

INDICADORES DE CALIDAD SANITARIA Y DEL DETERIORO EN FILETES DE DORADA (*SPARUS AURATA*) REFRIGERADOS SOMETIDOS A UN TRATAMIENTO DE AGUA OZONIZADA Y SAL DE GLICINA

Deterioration and health quality indicators in refrigerated fillets of sea bream treated with ozonated water and glycine salt

Periago M.J.*; Santaella, M.; Martínez-Graciá M.C.; Navarro-González I.; Puche C.

Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología. Área de conocimiento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo 30071- MURCIA

***Autor para correspondencia:** Periago M.J. Teléfono: 868-884793/98. Fax: 868-884147. Email: mjperi@um.es

Historial del artículo:

Recibido: 10 febrero 2017

Aceptado: 31 octubre 2017

RESUMEN

En el presente trabajo hemos estudiado el efecto del lavado con agua ozonizada y el lavado por inmersión durante 2 min con una solución de sal sódica de glicina comercial a una concentración de 5 ppm, sobre los parámetros de calidad de los filetes de dorada (*Sparus aurata*). Los filetes de dorada con ambos tratamientos fueron envasados individualmente y almacenado en hielo, realizando los análisis a tiempo cero a los 6, 10 y 17 días de almacenamiento. Como indicadores químicos fueron analizadas las concentraciones de Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT) y Nitrógeno de Trimetilamina (N-TMA). Para evaluar la calidad microbiológica se aislaron y cuantificaron los microorganismos marcadores de higiene (aerobios mesófilos totales, *Enterobacteriaceae* y coliformes) y microorganismos específicos del deterioro del pescado (*Pseudomonas spp.*, *Brochotrix thermosphacta* y *Shewanella putrefaciens*). Durante el almacenamiento en refrigeración se observó un incremento significativo de los diferentes grupos microbianos y de los indicadores químicos de calidad en los filetes de dorada, alcanzando valores inaceptables a partir de los 10 días de almacenamiento. De forma general, la utilización de la sal de glicina comercial a 5 ppm no tiene un efecto en la disminución de los microorganismos alterantes de los filetes de dorada, en comparación con los filetes tratados con agua ozonizada, aunque sí se observó una ralentización en el crecimiento de *Enterobacterias*.

Palabras clave: Dorada, NBVT, N-TMA, bacterias del deterioro, calidad microbiológica.

ABSTRACT

In this study we have studied the effect of washing with ozonized water and the treatment with a commercial glycine salt at 5 ppm for 2 min., on the quality parameters of sea bream fillets (*Sparus aurata*). After treatment, the fillets were introduced in a plastic bag and stored in ice and in refrigeration, carrying out the analysis at time zero and at 6, 10 and 17 days of storage. Total volatile Basic Nitrogen (TVBN) and Trimethylamine nitrogen (TMA-N) were analyzed as chemical indicators. The microbiological quality was determined through the isolation and quantification of the hygiene microorganisms (total aerobic mesophiles), *Enterobacteriaceae* and coliforms) and specific microorganisms of the fish spoilage of (*Pseudomonas spp.*, *Brochotrix thermosphacta* y *Shewanella putrefaciens*). During the refrigerated storage a significant increase of the different microorganisms and of chemical indicators were observed in the sea bass fillets, reaching unacceptable levels after the 10 days of storage. In general, the utilization of the commercial glycine salt at 5 ppm do not exhibit an effect on the reduction of the specific microorganisms of sea bass fillet spoilage in comparison with the samples washing only with ozonized water.

Key words: Sea bream, TVNB, TMA-N, spoilage bacteria and microbiological quality.

INTRODUCCIÓN

La dorada (*Sparus aurata*) es una de las especies marinas cultivadas en países del Mediterráneo, en sistemas de jaulas flotantes. Su consumo se ha incrementado significativamente durante esta última década, ya que es una especie muy apreciada desde el punto de vista culinario y gastronómico, y los sistemas de producción han abaratado el coste haciéndola más accesible para todos los grupos de población.

Muchos estudios se han realizado acerca de los distintos factores que afectan a la calidad de la dorada como son el estilo de vida (dorada salvaje o cultivada) (Periago et al., 2005), las condiciones de temperatura durante el crecimiento (López-Albors et al., 2008), la alimentación (Poli et al., 2001), tipo de sacrificio (Acerete et al., 2007), etc. Sin embargo, no hay muchos estudios que recojan la evolución del grado de frescura y de su calidad microbiológica durante la vida comercial de nuevas presentaciones comerciales.

El pescado y los productos de la pesca son alimentos altamente perecederos, comparados con otros alimentos de origen animal, aumentando la carga microbiana de los mismos durante su almacenamiento. La carga microbiológica del pescado depende de numerosos factores como son el tipo de pescado, la carga inicial

en el medio marino, la manipulación higiénica, el almacenamiento en frío, la evisceración y el fileteado (Huss, 1992). La vida comercial de estos productos es reducida y para las doradas enteras almacenadas en hielo se han conseguido hasta 12 días (Nuray Erkan, 2009).

Hoy en día el fileteado se presenta como una alternativa a la comercialización de pescado entero, porque facilita la utilización por parte de los consumidores, al adquirir un producto listo para cocinar. Sin embargo, el fileteado aumenta el riesgo de contaminación cuando las prácticas higiénicas son deficientes a la vez que favorece la multiplicación de los microorganismos al existir una mayor exposición al oxígeno. Así, el fileteado puede incrementar la flora microbiana relacionada con la contaminación y una deficiente manipulación higiénica y aumentar la presencia de microorganismos alterantes típicos del pescado, responsables de la formación de compuestos nitrogenados relacionados con la aparición de los olores típicos a pescado alterado como son la formación de amoníaco y nitrógeno de trimetilamina, así como otros componentes nitrogenados de bajo peso molecular y que son volátiles.

