la amina mayoritaria en estos productos.
- **La manipulación** que supone el fileteado y envasado de las anchoas en salazón conlleva un riesgo de contaminación microbiana que se traduce en un aumento de los contenidos de aminas biógenas.
- Las aminas biógenas y volátiles en boquerones marinados en vinagre no son parámetros adecuados para la valoración de la calidad higiénica de la materia prima empleada, puesto que existe un importante **efecto extractor del vinagre** sobre estos compuestos.

- **Los contenidos de aminos biógenas** en todas las muestras estudiadas en este trabajo son insuficientes para provocar una intoxicación directa. Sólo en individuos susceptibles, con tendencia a migrañas o bajo tratamiento con medicamentos IMAO podría ser recomendable limitar el consumo de semiconservas de anchoas, especialmente las maduradas en sal y envasadas en aceite, debido a que éstas pueden llegar a presentar concentraciones elevadas de tiramina.



---

## **VI. BIBLIOGRAFÍA**

---



## 18. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Ababuch, L. (1991).** Food poisoning by histamine. *Review Fish Tech News*, 11: 5-9.

**Ababouch, I.; Afilal, M. E.; Benabdeljelil, H.; Fusta, F. F. (1991).** Quantitative changes in bacteria, amino acids and biogenic amines in sardine (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25-28°C) and in ice. *Int J Food Sci Technol*, 26: 297-306.

**Ababouch, L. H.; Soubri, L.; Rhaliby, K.; Ouahdi, O.; Battal, M.; Busta, F. F. (1996).** Quality changes in sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature. *Food Microbiol*, 13: 123-132.

**Abee, T.; Wouters, J. (1999).** Microbial stress response in minimal processing. *Int J Food Microbiol*, 50: 65-91.

**Alasalvar, C.; Taylor, K. D. A.; Öksüz, A.; Shahidi, F.; Alexis, M. (2002).** Comparison of freshness quality of cultured and wild Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Food Sci*, 67 (9): 3220-3226.

**Albrecht-Ruiz, M.; Clark-Leza, D.; Aleman-Polo, M. (1999).** Rapid method for biogenic amine evaluation in fish meal. *J Aquat Food Product Technol*, 8 (4): 71-83.

**Alur, M. D.; Venugopal, V.; Nerkar, D. P.; Nair, P. M. (1991).** Bacterial spoilage profiles to identify irradiated fish. *J Food Sci*, 56 (2): 332-334.

**Anastasio, A.; Vollano, L.; Visciano, P.; Miranda, E.; Cortes, M. L. (1999).** Correlations between pH, total volatile basic nitrogen, trimethylamine and sensory evaluation in fresh fish slices. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 50: 63-66.

**Anzaldúa-Morales, A. (1994).** La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica. Ed Acribia, Zaragoza.

**AOAC (1995).** AOAC official method of analysis. AOAC Official method 971.14, capítulo 35, pp. 7.

**Arkoudeulos, J. S.; Samaras F. J.; Tassou C. C. (2003).** Survival of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* on salted sardines (*Sardina pilchardus*) during ripening. *J Food Prot*, 66: 1479-1481.

**Arnedo-Pena, A.; Bellido-Blasco, J. B.; Pac-Sa, M. R.; González-Morán, F.; Criado-Juárez, J.; Mesanza del Notario, I.; Rodríguez-Merquero, N.; Balagué- López, A. (1996).** Escombrountoxicación colectiva por consumo de atún en Castellón. *Med Clin*, 107 (17): 645-648.

**Astiasarán, I.; Villanueva, R.; Bello, J. (1990).** Analysis of proteolysis and protein insolubility during the manufacture of some varieties of dry sausage. *Meat Sci*, 28: 111-117.

**Babbitt, J. K.; Crawford, D. L.; Law, D. K. (1972).** Decomposition of trimethylamine oxide and changes in protein extractability during frozen storage of minced and intact hake (*Merluccius* products) muscle. *J Agric Food Chem*, 20 (5): 1052-1054.

**Baixas-Nogueras, S.; Bover-Cid, S.; Vidal-Carou, M. C.; Veciana-Nogués, M. T. (2001a).** Volatile and non volatile amines in Mediterranean hake as a function of their storage temperaure. *J Food Sci*, 66 (1): 83-88.

**Baixas-Nogueras, S.; Bover-Cid, S.; Vidal-Carou, M. C.; Veciana-Nogués, M. T.; Mariné-Font, A. (2001b).** Trimethylamine and Total Volatile Basic Nitrogen Determination by Flow Injection/Gas Diffusion in Mediterranean Hake (*Merluccius merluccius*). *J Agric Food Chem*, 49: 1681-1686.

**Baixas-Nogueras, S.; Bover-Cid, S.; Veciana-Nogués, M. T.; Vidal-Carou, M. C. (2003).** Amino acid-decarboxylase activity in bacteria associated with Mediterranean hake spoilage. *Eur Food Res Technol*, 217: 164-167.

**Baixas-Nogueras, S.; Bover-Cid, S.; Veciana-Nogués, T.; Nunes, M. L.; Vidal-Carou, M. C. (2003).** Development of a Quality Index Method to evaluate freshness in Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*.) *J Food Sci*, 68 (3): 1067-1071.

**Banwart, J. G. (1982).** Microbiología básica de los alimentos. Anthropos, Barcelona, 464 pp.

**Bárcenas, P.; Pérez-Elortondo, F. J.; Salmerón, J.; Albisu, M. (2000).** I. Desarrollo del vocabulario descriptivo y uso de referencias específicas. *Alimentaria*, 314: 23-29.

- Bárcenas, P.; Pérez-Elortondo, F. J.; Salmerón, J.; Albisu, M. (2000).** II. Selección, entrenamiento y control de los catadores. *Alimentaria*, 314: 31-36.
- Bardócz, S. (1993).** The role of dietary polyamines. *Eur J Clin Nutr*, 47: 683-690.
- Bardócz, S.; Grant, G.; Brown, D.; Ralph, A.; Pusztai, A. (1993).** Polyamines in food – implications for growth and health. *J Nutr Biochem*, 4: 66-71.
- Bardócz, S. (1995).** Polyamines in food and their consequences for quality and human health. *Trends Food Sci and Tech*, 6: 341-346.
- Bardócz, S. (1999).** Role of biogenic amines - summing up or that is it we do not know? In: Bardócz, S., Koninkx, J., Grillo, M., y White, A. Eds. *COST 917 Biogenically active amines in food. Vol III: Biologically active amines in food processing and amines produced by bacteria, and polyamines and tumor growth*. Office for Official Publications of the European Communities. European Commission. Luxembourg, pp. 1-4.
- Beatty, S. A.; Gibbons, N. E. (1937).** The measurement of spoilage in fish. *J Biol Board Can*, 3 (1): 77-91.
- Beltrán, A. (1990).** Control de calidad del pescado ahumado. *Alimentaria*, 210: 27-31.
- Ben-Gigirey, B.; Vieites Baptista de Sousa, J. M.; Villa, T. G.; Barros-Velázquez, J. (1998).** Changes in biogenic amine and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *J Food Protec*, 5: 608-615.
- Ben-Gigirey, B.; Vieites Baptista de Sousa, J. M.; Villa, T. G.; Barros-Velázquez, J. (1999).** Histamine and cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen albacore (*Thunnus alalunga*). *J Food Protec*, 62 (8): 933-939.
- Bennour, M.; El Marrakchi, A.; Bouchriti, N.; Hamana, A.; El Ouadaa, M. (1991).** Chemical and microbiological assessment of mackerel (*Scomber scombrus*) stored in ice. *J Food Protect*, 54: 784, 789-792.
- Besteiro, I.; Rodríguez, C. J.; Tilve-Jar, C.; Pascual, C. (1996a).** Análisis sensorial descriptivo del anchoado del boquerón. *Alimentaria*, 274: 73-79.
- Besteiro, I.; Rodríguez, C. J.; Tilves, F.; Pascual, C. (1996b).** Analisis sensorial, variaciones en la composición y evolución de compuestos

nitrogenados durante la elaboración de conservas de atún. *Alimentaria*, 248: 19-51.