Está bien documentada la microflora mesófila de los peces, consistente en géneros de gram-negativas como *Pseudomonas* o *Shewanella*, y gram-positivas como *Clostridium* o *Lactobaci-*

llus (Chouliara et al., 2005). Sin embargo, sólo algunas especies de bacterias son responsables y específicas del deterioro en el caso del pescado, como *Pseudomonas spp* y las productoras de H₂S como *Photobacterium phosphoreum* (Huss, 1992).

Para reducir la carga microbiológica en los filetes de pescado se han utilizado diferentes compuestos y preparaciones con capacidad para retardar el crecimiento bacteriano durante el almacenamiento en hielo, alargando la vida comercial. Las prácticas más comunes compatibles con la legislación son las operaciones de salado, acidificación, utilización de aceites esenciales, adición de quitosán, el envasado en atmósferas modificadas etc... (Goulas y Kontominas, 2007; Mexis et al., 2009; Frangos et al., 2010; Zhou et al., 2011). La utilización de compuestos que reduzcan la carga microbiológica en los alimentos está regulada legalmente, autorizando aquellos que son seguros para su utilización en la alimentación.

Hoy en día, la industria alimentaria desarrolla nuevos ingredientes con la finalidad de poder retrasar el crecimiento bacteriano en productos frescos y poder alargar la vida comercial sin necesidad de tener que adicionar procesos tecnológicos adicionales. Entre ellos está la utilización de extractos de plantas, antioxidantes naturales, sales de aminoácidos etc... Resultan especialmente indicado para aquellos alimentos o productos que hagan constar en sus especiales condiciones de conservación la necesidad de frío positivo, es decir, entre los 4-7 °C, y para los que desde siempre, la industria ha sido reacia a utilizar aditivos y conservantes de naturaleza alguna, principalmente debido al impacto que dichos aditivos y conservantes ocasionan sobre las propiedades esenciales del producto, tanto organolépticos, funcionales, estructurales, etc.

En este sentido se ha publicado una patente sobre el uso de la glicina y las sales de glicina como agentes antibacterianos en alimentos y bebidas contra microorganismos responsables del deterioro y patógenos Gram-negativos, que

tiene como ventajas no alterar el sabor de los alimentos y proporcionar una mayor seguridad que otros compuestos que se usan habitualmente (sal, ácidos y los nitritos y nitratos) (Patente publicada nº ES 2 432 552 T3). Sin embargo, aunque se han descrito los beneficios de estos compuestos como agentes antibacterianos en distintos alimentos en condiciones experimentales de inoculación, no se han estudiado en pescado fresco evaluando sus efectos sobre la vida comercial. Por ello, el objetivo del presente trabajo de investigación ha sido determinar la calidad microbiológica de los filetes de dorada almacenados en refrigeración tras la aplicación del ingrediente comercial a base de sal glicina, y determinar su posible utilización para aumentar la vida comercial de este tipo de presentación comercial, comparando su efecto con el obtenido mediante la aplicación de agua ozonizada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

Los especímenes de dorada (*Sparus aurata*) utilizados en el presente estudio fueron adquiridos en el mercado en tamaño comercial procedente de una empresa de acuicultura. Las doradas fueron adquiridas dentro de las 24 horas posteriores a su sacrificio y una vez en el laboratorio se procedió a la eliminación de la cabeza, evisceración y posterior fileteado, extrayendo de cada pez dos filetes libres de espinas, pero conservando la piel. Los filetes se lavaron con agua ozonizada para reducir la carga microbiológica superficial y se clasificaron en dos lotes: uno sin ningún tratamiento adicional y otro con un tratamiento adicional con una sal comercial de glicina. Este tratamiento consistió en un lavado por inmersión durante 2 minutos en una solución con agua y hielo y una concentración de la sal a una concentración de 5 ppm. Posteriormente, los filetes lavados solo con agua ozonizada y los sumergidos en

la solución de glicina se introdujeron en bolsas y se almacenaron entre capas de hielo. Pasadas las 3 horas se procedió al análisis inicial, realizando el análisis de los indicadores químicos de frescura y el análisis microbiológico, para determinar microorganismos higiénicos y alterantes. El resto de los filetes fueron clasificados en diferentes lotes y almacenados en hielo y en el interior de un frigorífico para realizar los análisis posteriores en los días 6, 10 y 17 tras el almacenamiento en refrigeración.

Análisis químico

Como indicadores del grado de frescura se determinaron en los diferentes filetes de dorada, en función del tratamiento aplicado y el tiempo de almacenamiento, los parámetros químicos de Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT) y el contenido de nitrógeno de Trimetilamina (N-TMA). El NBVT fue determinado usando el método de referencia de la Unión Europea Decisión de la Comisión (95/149/CE) (Pedro Castro, 2004). El N-TMA fue determinado usando el método de AOAC (AOAC, 1995). Los contenidos de NBVT y N-TMA fueron expresados como mg NBVT/100 g músculo de dorada y mg N-TMA/100 g músculo de dorada, respectivamente.