**Beutling, D. (1996).** In: Biogenic amine in nutrition (Biogene Amine in der Ernährung). Springer-Verlag. Berlín, Germany, pp. 59-67.

**Billon, J.; Ollieuz, N.; Tao, S. H. (1979).** Etude d'une nouvelle dosage de l'azote basique volatile total (ABVT). *RTVA*, 149: 13-19.

**Bito, M.; Yamada, K.; Mikuno, Y.; Amano, K. (1983).** Studies on the rigor mortis of fish. I. Difference on the mode of rigor mortis among some varieties of fish by modified Cutting's method. *Bul Tokai reg Fish Res Lab*, 109: 89.

**Botta, J. R. (1995).** Evaluation of Seafood Freshness Quality. VSH Publishers, United States of America, pp. 180.

**Bover-Cid, S.; Holzapfel, W. H. (1999a).** Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*, 53: 33-41.

**Bover-Cid, S.; Izquierdo-Pulido, M.; Vidal-Carou, M.C. (1999b).** Effect of proteolytic starter cultures of *Staphylococcus spp.* on the biogenic amine formation during the ripening of dry fermented sausages. *Int J Food Microbiol*, 48: 95-104.

**Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M. C. (2001).** Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *Int J Food Microbiol*, 66: 185-189.

**Bremner, H. A.; Sakaguchi, M. (2000).** A critical look at whether "Freshness" can be determined. *J Aquat Food Product Technol*, 9 (3): 5-25.

**Brillantes, S.; Paknoi, S.; Totakien, A. (2002).** Histamine formation in fish sauce production. *Food Chem Toxicol*, 67 (6): 2090-2094.

**Brink, B.; Damirik, C.; Joosten, H. M. L. J.; Huis in't Veld, J. H. J. (1990).** Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int J Food Microbiol*, 11: 73-84.

**Burgess, G. H. O.; Cutting, C. L.; Lovernaja, J.; Waterman, J. J. (1979).** El pescado y las industrias derivadas de la pesca. López-Lorenzo, V.; Barrado, M. Trad. Ed. Acribia, Zaragoza.

**Burgueño, M. J.; García-Bastos, J. L.; González- Buitrago, J. M. (1995).** Las curvas ROC en la evaluación de pruebas diagnósticas. *Medicina clínica*, 104: 661-670.

**Burns, B. G.; Ke, P. J. (1985).** Liquid chromatographic determination of hypoxanthine content in fish tissue. *J Assoc Off Ana Cheml*, 68: 444-448.

**Cabanis, J. C. (1985).** L'histamine et sa toxicité. *Bulletin de l'O. I. V.*, 32: 656-657.

**Campello, F. (1985).** Approche microbiologique de l'anchoitage (Microbiological approach of the maturation of mediterranean anchovies). *Rev Trav Inst Peches Marit*, 47: 217-226.

**Carbonell, I.; Izquierdo, L.; Costell, E. (2002).** Sensory profiling of cooked sea bream (*Sparus aurata*): sensory evaluation procedures and panel training. *Food Sci Tech Int*, 8 (3): 169-177.

**Careche, M.; García, R.; Borderías, J. (2002).** Anchovy shelf-life as affected by different chilling methods during distribution. *J Food Protect*, 65: 353-361.

**Castell, C.; Geenough, M.; Rodgers, R.; Macfarland, A. (1958).** Grading fish for quality.I. Trimethylamine values of fillet cut from graded fish. *J Fish Res Bd Can*, 28: 1-25.

**Castell, C. H.; Bishop, D. M.; Neal, W. (1968).** Production of trimethylamine in frozen cod muscle. *J Fish Res Bd Canada*, 25 (5): 921-933.

**Castell, C. H.; Neal, W.; Dale, J. (1973).** Comparison of changes in trimethylamine, dimethylamine and extractable protein in iced and frozen gadoit fillets. *J Fish Res Bd Canada*, 30 (8): 1246-1248.

**CEE/103/76 (1976).** Reglamento 103. Normas comunes de comercialización de productos de la pesca. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L30:29.

**CEE/493/91 (1991).** Directiva 493. Normativa para la producción y comercialización de productos de la pesca. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L286:15-34.

**CEE/149/95 (1995).** Directiva 149. Determinación de la concentración de bases nitrogenadas volátiles (NBVT) en pescados y productos de la pesca. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L97:84-87.

**CEE/2406/96 (1996).** Reglamento 2406. Fijación de normas comunes de comercialización para productos de la pesca. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L334:1229.

**Centro de Inspección y Comercio Exterior (1986).** Bases volátiles totales: método de Lücke y Geidel, modificado por Antonacopoulos. *Cursillo de Inspección de Pescado*. Vigo, pp. 37-38.

**Civera, T.; Turi, R. M.; Bisio, C.; Paris, E.; Fazio, G. (1993).** Sensory and chemical assessment of marine teleosts. *Sci. Aliments*, 13: 109-117.

**Civera, T.; Turi, R. M.; Paris, E.; Fazio, G. (1995).** Further investigations on total volatile basic nitrogen and trimethylamine in some Mediterranean teleosts during cold storage. *Sci. Aliments*, 15 (2): 179-186.

**Clifford, M. N.; Walker, R. (1992).** The aetiology of scombrototoxicosis. *Int J Food Sci Technol*, 27: 721-724.

**Connell, J. J.; Shewan, J. M. (1980).** Advances in fish science and technology. Ed. Fishing News (Books), Ltd., Suney, England pp 51.

**Connell, J. J. (1995).** Control of fish quality. Ed. Fishing New. Ltd, Surrey, Reino Unido, pp. 235.

**Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos (2005).** Catálogo de especialidades farmacéuticas, España.

**Conway, J. J.; Byrne, A. (1933).** An absorption apparatus for the microdetermination of certain volatile substances.1. The microdetermination of ammonia. *Biochem J*, 27: 419-429.

**Conway, W. J. (1962).** Microdiffusion analysis and volumetric error. Crosby Lockwood, London.

**Cundell, D.; Devalia, J.; Wilks, M.; Tabaqchai, S.; Davies, R. (1991).** Histidine-decarboxylases from bacteria that colonise the human respiratory tract. *J Med Microbiol*, 35: 363-366.

**Chang, O.; Cheuk, W. L.; Nickelson, R.; Martin, R.; Finne, G. (1983).** Indole in shrimp: effect of fresh storage temperature freezing and boiling. *J Food Sci*, 48: 813-816.

**Cheftel H. (1965).** The processing of the anchovy. *In*: Borgstrom G. ed. Fish as food (vol III). Academic Press, New York, pp. 219-225.

**Chen, C. M.; Wei, C. I.; Koburger, W. S.; Otwell, W. S.; Marshall, M. R. (1989).** Comparison of four agar media for detection of histamine producing bacteria in tuna. *J Food Protect*, 52: 808-813.

**Chytiri, S.; Paleologos, E.; Savvaidis, I.; Kontominas, M. G. (2004).** Relation of Biogenic amines with Microbial and Sensory changes of whole and filleted Freshwater rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) stored on ice. *J Food Protect*, 67 (5): 960-965.

**Dalgaard, P.; Gram, L.; Huss, H. H. (1993).** Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified. *Int J Food Microbiol*, 19: 283-294.

**Dalgaard, P. (1995).** Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *Int J Food Microbiol*, 26: 319-333.

**Dalgaard, P.; Mejlholm, O.; Christiansen, T. J.; Huss, H. H. (1997).** Importance of *Photobacterium phosphoreum* in relation to spoilage of modified atmosphere-packed fish products. *Letters in applied Microbiology*, 24: 373-378.

**Dapkevicius, M. L. N. E., Nout, M. J. R., Rombouts, F. M., Houben, J. H., Wymenga, W. (2000).** Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *Int J Food Microbiol*, 57: 107-114.

**Dierick, N.; Vanderkerckhove, P.; Demeyer, D. (1974).** Changes in nonprotein nitrogen compounds during dry sausage ripening. *J Food Sci*, 39: 301-304.

**Doménech-Massons, J. M. (2000).** Medida de cambio: Análisis de diseños con medidas intrasujeto, pp 82. Ed. Signo, S. A., Barcelona, España.

**Du, W. X., Lin, C. M., Phu, A. T., Cornell, J. A., Marshall, M. R., Wei, C. I. (2002).** Development of biogenic amines in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*): Effect of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. *J Food Sci*, 67 (1): 292-301.

**Dyer, W. J. (1945).** Amines in fish muscle I. Colorimetric determination of trimethylamine as the picrate salt. *J Fish Res Bd Can*, 6: 351-358.

**Dyer, W. J. (1959).** Report on trimethylamine in fish. *J AOAC Int*, 42 (2): 292-294.

**Ehira, S.; Uchiyama, H. (1986).** Determination of fish. Kramer, D. E.; Liston, J. (ed.). Seafoods quality determination. Proceedings of an international

symposium coordinated by the University of Alaska. Anchorage, Alaska, USA. Elsevier Publishers, Amsterdam, pp. 185-207.

**Ellis, P.; Pivarnik, L. F.; Thiam, M. (2000).** Determination of volatile bases in seafood using the ammonia ion selective electrode: collaborative study. *J AOAC Int.*, 83 (4): 933-943.

**FAO (1969).** The FAO Technology Congress on Fish Inspection and Quality Control. Halifax, Canadá. *FAO fisheries Reports*, 8: 15-25.

**FDA (1995).** Decomposition and histamine-raw, frozen tuna and mahi-mahi, canned tuna and related species, revised compliance policy guide, availability. *Federal Register*, 149: 39754-39756.

**Fernández-Salguero, J.; Mackie, I. (1987a).** 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. *J Food Sci Tech*, 22: 385-390.

**Fernández-Salguero, J., Mackie, I. M. (1987b).** Preliminary survey of the contents of histamine and other higher amines in some samples of Spanish canned fish. *Int J Food Sci and Tech*, 22: 409-412.

**Fuselli, S. R.; Casales, M. R.; Fritz, R.; Yeannes, M. I. (1994).** Microbiology of the marination process used in anchovy (*Engraulis anchoita*) production. *Lebensm Wiss U Technol*, 27: 214-218.

**Gale, E. (1946).** The bacterial amino acid decarboxylases. *Adv Enzymol*, 6: 1-32

**Gallardo, J. M.; López-Benito, M.; Pastoriza, L.; González, P. (1979).** Determinación de bases volátiles en productos pesqueros. *Inf Tecn Inst Inv Pesq*, 65: 1-17.

**Gallardo, J. M.; Pérez-Martín, R.; Franco, J. M.; Aubourg, S. (1984).** Chemical composition and evolution of nitrogen compounds during the processing and storage of canned albacore (*Thunnus albacora*). *Proc M. O. C. C. A.*, 1: 51-58.

**Gardner, D. M.; Shulman, K. I.; Walker, S. E.; Taylor, S. A. N. (1996).** The making of a user friendly MAOI diet. *J Clin Psychiatry*, 57: 99-104.

**Gill, T. A., Thompson, J. W. (1984).** Rapid, automated analysis of amines in seafood by ion moderated partition HPLC. *J Food Sci*, 49 (2): 603-606.

- Gökoglu, N. (2003).** Changes in biogenic amines during maturation of sardine *Sardina pilchardus* marinade. *Fisheries Science*, 69: 823-829.
- Gökoglu, N.; Cengiz, E.; Yerlikaya, P. (2004).** Determination of the shelf life of marinated sardine (*Sardina pilchardus*) stored at 4 °C. *Food Control*, 15: 1-4.
- González, I.; Martín, R.; García, T.; Morales, P.; Sanz, B.; Hernández, P. E. (1994a).** Técnicas rápidas para la detección de microorganismos en alimentos I. Técnicas fisicoquímicas. *Alimentación, equipos y tecnología XIII*, 4: 97-101.
- González, I.; Martín, R.; García, T.; Morales, P.; Sanz, B.; Hernández, P. E. (1994b).** Técnicas rápidas para la detección de microorganismos en alimentos II. Técnicas inmunológicas y genéticas. *Alimentación, equipos y tecnología XIII*, 5: 79-83.
- 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. *Int J Food Microbiol*, 10: 303-316.
- Gram, L.; Wedell-Neergaard, C.; Huss, H. H. (1990).** The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). *Int J Food Microbiol*, 4: 65-72.
- Haaland, H.; Njaa, L. R. (1988).** Ammonia (NH<sub>3</sub>) and Total Volatile Nitrogen (TVN) in preserved and unpreserved stored, whole fish. *J Sci Food Agric*, 44: 335-342.
- Halász, A., Baráth, A., Simon-Sarkadi, L., Holzappel, W. (1994).** Biogenic amine and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci Tech*, 5: 42-49.
- Hall, M., Sykes, P., Fairclough, D., Lucchese, L.; Rogers, P.; Staruszkiewicz, W.; Bateman, R. (1999).** A test strip for diamines in tuna. *J AOAC Int*, 82 (5): 1102-1108.
- Hernández-Herrero, M., Roig-Sagués, A. X., Rodríguez-Jerez, J. J., Mora-Ventura, M. T. (1999a).** Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *J Food Sci*, 62 (5): 509-514.
- Hernández-Herrero, M. M.; Roig-Sagués, A. X.; López-Sabater, E. I.; Rodríguez-Jerez, J. J.; Mora-Ventura, M. T. (1999b).** Total volatile basic

nitrogen and other physico-chemical and microbiological characteristics as related to ripening of salted anchovies. *J Food Sci*, 64 (2): 344-347.

**Hernández-Herrero, M. M.; Roig-Sagués, A. X.; López-Sabater, E. I.; Rodríguez-Jerez, J. J.; Mora-Ventura, M. T. (1999c).** Protein hydrolysis and proteinase activity during the ripening of salted anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) A microassay method for determining the protein hydrolysis. *J Agric Food Chem*, 47: 3319-3324.

**Hernández-Herrero, M. M.; Roig-Sagués, A. X.; López-Sabater, E. I.; Rodríguez-Jerez, J. J.; Mora-Ventura, M. T. (2002).** Influence of raw fish quality on some physicochemical and microbiological characteristics as related to ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus* L.). *J Food Sci*, 67 (7): 2631-2640.