Análisis microbiológico

Preparación de muestras

Una muestra de los filetes (10 g) se transfirió asépticamente a una bolsa de homogenización estéril Stomacher (Standard Bag Seward), a la cual se añadieron 90 ml de agua de peptona estéril (agua peptonada tamponada, BioRad Laboratories), y se homogeneizó la mezcla (60 s a 1.600 rpm) usando un masticador de laboratorio (Stomacher Basic, IUL Instruments). Tras la homogeneización, se preparó una serie de ocho diluciones decimales a partir de la muestra.

Siembra y recuento microbiológico

Para el recuento microbiológico se tomaron alícuotas de 0,1 ml de las diluciones decimales seriadas (1:10 agua de peptona) y se sembraron en superficie en los medios de cultivo correspondientes, usando un asa de siembra estéril para la distribución homogénea. Para la cuantificación de los microorganismos aerobios mesófilos totales se utilizó el Plate Count Agar (PCA, Oxoid, código CM-0325). Las placas fueron incubadas a 30°C durante 48 h. Para *Pseudomonas spp.* se utilizó el Cetrimide Fusidin Cephaloridine Agar (CFC, Oxoid, código CM-0559 suplementado con SR-0103), incubando a 20°C durante 2 días. Streptomycin Thallous Acetate-Actidione Agar (STAA, Oxoid, código CM-0881 suplementado con SR-0151) se usó para el recuento de *Brochothrix thermosphacta*, incubando las placas a 25°C durante 3 días. El recuento de microorganismos coliformes, se realizó sembrando las muestras sobre placas con Chromocult (Merk, código VM-916526-749), que se incubaron a 37°C durante 3 días. Para el recuento de *Enterobacteriaceae* totales y bacterias productoras de H₂S, que se identificaron como *Shewanella putrefaciens*, fueron sembrados inóculos de 1 ml sobre Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG, código CM-0485) y Peptone Iron Agar (PIA) (medio preparado según receta), respectivamente. Para estos dos microorganismos la siembra se realizó en masa en doble capa, incubando las placas a 30°C durante 24 h en el caso de las *Enterobacteriaceae*, y a 20°C durante 4 días para *S. putrefaciens*. Todos los protocolos de trabajo se realizaron de acuerdo al trabajo descrito por Chytiri (2004). Las condiciones de siembra e incubación para cada uno de los microorganismos estudiados aparecen recogidas en la Tabla 1.

Una vez concluido el periodo de incubación, las placas fueron examinadas visualmente para identificar las colonias típicas y características de cada microorganismo asociadas

Tabla 1. Condiciones de siembra e incubación para los distintos microorganismos analizados.

MICROORGANISMO	MEDIO	CONDICIONES DE CULTIVO	TIPO DE SIEMBRA
Mesófilos aerobios	PCA	30 °C/48 h	Superficie
<i>Pseudomonas spp.</i>	Psudomonas base + CFC (SR-103)	20 °C/48 h	Superficie
Enterobacterias	VRBGA	30 °C/24 h	Masa doble capa
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Iron Agar	20 °C/4 días	Masa doble capa
Coliformes	Cromocult	37 °C/2 días	Superficie
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	STAA + SR 151	25 °C/3 días	Superficie

con cada medio de cultivo. Para el recuento se seleccionaron las diluciones que permitieron la contabilización visual del número de colonias. El número de unidades formadoras de colonias (ufc/g) fueron transformado a logaritmo decimal.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado con diferentes filetes de pescado. Los resultados de las determinaciones microbiológicas y los valores para indicadores químicos de grado de frescura fueron analizados estadísticamente con el programa SPSS versión 19.0. Los resultados fueron expresados como valor medio de tres determinaciones y desviación estándar (Media \pm SD). Para determinar las diferencias estadísticamente significativas en los diferentes parámetros analizados se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y un test de separación de medias (Test de Tukey) estableciendo las diferencias significativas para un $p < 0.05$. Para establecer las diferencias entre los diferentes tratamientos (lavado solo con agua ozonizada y lavado con agua ozonizada más la sal de glicina a una concentración de 5 ppm) se rea-

lizó un análisis de comparación de “*T de Student*” para muestras relacionadas, comparando los tratamientos en los diferentes tiempos, y considerando las diferencias estadísticamente significativas para $p < 0.05$. Finalmente, para conocer la relación entre las variables estudiadas se llevó a cabo un estudio de correlación bivariada de Pearson.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis microbiológico

Las Figuras de la 1 a la 7 muestran la evolución durante el almacenamiento en refrigeración de los microorganismos alterantes e indicadores de calidad higiénica en los filetes de dorada sometidos al lavado con agua ozonizada (ozono) y con agua ozonizada más el tratamiento con la solución de sal glicina (O + Glicina). En general, se observa un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en todos los microorganismos estudiados en los dos lotes de filetes de dorada, siendo este incremento proporcional al tiempo de almacenamiento. Si comparamos los recuentos microbianos entre los dos tratamientos en cada momento en el que se llevó a cabo el análisis

microbiológico, de forma general no se observaron diferencias significativas entre las muestras lavadas con agua ozonizada y las tratadas con ozono y glicina conjuntamente, a excepción de algunos muestreos y microorganismos específicos que serán descritos puntualmente.

Los microorganismos aerobios mesófilos totales (AMT) de todas las muestras incrementaron con el paso del tiempo de almacenamiento en refrigeración ($p < 0,05$) (Figura 1), no existiendo diferencias significativas entre los dos tratamientos para un mismo tiempo de almacenamiento. Según Masniyom et al., (2002) los AMT de los filetes refrigerados de dorada incrementan rápidamente desde un valor inicial de 10^4 ufc/g a 10^8 ufc/g tras 15 días en refrigeración, datos que coinciden con los obtenidos en este estudio donde se registraron a los 17 días de almacenamiento, un recuento final de 8,24 log ufc/g para el tratamiento con glicina y 9,32 log ufc/g para el control.