**Hollingworth, T. A.; Wekell, M. M.; Sullivan, J. J.; Torkelson, J. D.; Throm, H. R. (1990).** Chemical indicators of decomposition for raw surimi and flaked artificial crab. *J Food Sci*, 55: 349-352.

**Hollingworth, T. A.; Hungerford, J. M.; Barnett, J. D.; Wekell, M. M. (1994).** Total volatile acids: Temperature dependent decomposition indicator in halibut determined by flow injection analysis. *J Food Protect*, 57 (6): 505-508.

**Horner W. (2000).** Final quarterly report from European project CT.97.3253. Institute of Food Health Quality, 16 pp.

**Horwitz W. (1982).** Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. *Anal Chem*, 54: 67-76.

**Hui, J. Y.; Taylor, S. L. (1983).** High pressure liquid chromatographic determination of putrefactive amines in foods. *J Asso. Off Anal Chem*, 66 (4): 853-857.

**Huidobro, A.; Tejada, M. (1990).** Determinación analítica de los compuestos nitrogenados no proteicos en el músculo de pescado. Aplicación al control de calidad. *Rev Agroquím Tecnol Aliment*, 30: 293-302.

**Huidobro, A.; Pastor, A.; Tejada, M. (2000).** Quality index method developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *J Food Sci*, 65 (7): 1202-1205.

**Huidobro, A.; Pastor, A.; López-Caballero, M. E.; Tejada, M. (2001).** Washing effect on the quality index method (QIM) developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Eur Food Res Technol*, 212: 408-412.

**Hurtado, J. L.; Montero, P.; Borderías, A. J. (2000).** Extension of shelf life of chilled hake (*Merluccius merluccius*) by high pressure. *Food Sci Tech Int*, 6(3): 243-249.

**Huss, H. H.; Larsen, A. (1979).** The post-mortem changes in the oxidation-reduction potential of fish muscle and internal organs. In: Food as an ecological environment for pathogenic and index-organisms. Sobolenska-Ceronik, K.; Ceronik, E.; Zaleski, S. eds. 348, Ars Polonia, Polonia, pp. 265-279.

**Huss, H. H. (1995).** Quality and quality changes in fresh fish. In Huss, H. H. (Ed.) FAO Fisheries Technical Paper 348, Rome, pp. 195.

**Jonsdottir, S. (1992).** Kvalitetsnomer pa sild, Slutrapport. In: Nordic Industrial Fund, Quality Standards for Fish: Final Report Phase II, pp 36-59.

**Joosten, H. J., Northon, M. D. (1987).** Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese: I. Decarboxylative properties of some non-starter bacteria. *Neth Milk Dairy J*, 41: 259-280.

**Jørgensen, L. V.; Dalgaard, P.; Huss, H. H. (2000).** Multiple compound quality index for cold-smoked salmon (*Salmo salar*) developed by multivariate regression of biogenic amine and pH. *J Agric Food Chem* 48 (6): 2448-2453.

**Karaçam, H.; Kutlu, S.; Köse, S. (2002).** Effect of salt concentrations and temperature on the quality and shelf-life of brined anchovies. *Int J Food Sci and Tech*, 37: 19-28.

**Karnop, G (1988).** Histamine in saltsardellen. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 38: 57-84.

**Kim, S. H.; Price, R. J. (1999).** Histamine formation and bacterial spoilage of Albacore Harvested off the U. S. Northwest coast. *J Food Sci*, 64: 340-343.

**Kim, S. H.; Price, R. J.; Morrissey, M. T.; Field, K. G.; Wei; C. I.; An, H. (2001).** Occurrence of histamine-forming bacteria in albacore and histamine accumulation in muscle at ambient temperature. *J Food Sci*, 67 (4): 1515-1521.

**Kim, S. H.; Field, K. G.; Chang, D. K.; Wei; C. I.; An, H. (2001).** Identification of bacterial crucial to histamine accumulation in Pacific Mackerel during storage. *J Food Protect*, 64: 1556-1564.

**Kirschbaum, J.; Meier, A.; Brückner, H. (1999).** Determination of biogenic amines in fermented beverages and vinegars by pre-column derivatization with

para-nitrobenzyloxycarbonyl chloride (PNZ-Cl) and reversed-phase LC. *Chromatographia*, 49 (3/4): 117-124.

**Koutsoumanis, K.; Lampropoulou, K.; Nychas, G. J. E. (1999a).** Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) stored aerobically at 0, 8 and 15°C. *J Food Protect*, 62 (4): 398-402.

**Koutsoumanis, K.; Nychas, G. J. E. (1999b).** Chemical and sensory changes associated with microbial flora of Mediterranean boque (*Merluccius merluccius hubbsi*) stored aerobically at 0, 3, 7 and 10 degree C. *Appl Environ Microbiol*, 65 (2): 698-706.

**Krizek, M., Pavlíček, T.; Vácha F. (2002).** Formation of selected biogenic amines in carp meat. *J Sci Food Agric*, 82: 1088-1093.

**Krzymien, M. E., Elias, L. (1990).** Feasibility study on the determination of fish freshness by trimethylamine headspece analysis. *J Food Sci*, 55: 1228-1232.

**Lakshmanan, R., Jeya Shhakila, R., Jeyasekaran, G. (2002a).** Changes in the halophilic amine forming bacterial flora during salt-drying of sardines (*Sardinella gibbosa*). *Food Res Int*, 35: 541-546.

**Lakshmanan, R., Jeya Shhakila, R., Jeyasekaran, G. (2002b).** Survival of amine-forming bacteria during the ice storage of fish and shrimp. *Food Microbiology*, 19: 617-625.

**Larsen, E.; Heldbo, J.; Jespersen, C. M.; Nielsen, J. (1992).** Development of a method for quality assessment of fish for human consumption based on sensory evaluation. *Quality asurance in the Fish Industry*: 351-358.

**Lehane, L.; Olley, J. (2000).** Histamine fish poisoning revisited. Review. *Int J Food Microbiol*, 58: 1-37.

**Leira, R.; Rodríguez, R. (1996).** Dieta y Migraña. *Rev Neurol*, 24(129): 534-538.

**León, A.; Chica, A.; Chih-Ming, C.; Centrich, F. (1994).** Determination of trimethylamine in fish by flow injection analysis. *Quim Anal*, 13: 78-81.

**Leuschner, R. G. K.; Hammes, W. P. (1998).** Tyramine degradation by micrococci during ripening of fermented sausage. *Meat Sci*, 49: 289-296.

**Lippman, S.; Nash, K. (1990).** Monoamine oxidase inhibitor update. Potencial adverse food and drug interactions. *Drug Safety*, 5 (3): 195-204.

**López-Sabater, E. I., Rodríguez-Jerez, J. J., Roig-Sagués, A. X., Mora-Ventura, M. T. (1994).** Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning: Effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. *J Food Prot*, 57: 318-323.

**López-Sabater, E. I.; Rodríguez-Jerez, J. J.; Hernández-Herrero, M. M.; Roig-Sagués, A. X.; Mora-Ventura, M. T. (1996).** Sensory quality and histamine formation during controlled decomposition of tuna (*Thunnus thynnus*). *J Food Protect*, 59 (2): 167-174.

**Lougovois, V. P.; Kyranas, E. R.; Kyrana, V. R. (2003).** Comparison of selected methods of assessing freshness quality and remaining storage life of iced gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Res Int*, 36: 551-560.