Un recuento inicial de *Enterobacteriaceae* inferior a 2,1 log ufc/g, indica una buena higiene del medio marino del que se extraen

los especímenes de pescado, además de unas adecuadas condiciones higiénicas de procesamiento durante el manejo, fileteado, transporte y envasado (Atrea et al., 2009). En nuestro estudio (Figura 2), se obtuvo un recuento inicial de 10^1 ufc/g de muestra, y un crecimiento similar en ambas experiencias, tanto control como el tratamiento con glicina, hasta los 10 días de conservación, en el que se aislaron aproximadamente 10^3 ufc/g para ambas muestras, siendo para el control (ozono) algo mayor (3,47 log ufc/g). A partir de este momento, las muestras tratadas con glicina mantuvieron un recuento estable, llegando a niveles de 3,22 log ufc/g sin mostrar diferencias estadísticamente significativas a los 6, 10 y 17 días de almacenamiento. Las muestras de ozono, sin embargo, mostraron un aumento considerable del recuento de *Enterobacteriaceae* hasta el día 17, con un máximo de 10^7 ufc/g. Este diferente comportamiento observado entre los dos lotes nos indica que la glicina puede tener un efecto inhibitorio sobre este grupo bacteriano, observando diferencias estadísticamente

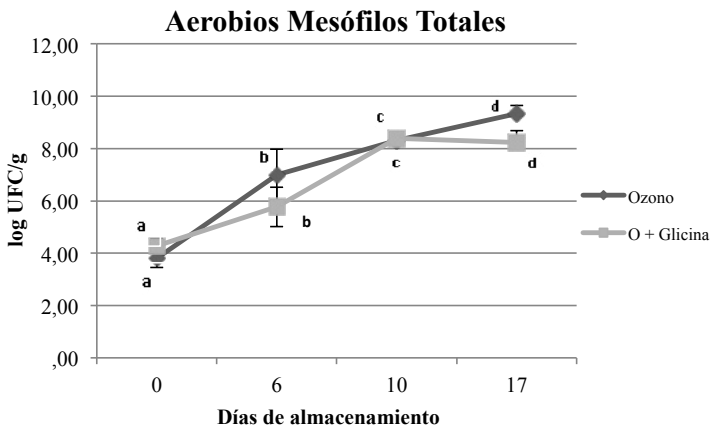


Figura 1. Cambios en el recuento de aerobios mesófilos totales en filetes de dorada refrigerados a 4°C con el tratamiento de agua ozonizada y agua ozonizada más la sal de glicina a una concentración de 5 ppm (O + Glicina). Las barras representan la desviación típica de la media de las muestras por triplicado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tiempos para cada tratamiento.

significativas ($p < 0.05$) entre las muestras de ozono y ozono más glicina en los días 10 y 17.

Las bacterias coliformes son un grupo importante de *Enterobacterias*, constituyen alrededor del 10% de la microflora intestinal y tienen la peculiaridad de fermentar la lactosa produciendo gas. La supervivencia de estas bacterias en medios no entéricos es limitada, por lo que su presencia indica una contaminación

reciente. En un estudio realizado, recientemente, manteniendo doradas enteras y fileteadas en refrigeración se observó un incremento significativo de coliformes tras las operaciones de fileteado, mientras que en la carne de las doradas enteras no se detectó crecimiento de estas bacterias hasta 5 días de almacenamiento en refrigeración (Santaella-Pascual, 2011). En el presente estudio, al tratarse de un alimento

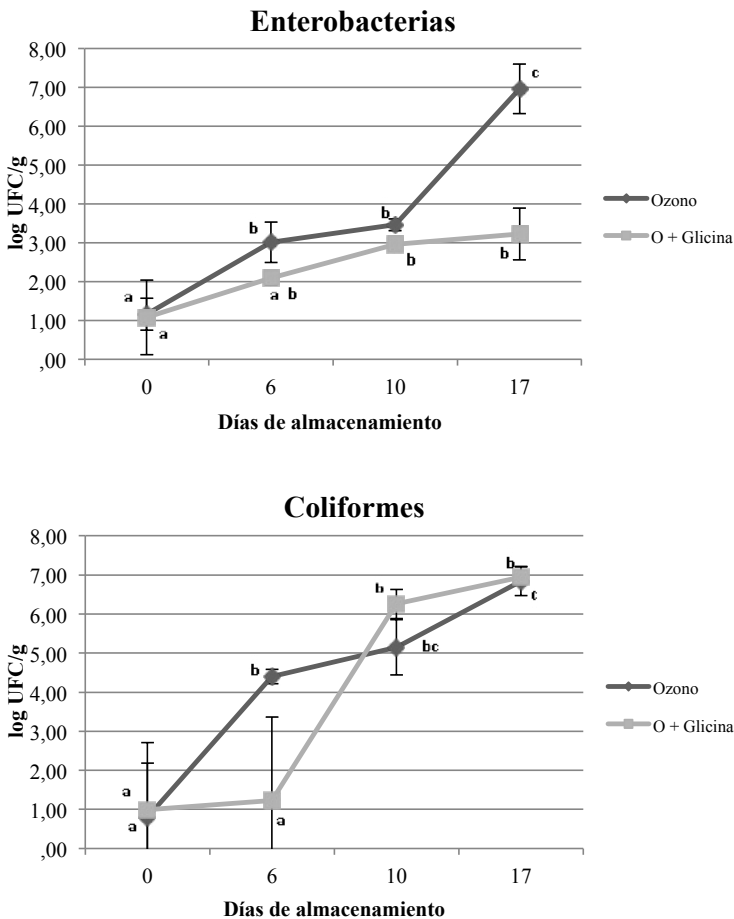


Figura 2. Cambios en el recuento de *Enterobacteriaceae* y coliformes en filetes de dorada refrigerados a 4°C con el tratamiento de agua ozonizada y agua ozonizada más la sal de glicina a una concentración de 5 ppm (O + Glicina). Las barras representan la desviación típica de la media de las muestras por triplicado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tiempos para cada tratamiento.