**Ludorf, W.; Meyer, V. (1978).** El pescado y los productos de la pesca. Esaín-Escobar, J. Trad. Ed Acribía, Zaragoza, 2ª edn., pp. 282-289.

**Lundstrom, R. C.; Racicot, L. D. (1983).** Gas chromatographic determination of dimethylamine and trimethylamine in seafoods. *J Assoc Off Anal Chem*, 66: 1158-1163.

**Luong, J.; Male, K.; Masson, C.; Nguyen, A. (1992).** Hypoxanthine ratio determination in fish extract using capillary electrophoresis and immobilized enzymes. *J Food Sci*, 57: 77-81.

**Lüthy, J.; Schlatter, C. (1983).** Biogene Amine in Lebensmitteln: zur Wirkung von Histamin, Tyramin und Phenylethylamin auf den Menschen. *Z Lebensm Unters Forsch*, 177: 439-443.

**Mackie, I. M.; Thomson, B. W. (1974).** Decomposition of trimethylamine oxide during iced and frozen storage of whole and comminuted tissue of fish. *Proc IV Int Congress Food Sci Technol*, 1: 243-250.

**Mackie, I. M.; Pirie, L.; Ritchie, A. H.; Yamanaka, H. (1997).** The formation of non-volatile amines in relation to concentrations of free basic amino acids during postmortem storage of the muscle of scallop (*Pecten maximus*), herring (*Clupea harengus*) and mackerel (*Scomber scombrus*). *Food Chem*, 60 (3): 291-295.

**Mah, H.-J.; Han, H.-K.; Oh, Y.-J.; Kim, M.-G.; Hwang, H.-J. (2002).** Biogenic amines in Jeotkals, Korean salted and fermented fish products. *Food Chem*, 79: 239-243.

**Madrid-Vicente, A. (1994).** Métodos oficiales de análisis de los alimentos y bebidas. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

**Madrid, A.; Vicente, J. M.; Madrid, R. (1999).** El pescado y sus productos derivados. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

**Maijala, R. (1994).** Formation of biogenic amines in dry sausages with special referente to raw materials, lactic acid bacteria, pH decrease, temperatura and time. Tesis Doctoral. Department of Food and Environmental Hygiene. College of Veterinary Medicine. Helsinki, Finland.

**Malle, P.; Tao, S. (1987).** Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation. *J Food Protect*, 50 (9): 756-760.

**Malle, P.; Poumeyrol, M. (1989).** A new chemical criterion for the quality control of fish: trimethylamine / total volatile basic nitrogen (%). *J Food Protect*, 52: 419-423.

**Malle, P.; Valle, M. (1996).** Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *J AOAC Int*, 79 (1): 43-49.

**Mariné, A.; Codony, R.; Godia, O.; Montoro, B.; Vidal, M. (1986).** Manual de interacciones alimentos medicamentos. Ed. Colegio Oficial de Farmacéuticos de Barcelona.

**Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, M. C.; Izquierdo-Pulido, M.; Veciana-Nogués, M. T.; Hernández-Jover, T. (1995a).** Les amines biogenes dans les aliments: Leur signification, leur analyse. *Ann Fals Exp Chim*, 88 (931): 119-140.

**Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, M. C.; Izquierdo-Pulido, M.; Veciana-Nogués, M. T. (1995b).** Aminas biógenas en alimentos: unos microcomponentes de interés múltiple. *Rev Esp Nutr Comunitaria*, 1 (4): 138-141.

**McCabe, B. (1986).** Dietary tyramine and other pressor amines in MAOI regimes: a review. *J Am Diet Assoc*, 86(6): 1059-1064.

**Mendes, R.; Gonçalves, A.; Nunes, M. L. (1999).** Changes in free amino acids and biogenic amines during ripening o fresh and frozen sardine. *J Food Biochemistry*, 23: 295-306.

**Meyer, V. (1965).** Marinades. *In:* G. Borgstrom ed. Fish as Food (Vol. 3, Part 1). New York: Academic Press, pp. 165 – 191.

**Meyer, C.; Oelenschlaeger, J. (1996).** Sensory assessment, microbiology and chemical indices on ice stored whiting. *Informationen fuer die Fishwirtschaft*, 43 (2): 89-94.

**Middlebrooks, B. L.; Toom, P. M.; Douglas, W. L.; Harrison, R. E.; McDowell, S. (1988).** Effects of storage time and temperature on the microflora and amine development in Spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*). *J Food Sci*, 53 (4): 1024-1029.

**Mietz, J. L.; Karmas, E. (1977).** Chemical quality index of canned tuna as determined by HPLC. *J Food Sci*, 42: 155-158.

**Mietz, J. L.; Karmas, E. (1978).** Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster and shrimp as an indicator of decomposition. *J AOAC Int*, 61: 139-145.

**Monteagudo-Torres, S.; de la Montaña-Miguel, J.; Miguez-Bernárdez, M. (2002).** Comparación de métodos organolépticos y físico-químicos al evaluar la calidad y vida comercial de pescado magro (*Trisopterus luscus*) y graso (*Trachurus trachurus*) comercializado en Pontevedra. *Alimentaria*, 334: 73-79.

**Morales, P.; Haza, A. I.; Ikken, Y.; Martínez, A.; Sanz, B.; Hernández, P. E. (1996).** Freshness and quality of fish: inspection and evaluation. II Evaluation methods. *Alimentación, equipos y tecnología*, 15 (2): 139-147.

**Morrison, A. M.; Coughlin, K.; Shine, J. P.; Coull, B. A.; Rex, A. C. (2003).** Receiver Operating Characteristic curve analysis of beach water quality indicator variables. *Appl Environ Microbiol*, 69 (11): 6405-6411.

**Morrow, J. D.; Margolies, G. R.; Rowland, J.; Roberts, L. J. (1991).** Evidence that histamine is the causative toxin of scombroid-fish poisoning. *New Eng L Med*, 324: 716-720.

**MSC, Ministerio de Sanidad y Consumo (1991).** Real Decreto 1521/1991. Orden del 2 de agosto de 1991 por la que se aprueban las normas microbiológicas, los límites de contenido en metales pesados y los métodos analíticos para la determinación de metales pesados para los productos de la pesca y de la acuicultura, *Boletín Oficial del Estado*, 195: 27513-27515.

**MSC, Ministerio de Sanidad y Consumo (1992).** Real Decreto 1437/1992. Normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de los productos pesqueros y de la acuicultura. Anexo Capítulo V: Controles sanitarios e inspección de las condiciones de producción. *Boletín Oficial del Estado*, 11: 808-820.

**MSC, Ministerio de Salud y Consumo (2000).** La alimentación en España en 1999. Ed. Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación, Madrid, España, pp. 568.

**Murray, C. K.; Hobbs, G.; Gilbert, R. J. (1982).** Scombrototoxin – like poisoning from canned fish. *J Hyg Camb*, 88: 215-220.

**Nielsen, J.; Hansen, T. K.; Jonsdóttir, S.; Larson, E. P. (1992).** Development of methods for quality index of fresh fish. FAR Meeting, Noordwijkerhort, Netherlands.

**Nontradip, A.; Wada, S.; Yamanaka, I. (1991).** Changes in polyamines and amino acids in ascidian *Halocynthia roretzi* muscle during storage. *Nippon Suisa Gakkaishi*, 58: 315-322.

**Novella-Rodríguez, S.; Veciana-Nogués, M. T.; Roig-Sagués, A. X.; Trujillo-Mesa, A. J.; Vidal-Carou, M. C. (2002).** Influence of starter and nonstarter on the formation of biogenic amines in Goat cheese during ripening. *J Dairy Sci*, 85: 2471-2478.

**Novella-Rodríguez, S.; Veciana-Nogués, M. T.; Roig-Sagués, A. X.; Trujillo-Mesa, TA. J.; Vidal-Carou, M. C. (2003).** Comparison of biogenic amine profile in cheeses manufactured from fresh and stored (4 °C, 48 hours) raw goat's milk. *J Food Prot*, 67 (1): 110-116.

**Okozumi, M.; Fukumoto, I.; Fujii, T. (1990).** Changes in bacterial flora and polyamine contents during storage of horse mackerel meat. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56: 1307-1312.

**Ólafsdóttir, G.; Martinsdóttir, E.; Oehlenschläger, J.; Dalgaard, P.; Jensen, B.; Undeland, I.; Mackie, I. M.; Henehan, G.; Nielsen, J.; Nilsen, H. (1997).** Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends Food Sci Tech*, 8: 258-265.

**Ólafsdóttir, G.; Nesvadba, P.; Di Natale, C.; Careche, M.; Oehlenschläger, J.; Tryggvadóttir, S.; Schubring, R.; Kroeger, M.; Heia, K.; Esaiassen, M.;**

**Macagnano, A.; Jørgensen, Bo M. (2004).** Multisensor for fish quality determination. *Trends Food Sci Tech*, 15: 86-93.

**Osman, K. M.; Abd-El-Ghani, M.; Gad-El-Said, W. A.; Off, F. (1980).** Gut microflora of some commercially common fishes in Egypt. *Veterinary Medical J*, 28: 109-119.

**Pacheco-Aguilar, R.; Lugo-Sánchez, M. E.; Robles-Burgueño, M. R. (2000).** Postmortem biochemical and functional characteristic of monterey sardine muscle stored at 0° C. *J Food Sci*, 65 (1): 40-47.

**Paleologos, E. K.; Savvaidis, I. N.; Kontominas, M. G. (2004).** Biogenic amines formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Microbiol*, 21: 549-557.

**Pan, B.; James, D. (1985).** Histamine in marine products: production by bacteria, measurement and prediction of formation. *FAO Fish Tech Paper*, 252: 1-62.

**Pascual-Anderson, M. R. (2000).** Microbiología alimentaria. Metodología para alimentos y bebidas, pp 441. Ed. Díaz de Santos, S. A., 2ª edición. Madrid.

**Pastoriza, L.; Sampedro, G.; Herrera, J. J.; Cabo, M. (1996).** Effect of modified atmospheres packaging on shelf-life of iced fresh hake slices. *J Sci Food Agr*, 17: 541-547.

**Pastoriza, L.; Sampedro, G.; Herrera, J. J.; Cabo, M. (1998).** Influence of sodium chloride and modified atmosphere packaging on microbiological, chemical and sensory properties in ice storage of sliced of hake (*Merluccius merluccius*). *Food Chem*, 61: 23-28.

**Pechanek, U.; Pfannhauser, W.; Woidich, H. (1983).** Histamingehalte von fischen im lichte gesezlicher und empfohlener grenzwerte. *Ernährung/Nutrition*, 7: 683-687.

**Pedrosa-Menabrito, A.; Regenstein, J. M. (1988).** Shelf-life extension of fresh fish-a review. Part I- Spoilage of fish. *J Food Quality*, 11: 117-127.

**Pérez-Villareal, B.; Howgate, P. (1987).** Spoilage of European hake (*Merluccius merluccius*) in ice. *J Sci Food Agr*, 41: 335-350.

**Pérez-Villareal, B.; Pozo, R. (1992).** Ripening of the salted anchovy (*Engraulis anchoita*): study of the sensory, biochemical and microbiological aspects. Huss

H. H.: Jakobsen, M.; Liston, J. eds. Quality assurance in the fish industry. Elsevier science publishers B. V., Amsterdam, pp. 157-167.

**Piggott, J. R. (1995).** Designs questions in sensory and consumer science. *Food Qual Pref*, 6: 217-120.

**Poligne, I.; Collignan, A. (2000).** Quick marination of anchovies (*Engraulis encrasicolus*) using acetic and gluconic acids. Quality and stability of the end product. *Lebensm Wiss u Technol*, 33: 202-209.

**Pollack, F. F; Koldovsky, O.; Nishiota, K. (1992).** Polyamines in human and rat milk and infant formulas. *SM J Clin Nutr*, 56: 371-375.

**Raguenes, N. (1994).** Aminas biógenas. *In*: Bourgeois, C. M.; Mescle, J. F.; Zucca, J. (Ed.). Microbiología alimentaria 1. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria. Ed Acribia. Zaragoza, pp 140-153.

**Ranken, M. D. (1993).** Manual de industrias de los alimentos. Ed. Acribis, S. A., España.

**Regenstein, J. M.; Regenstein. C. E. (1991).** Introduction to fish technology, pp. 269. Published by Van Nostrand Reinhold. New York.

**Rey-Mansilla, M.; Sotelo. C. G.; Gallardo, J. M. (1999).** Decomposition of trimethylamine oxide during iced storage of blue whiting (*Micromesistius poutassou*). *Z lebensm Unters Forsch*, 208: 267-269.

**Rice, S.; Eitenmiller, R. R.; Koehler, P. E. (1976).** Biologically active amines in food: a review. *J Milk Food Technol*, 39 (5): 353-358.

**Ringø, E.; Stenberg, E.; Strøm, A. R. (1984).** Amino acid and lactate catabolism in trimethylamine oxide respiration of *Alteromonas putrefaciens* NCMB 1735. *Appl Environ Microbiol*, 47: 1084-1089.

**Rodríguez, C. J.; Besteiro, I.; Pascual, C. (1999).** Biochemical changes in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chilled storage. *J Sci Food Agric*, 79: 1473-1480.

**Rodríguez, C.; Masoud, T.; Huerta, M. D. (1997a).** Variaciones cuali y cuantitativas de los parámetros utilizados para evaluar la calidad del pescado, cuando este se somete a procesos térmicos. *Alimentaria*, 288: 121-123.

**Rodríguez, C.; Masoud, T.; Huerta, M. D. (1997b).** Estudio de los principales productos de degradación de la trimetilaminaóxido en cuatro especies de pescado sometidas a refrigeración. *Alimentaria*, 288: 131-135.

**Rodríguez-Jerez, J. J.; López-Sabater, E. I.; Roig-Sagués, A. X.; Mora-Ventura, M. T. (1993).** Evolution of histidine decarboxylase bacterial groups during the ripening of Spanish semipreserved anchovies. *J Vet Med B*, 40: 533-543.

**Rodríguez-Jerez, J. J.; López-Sabater, E. I.; Hernández-Herrero, M. M.; Mora-Ventura, M. T. (1994a).** Histamine, putrescine and cadaverine formation in Spanish semipreserved anchovies as affected by time/temperature. *J Food Sci*, 59 (5): 993-997.

**Rodríguez-Jerez, J. J.; López-Sabater, E. I.; Roig-Sagués, A. X.; Mora-Ventura, M. T. (1994b).** Histamine, cadaverine and putrescine forming bacteria from ripened Spanish semipreserved anchovies. *J Food Sci*, 59 (5): 998-1001.

**Rossi, S.; Lee, C.; Ellis, P. C.; Pivarnik, L. F. (2002).** Biogenic amines formation in bigeye tuna steaks and whole skipjack tuna. *J Food Sci*, 67 (6): 2056-2060.