manipulado y eviscerado, es normal que exista una difusión de bacterias del intestino del pez a la superficie del filete. El recuento inicial es de 1,0 log ufc/g, y tras 17 días de conservación llegan a niveles de casi 7,0 log ufc/g con significación estadística $p < 0.05$ (Figura 2). En el lote tratado con glicina se observa una ralentización en el crecimiento de coliformes entre los días 0 y 6 de almacenamiento, no observando diferencias significativas entre el control y el tratamiento con glicina para ninguno de los tiempos ensayados. Las diferencias observadas en el crecimiento de Enterobacterias y coliformes podrían deberse a las características de los medios de cultivo, ya que el medio VRBG no permitiría el crecimiento de coliformes al ser fermentadores de lactosa y necesitar como nutriente esencial este disacárido.

Para el pescado capturado en el Mar Mediterráneo, numerosos autores han constatado que *Pseudomonas spp.* y *S. putrefaciens*, constituyen las principales bacterias específicas del deterioro en pescados enteros y fileteados, conservados en aerobiosis y a baja temperatura (López-Caballero et al., 2002; Papadopoulos et

al., 2003; Taliadourou et al., 2003; Paleologos et al., 2004). El recuento inicial de *Pseudomonas* fue de aproximadamente 3,5 log ufc/g para dorada (Figura 3), que es bastante superior al mostrado para la trucha arcoíris por otros autores (Chytiri et al., 2004). Los niveles de este microorganismo aumentaron exponencialmente y significativamente ($p < 0.05$) para ambas muestras a lo largo de los 17 días de almacenamiento, llegando a alcanzar en el último día niveles de 10^9 ufc/g para ambos tratamientos (Figura 3). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los valores tanto iniciales como los obtenidos en cada uno de los días de muestreo para ambos tratamientos, por lo que la sal de glicina administrada en la concentración de 5 ppm, no tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la población de *Pseudomonas*. Sin embargo, otros compuestos utilizados comúnmente en la industria alimentaria sí que pueden tener un efecto en la inhibición del crecimiento de este grupo microbiano. Frangos y et al., (2010) muestran cómo la inmersión de filetes de trucha en salmuera al 10% disminuye en casi 2 puntos logarítmicos la carga de *Pseu-*

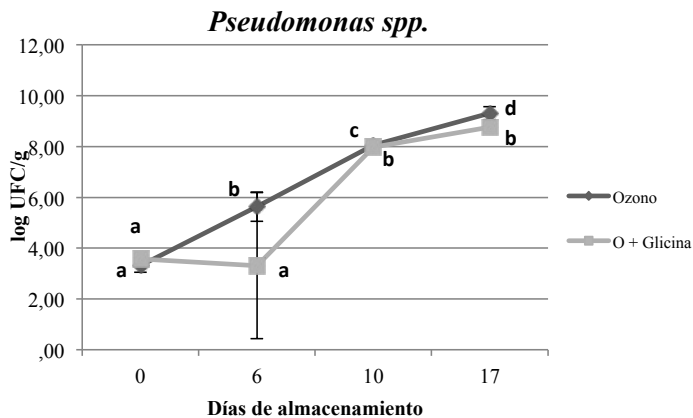


Figura 3. Cambios en el recuento de *Pseudomonas* en filetes de dorada refrigerados a 4°C con el tratamiento de agua ozonizada y agua ozonizada más la sal de glicina a una concentración de 5 ppm (O + Glicina). Las barras representan la desviación típica de la media de las muestras por triplicado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tiempos para cada tratamiento.

domonas entre los días 3 y 9 de almacenamiento refrigerado. Sin embargo, la concentración de sal necesaria para conseguir este efecto es muy elevada, alterando las características organolépticas del pescado fresco.

Brochothrix thermosphacta y *Shewanella putrefaciens* se han catalogado como bacterias específicas del deterioro en el pescado y los productos derivados, aunque suelen aparecer en un recuento bajo, constituyendo tan sólo una pequeña fracción de la carga microbiológica. Su identificación en pescado y derivados, está relacionada con el detrimento de las características sensoriales debido a la acumulación de productos químicos de desecho derivados del metabolismo microbiano (Gram et al., 1996). *Brochothrix thermosphacta* (Figura 4) es un microorganismo que se suele encontrar en pescado refrigerado y almacenado al vacío o en atmósfera modificada. El recuento inicial de *Brochothrix* en las muestras de filete de dorada fue de 1,85 log ufc/g para el control, frente a 2,86 log ufc/g para los filetes sometidos al tratamiento con glicina. En las muestras lavadas con ozono solo se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para este microorganismo entre los días 0 y 6 con los días 10 y 17 de almacenamiento, mientras que en el segundo lote se observaron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los cuatro muestreos. Sin embargo, el recuento final es de aproximadamente 6,8 log ufc/g para ambos tratamientos no existiendo diferencias entre la aplicación de los mismos. En un estudio de Mejilholm et al. (2004), se observó cómo los niveles de *Brochothrix* alcanzan valores de 10^8 ufc/g a los 15 días en muestras envasadas en atmósfera modificada (50% CO_2 , 30% N_2 , 20% O_2), lo que corrobora que, en muestras refrigeradas, pero no envasadas en atmósferas modificadas, el crecimiento de esta bacteria se ve inhibido.

El recuento de *Shewanella putrefaciens*, está directamente relacionado con el detrimento de la vida útil del pescado, causado por la descomposición del óxido de trimetilamina (O-TMA) a nitrógeno de trimetilamina (N-TMA).

Para observar una alteración en la calidad del pescado, es necesaria una población de 10^7 - 10^8 ufc/g de la bacteria *Shewanella putrefaciens* (Gram y Dalgaard, 2002). El recuento inicial de las bacterias productoras de H_2S en los filetes de dorada fue de 1,96 y 2,12 log ufc/g para el control y el tratamiento con sal de glicina, respectivamente, mostrando un comportamiento similar en el crecimiento bacteriano ambos grupos de muestras (Figura 4). En este caso tampoco se apreció un efecto significativo en función del tipo de tratamiento aplicado a los filetes de dorada, al no existir diferencias en el recuento entre los distintos muestreos.

Indicadores químicos

El contenido en nitrógeno básico volátil total (NBVT) y el nitrógeno de trimetilamina (TMA) de todas las muestras analizadas se muestra en la Figura 5. En las muestras de filete de dorada almacenadas en refrigeración el contenido de NBVT se incrementó rápidamente para las muestras del tratamiento control y alcanzó 34,35 mg NBVT/100 g tras 10 días de almacenamiento, frente a los 23,24 mg NBVT/100 g obtenidos para las muestras tratadas con glicina, siendo el único caso en el que se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$). El último día de experiencia, se obtuvieron valores finales de 62,30 y 64,17 mg NBVT/100 g para el tratamiento control y de glicina respectivamente, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos. En nuestras muestras se alcanzan valores muy altos ya que, en general, las muestras almacenadas en presión atmosférica tienen mayor NBVT, comparadas con muestras envasadas en atmósferas modificadas (Masniyom et al., 2005).

En relación al nitrógeno de TMA, éste es producido por la descomposición del óxido de trimetilamina (TMA-O), debido a la actividad microbiana y enzimática, por ello un contenido bajo de N-TMA en el tiempo 0 nos indica que los peces son de buena calidad (Frangos et al.,

2010). Durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración de los filetes de dorada se produjo un patrón muy parecido para ambos tratamientos, en los que existe un periodo de estabilización de los niveles de TMA entre los días 6 y 10 en ambos grupos, observando diferencias estadísticamente significativas durante los días 6 y 10

($p < 0.05$) para los tratamientos con ozono más glicina y ozono solo o control. El contenido final de TMA fue aproximadamente de 11 mg N/100 g para ambas experiencias, no existiendo diferencias significativas ($p > 0,05$). En el estudio de Masniyom et al. (2002) se obtuvieron valores máximos de 12 mg N/100 g de TMA, en dorada

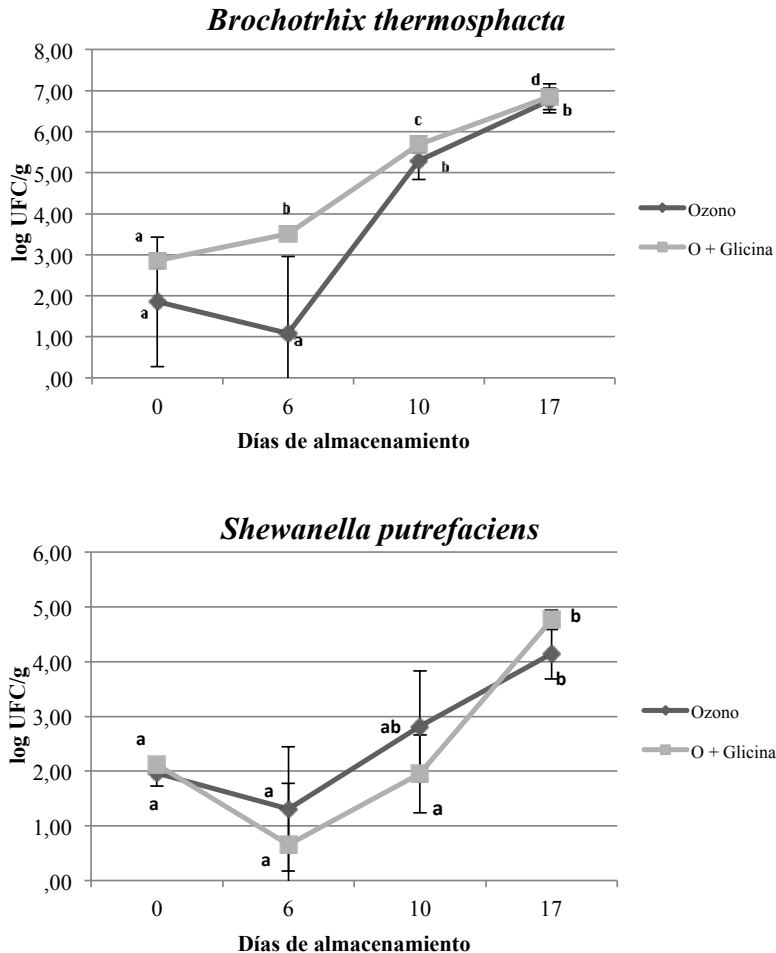


Figure 4. Cambios en el recuento de *Shewanella putrefaciens* y *Brochothrix thermosphacta* en filetes de dorada refrigerados a 4°C con el tratamiento de agua ozonizada y agua ozonizada más la sal de glicina a una concentración de 5 ppm (O + Glicina). Las barras representan la desviación típica de la media de las muestras por triplicado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tiempos para cada tratamiento.

almacenada durante 15 días en diferentes atmósferas modificadas, siendo el mayor valor para peces almacenados en aire, como control.