**Ruíz-Capillas, C.; Gyllion, C., Horner, W. (2000).** Determination of volatile basic nitrogen and trimethylamine nitrogen in fish sauce by flow injection analysis. *Eur Food Res Technol*, 210 (6): 434-436.

**Ruíz-Capillas, C.; Moral, A. (2001).** Correlation between chemical and sensory quality indices in hake stored in ice. *Food Res Int*, 34: 441-447.

**Ruzicka, J.; Hansen, E. H. (1975).** Flow injection analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Anal Chem Acta*, 78: 145-147.

**Ryder, J.; Fletcher, G.; Stec, M.; Seelye, R. (1993).** Sensory, microbiological and chemical changes in hoki stored in ice. *Int J Food Sci Tech*, 28: 169-180.

**Sadok, S.; Uglow, R. F.; Haswell S. J. (1996).** Determination of trimethylamine oxide in seawater and small volumes of seafood tissue extract using flow injection analysis. *Anal. Chem. Acta*, 334: 279-285.

**Sadok, S.; Uglow, R. F.; Haswell S. J. (1996).** Determination of trimethylamine in fish by flow injection analysis. *Anal Chem Acta*, 321: 69-74.

**Saito, T.; Arai, K.; Matsuyoshi M. (1959).** A new method for estimating the freshness of fish. *Bull Japan Soc Sci Fish*, 24: 749-750.

**Sancho, J.; Bota, E.; de Castro, J. J. (1999).** Introducción al análisis sensorial de los alimentos. Ediciones Universidad de Barcelona, Barcelona, 336 pp.

**Sauvageot, F. (1993).** La fatigue au cours de séances d'évaluations sensorielles non hédoniques de produits alimentaires: une réalité? *Ann Fals Exp Chim*, 86 (920): 253-268.

**Sawyer, F. M.; Cardello, A. V.; Prell, P. A. (1988).** Consumer evaluation of the sensory properties of fish. *J Food Sci*, 53 (1): 12-18.

**Sayem el Daher, N.; Simard, R. E. (1985).** Putrefactive amine changes in relation to microbial counts of ground beef during storage. *J Food Protect*, 48 (1): 54-58.

**Scanlan, R. (1975).** N-Nitrosamines in foods. *Crit Rev Food Tech*, 5 (4): 357-402.

**Scanlan, R. (1995).** Volatile nitrosamines in foods – an update. En Charalambous, G. (ed.). Food flavors: generation, analysis and process influence. Elsevier Science B. V., pp: 685-704.

**Schulze, K.; Zimmermann, Th. (1982).** Untersuchungen zum einfluß verschiedener lagerungsbedingungen auf die entwicklung biogener amine in thunfisch und mackerekenfleisch. *Fleischwirtschaft*, 62: 1-5.

**Senayake, N.; Vryavanathan, S.; Kanagesuriyam, S. (1978).** Cerebrovascular accident after "skipjack" reaction in a patient taking isoniazid. *British Medical J*, 2: 1127-1128.

**Shakila, R. J., Vijayalakshmi, K.; Jeyasekaran, G. (2003).** Changes in histamine and volatile amines in six commercially important species of fish of the Thoothukkudi coast of Tamil Nadu, India stored at ambient temperature. *Food Chemistry*, 82: 347-352.

**Shewan, J. M.; Mackintosh, R. G.; Tucker, C. G.; Ehrenberg, A. S. C. (1953).** The development of a numerical scoring system for the sensory assessment of the spoilage of wet white fish stored in ice. *J Sci Food Agric*, 6: 183-189.

**Shewan, J. M. (1961).** The microbiology of sea-water. Capítulo 14, en: *Fish and Food*. Ed. Academic Press, New York, pp. 487-561.

**Shewan, J. M. (1977).** The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. In: *Proceedings of the*

*Conference on handling, processing and marketing of tropical fish*, Tropical Products Institute, London, pp. 51-66.

**Schulze, K.; Zimmermann, Th. (1982).** Untersuchungen zum einfluß verschiedener lagerungsbedingungen auf die entwicklung biogener amine in thunfisch- und mackerelenfleisch. *Fleischwirtschaft*, 62: 1-5.

**Sikorski, Z. E.; Kolakowska, A.; Burt, J. R. (1990).** Postharvest biochemical and microbial changes. *In: Seafood: Resources, nutritional composition and preservation*. Sikorski Z. E. (Ed.). CRC Press. Inc. Boca Raton, FL, pp. 256.

**Silla-Santos, M. H. S. (1996).** Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol*, 29: 213-231.

**Smith, T. (1980).** Amines in food. *Food Chem*, 6: 169-200.

**Smith, T. (1993).** Amines. *Meth Plant Biochem*, 8(2): 17-49.

**Soares V. F. M.; Glória, M. B. A. (1994).** Histamine levels in canned fish available in the retail market of Belo Horizonte, MG, Brazil. *J Food Compos Anal*, 7: 1023-109.

**Soudan, F. (1965).** La conservation par le froid des poissons, crustacés et mollusques. París, J. Baillière et Fils, pp. 43-45.

**Spinelli, J. (1966).** *J Food Sci*, 30: 1063, en Fletcher y col. (1990).

**Staruszkiewicz, W. F. (1992).** The development of rapid methods to detect the precursors involved in scombroid intoxications. *IFT Annual Meeting*, New Orleans, USA.

**Stede, M.; Stockemer, J. (1986).** Biogenic amines in marine fish (Biogene amines in seefischen). *Lebensm –Wiss u Technol*, 19: 283-287.

**Stenberg, E.; Ringo, E.; Strom, A. R. (1984).** Trimethylamine oxide respiration of *Alteromonas putefaciens* NCMB 1735: Na<sup>+</sup>-stimulated anaerobic transport in cells and membranes vesicles. *App Environ Microbiol*, 47: 1090-1095.

**Stockey, C. (1996).** Histamine: the culprit for headaches? *Wine Industry Journal*, 11 (1): 42-44.

**Stratton, J.; Hutkins, R.; Taylor, S. L. (1991).** Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *J Food Protect*, 54 (6): 460-470.

- Stratton, J. E.; Taylor, S. L. (1991).** Scombroid poisoning. In: Kvenberg J. E. (Ed.), *Microbiology of marine food products*. 2<sup>nd</sup> ed, New York: AVI, pp. 331-351.
- Straub, B. W., Kicherer, M., Schilcher, S. M., Hammes, W. P. (1995).** The formation of biogenic amine by fermentation organisms. *Zeitschrift für lebensm unters und Forschung*, 201 (1): 79-82.
- Summer, S. S.; Taylor, S. L. (1989).** Detection method for histamine-producing, dairy-related bacteria using diamine oxidase and leucocrystal violet. *J Food Protect*, 52: 105-108.
- Sveinsdottir, K.; Martinsdottir, G. H.; Jørgensen, B.; Kristbergsoon, K. (2002).** Application of Quality Index Method (QIM) scheme in shelf-life study of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Food Sci*, 67 (4): 1570-1579.
- Swets, J. A. (1988).** Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*, 240: 1285-1293.
- Taylor, S. L. (1985).** Histamine poisoning associated with fish, cheese and other food. Monografía (VPH-FOS-85.1). W. O. H., Geneve, Suiza, pp. 47.
- Taylor, S. L. (1986).** Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *CRC Critical Reviews in toxicology*, 17 (2): 91-128.
- Taylor, S. L.; Summer, S. S. (1986).** Determination of histamine, putrescine and cadaverine. Kramer, D. E.; Liston, J. Eds. *Seafood Quality Determination. Proceeding of an International Symposium*, pp.: 253-255.
- Teskeredzic, Z.; Pfeifer, K. (1987).** Determination the degree of freshness of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) cultured in brackish water. *J Food Sci*, 52: 1101-1102.
- Tokunaga, T. (1970).** Trimethylamine oxide and its decomposition in the bloody muscle of fish. 1. TMAO, TMA and DMA contents in ordinary and bloody muscles. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 36: 502-509.
- Torry advisory note (1989).** No. 91. Torry Research Station, MAFF.
- Tozawa, H.; Enokihara, K.; Amano, K. (1971).** Proposed modifications of Dyer's method for trimethylamine in cod fish. Kreuzer, R. (Ed.). *Fish inspection and quality control*. Ed. Fishing News. Ltd, London, UK, pp: 187-190.

**Unzeta, M.; Gómez, N.; Balsa, D.; Heredero, J. L. (1989).** La Monoamino Oxidasa: un enzima implicado en el metabolismo de las aminas biógenas. *El Farmacéutico*, 62: 61-67.

**Valle, M.; Malle, P. (1998).** Evaluation of fish decomposition by high chromatographic assay ATP degradation products. *J AOAC Int*, 81 (3): 571-575.

**Valls, J. E.; Bello, R. A.; Kodaira, M. S. (1999).** Validation of liquid chromatography analysis of biogenic amines in canned fish products. *J Aquat Food Prod Technol*, 8 (3): 79-91.

**Vaughan, T. (1994).** The role of food in the pathogenesis of migraine headache. *Clin Reviews Allergy*, 12: 167-180.

**Veciana-Nogués, M. T.; Vidal-Carou, M. C.; Mariné-Font, A. (1989).** Histamine and tyramine in preserved and semi-preserved fish products. *J Food Sci*, 54: 1653-1655.

**Veciana-Nogués, M. T.; Hernández-Jover, T.; Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, M. C. (1995).** Liquid chromatographic method for determination of biogenic amine in fish and fish products. *J AOAC Int*, 78 (4): 1045-1050.

**Veciana-Nogués, M. T., Albalá-Hurtado, S., Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M. C. (1996).** Changes in biogenic amines during the manufacture and storage of semipreserved anchovies. *J Food Prot*, 59 (11): 1218-1222.

**Veciana-Nogués, M. T.; Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, M. C. (1997a).** Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationship with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines and organoleptic changes. *J Agric Food Chem*, 45: 2036-2041.

**Veciana-Nogués, M. T.; Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, M. C. (1997b).** Changes in biogenic amines during the storage of Mediterranean anchovies immersed in oil. *J Agric Food Chem*, 45: 1385-1389.

**Veciana-Nogués, M. T. (1999).** Mètodes per a avaluar la frescor del peix. *Tecnologia i Ciència dels Aliments*, 4: 16-24.

**Veciana-Nogués, M. T.; Vidal-Carou, M. C. (2000).** Dieta restrictiva en histamina. En: Salas-Salvador, J.; Bonada-Santjaume, A.; Trallero-Casañes, R.; Saló-Solà, E. Eds. Editorial Doyma, S. L. Barcelona. Capítulo 46, pp. 405-408.

**Vidal-Carou, M. C.; Isla-Gavin, M. J.; Mariné-Font, A.; Codony-Salcedo, R. (1989).** Histamine and tyramine in natural sparkling wine, vermouth, cider and vinegar. *J Food Composit Anal*, 2: 210-218.

**Vidal-Carou, M. C.; Bover-Cid, S. (2001).** Aminas biógenas en vinos: formación, contenidos, significación y control ¿Problema real o sobredimensionado? *Enología avui*: 15-28.

**Vieites-Baptista de Sousa, J. M.; González-Herrero, V.; Leira-Sanmartín, F. (1995).** Análisis microbiológico de semiconservas de anchoa en salazón y en aceite fabricadas en España. *Alimentaria*, 266: 64-64.

**Vieites, J. M.; González, V.; Delgado, M. L.; Leira, F. (1996).** *Alimentaria*, 275: 121-126.

**Voigt, M. N.; Eitenmiller, R. R. (1977).** An evaluation of extraction and thin layer chromatographic procedures for the quantification of biogenic amines in food. *Lebensm Wis u Technol*, 10: 263-276.

**Voskresensky, N. A. (1965).** Salting of herring. In *Fish as Food*, Vol. III. G. Borgstrom (Ed.). Academic Press, New York, pp: 107-131.

**Volz, H.; Gleiter, C.; Waldmeier, P.; Struck, M.; Moller, H. (1996).** Brofaromine: a review of its pharmacological properties and therapeutic use. *J Neural Transm*, 103: 217-245.

**Warm, K.; Boknaes, N.; Nielsen, J. (1998).** Development of Quality Index Methods for evaluation of frozen cod (*Gadus morhua*) and cod fillets. *J of aquatic Food Product Technol*, 7 (1): 45-59.

**Wekell, M. M.; Hollingworth, T. A.; Sullivan, J. J. (1987).** Application of flow injection analysis (FIA) to the determination of seafood quality. In *Seafood quality determination: developments in food science*. Kramer, D. E.; Liston, J. Eds. Elsevier Science Publishing Company Inc., New York, Volum 15, pp. 17-25.

**Wekell, M. C. (1991).** Seafood products. *J Assoc Off Anal Chem*, 74: 136-137.

**Wekell, J. C.; Barnett, H. (1991).** New method for analysis of trimethylamine oxide using ferrous sulfate and EDTA. *J Food Sci*, 56 (1): 132-135.

**Wong, K.; Bartlett, F.; Gill, T. A. (1988).** A diagnostic test strip for the semiquantitative determination of trimethylamine in fish. *J Food Sci*, 53 (6): 1653-1655.

**Wong, K.; Gill, T. A. (1987).** Enzymatic determination of trimethylamine and its relationship to fish quality. *J Food Sci*, 52 (1): 1-3 y 6.

**Yamanaka, H.; Shimakura, K.; Shiomi, K.; Kikuchi, T. (1986).** Changes in non-volatile amine contents of the meats of sardine and saury pike during storage. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 52 (1): 127-130.

**Yamanaka, H.; Shiomi, K.; Kikuchi, T. (1989).** Cadaverine as a potential index for decomposition of salmonoid fishes. *J Food Hyg Soc Japan*, 30: 170-174.

**Yamanaka, H. (1991).** Polyamines as potential indexes for freshness of fish and squid. *Food Rev Int*, 6 (4): 591-602.

**Yatsunami, K.; Echigo, T. (1991).** Isolation of salt tolerant histamine-forming bacteria from commercial rice-bran pickled sardine. *Bull Jpn Soc Sci Fish*, 57: 1723-1728.

**Yeannes, M. I.; Casales, M. R. (1995a).** Estudio de las variables de proceso de marinados de anchoita (*E. anchoita*). *Alimentaria*, 262: 87-91.

**Yeannes, M. I.; Casales, M. R. (1995b).** Influencia del proceso en el nivel de histamina en productos pesqueros. *Alimentaria*, 262: 93-98.

**Yen, G. C.; Hsien, C. L. (1991).** Simultaneous analysis of biogenic amines in canned fish by HPLC. *J Food Sci*, 56: 158-160.

**Yongsawatdigul, J.; Choi, Y. J.; Udornporn, S. (2004).** Biogenic amines formation in fish sauce prepared from fresh and temperature-abused Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *J Food Sci*, 69 (4): 312-319.