El estudio de correlación mostró una correlación positiva y significativa entre los indicadores químicos del grado de frescura y el crecimiento microbiano. Este hecho se debe a que en la

evaluación global de los datos existe un incremento proporcional entre los microorganismos analizados y el aumento de los compuestos de degradación, tanto de NBVT como de N-TMA, aunque hay grupos bacterianos que interviene de forma más destacada en la formación de estos compuestos debido al metabolismo microbiano.

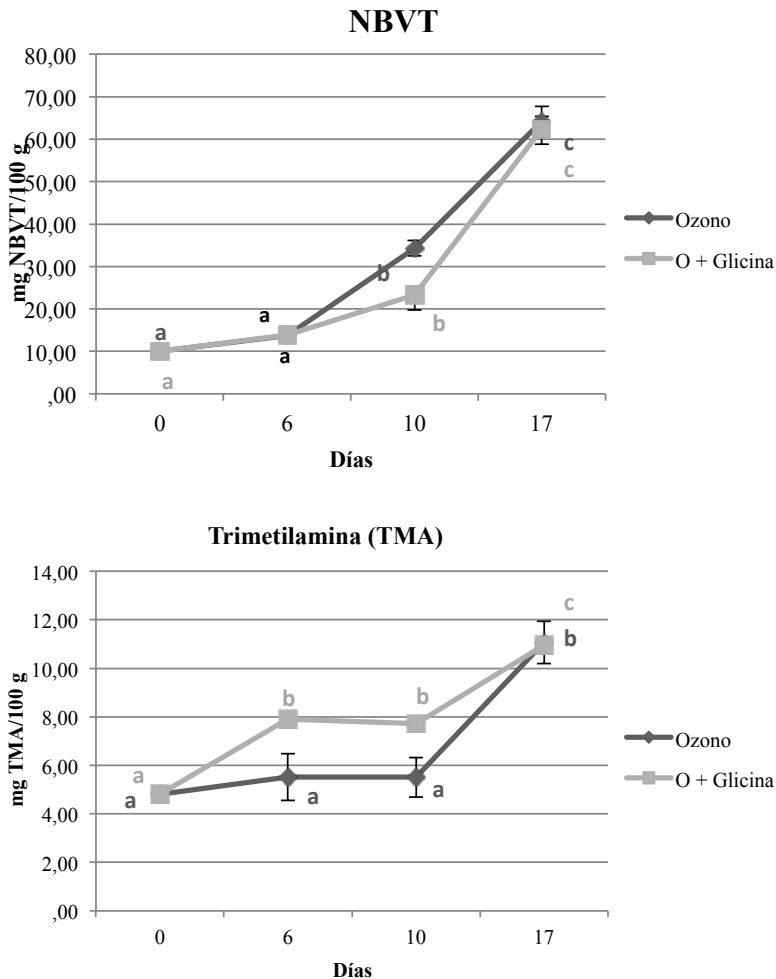


Figura 5. Variación en el contenido de nitrógeno de trimetilamina (N-TMA) y nitrógeno básico volátil total (NBVT) en filetes de dorada refrigerados a 4°C con el tratamiento de agua ozonizada y agua ozonizada más la sal de glicina a una concentración de 5 ppm (O + Glicina). Las barras representan la desviación típica de la media de las muestras por triplicado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tiempos para cada tratamiento.

CONCLUSIONES

De forma general, la utilización de la sal comercial de glicina a una concentración de 5 ppm no tiene un efecto en la disminución de la flora microbiana alterante de los filetes de dorada, en comparación con los filetes tratados con agua ozonizada, ya que todos los parámetros relacionados con el deterioro del pescado y el grado de frescura no muestran diferencias significativas entre grupos. Sin embargo, debido a que se observó una reducción en el crecimiento de *Enterobacterias* sería necesario estudiar el efecto sobre distintas especies bacterianas de este grupo que pueden afectar a la calidad higiénica del pescado, sobre todo cuando se somete a manipulaciones que entrañan un mayor riesgo de contaminación, como son el eviscerado y el fileteado.

BIBLIOGRAFÍA

- ALASALVAR, C., TAYLOR, K. D. A., OKSUZ, A., GARTWAITE, T., ALEXIS, M. N., GRIGOAKIS, K. 2001. Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods. *Food Chem.* 7: 33-40.
- ATREA, I., PAPAVERGOU, A., AMVROSIAIDIS, I., SAVVAIDIS, I. N. 2009. Combined effect of vacuum-packaging and oregano essential oil on the shelf-life of Mediterranean octopus (*Octopus vulgaris*) from the Aegean Sea stored at 4 °C. *Food Microbiol.* 26:166-172.
- CAKLI, S., KILINC, B., CADUN A., DINCER T., TOLASA S. 2006. Effects of using slurry ice on the microbiological, chemical and sensory assessments of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored at 4°C. *Eur. Food Res. Techn.* 222:130-138.
- CAKLI, S., KILINC, B., CADUN, A., DINCER, T., TOLASA, S. 2007. Quality differences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control* 18:391-397.
- CARUSO, G., MAIMONE, G., MANCUSO, M., MODICA, A., GENOVESE, L. 2004. Microbiological controls across the productive cycle of *Dicentrarchus labrax* L. and *Sparus aurata* L.: a study from the environment to the final product. *Aquacul. Res.* 35:184-193.
- CASTRO, P., PENEDO, J. C., CABALLERO CANSINO, M. J., SANJUÁN, E., MILLÁN, R. 2006. Total volatile base nitrogen and its use to assess freshness in European sea bass stored in ice. *Food Control* 17:245-248.
- CHOULIARA, I., SAVVAIDIS, I. N., RIGANAKOS, K., KONTOMINAS, M. G. 2005. Shelf-life extension of vacuum-packaged sea bream (*Sparus aurata*) fillets by combined γ -irradiation and refrigeration: microbiological, chemical and sensory changes. *J. Sci. Food Agric.* 85:779-784.
- CHYTIRI, S., CHOULIARA, I., SAVVAIDIS, I. N., KONTOMINAS, M. G. 2004. Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. *Food Microbiol.* 21:157-165.
- DALGAARD, P., MADSEN, H.L., SAMIEIAN, N., EMBORG, J. 2005. Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone belone belone*) – effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. *J. Appl. Microbiol.* 101(1):80-95.
- EMBORG, J., LAURSEN, B. G., DALGAARD, P. 2004. Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2°C – effect of vacuum- and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 101:263-279.
- ERKAN, N., G. RETENER, U., ALPAS, H. 2010. Effects of high-pressure treatment on physicochemical characteristics of fresh sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Consumer Protec. Food Safety* 5:83-89.
- ERKAN, N., RETENER, G. U. 2010. The effect of high hydrostatic pressure on the microbiological, chemical and sensory qua-

- lity of fresh gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Eur. Food Res. Technol. 230:533-542.
- FERNÁNDEZ-SEGOVIA, I., ESCRICHE, I., FUENTES, A., SERRA, J.A. 2006. Microbial and sensory changes during refrigerated storage of desalted cod (*Gadus morhua*) preserved by combined methods. Int. Food Microbiol. 116:64-72.
- FRANGOS, L., PYRGOTOU, N., GIATRAKOU, V., NTZIMANI, A., SAVVAIDIS, I.N. 2010. Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. Food Microbiol. 27:115-121.
- FUENTES, A., FERNÁNDEZ-SEGOVIA, I., BARAT, J. M., SERRA, J. A. 2011. Influence of sodium replacement and packaging on quality and shelf life of smoked sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). Food Sci. Technol. 44:917-923.
- GOULAS, A. E., KONTOMINAS, M. G. 2007. Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. Food Chem. 100:287-296.
- GRAM, L., MELCHIORSEN, J. 1996. Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas sp.* and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. J Appl. Bacteriol. 80:589-595.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1998. Microorganisms in Foods. En: Microbial Ecology of Food Commodities-Fish and Fish Products, vol. 6, pp. 130-189.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1986. Sampling plans for fish and shellfish. En: ICMSF, Microorganisms in Food Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications, vol. 2, pp. 181-196.
- LÓPEZ-CABALLERO, M. E., HUIDROBO, A., PASTOR, A., TEJADA, M. 2002. Microflora of gilthead seabream (*Sparus aurata*) stored in ice. Effect of washing. Eur. Food Res. Technol. 215:396-400.
- LYHS, U., LAHTINEN, J., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., HYYTI-TREES, E., EL-FING, K., KORKEALA, H. 2001. Microbiological quality and shelf-life of vacuum-packaged 'gravad' rainbow trout stored at 3 and 8°C. Int. J. Food Microbiol. 70:221-230.
- MASNIYOM, P., BENJAKUL, S., VISES-SANGUAN, W. 2002. Shelf-life extension of refrigerated seabass slices under modified atmosphere packaging. J. Sci. Food Agric. 82:873-880.
- MASNIYOMA, P., BENJAKULA, S., VISES-SANGUAN, W. 2004. Combination effect of phosphate and modified atmosphere on quality and shelf-life extension of refrigerated seabass slices. Lebensm. Wissen. Technol. 38:745-756.
- MEJLHOLM, O., BØKNÆS, N., DALGAARD, P. 2004. Shelf life and safety aspects of chilled cooked and peeled shrimps (*Pandalus borealis*) in modified atmosphere packaging. J. Appl. Microbiol. 99:66-76.
- MENDES, R., GONZALVES, A. 2007. Effect of soluble CO₂ stabilization and vacuum packaging in the shelf life of farmed sea bream and sea bass fillets. Int. J. Food Sci. Technol. 43:1678-1687.
- MOHAN, C. O., RAVISHANKAR, C. N., SRINIVASA GOPAL, T. K., LALITHA, K. V., ASOK KUMAR, K. 2010. Effect of reduced oxygen atmosphere and sodium acetate treatment on the microbial quality changes of seer fish (*Scomberomorus commerson*). Food Microbiol. 27:526-534.
- OLOFSSON, T. C., AHRNE, S., MOLIN, G. The bacterial flora of vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 7°C, identified by direct 16S rRNA gene analysis and pure culture technique. J. Appl. Microbiol. 103:109-119.
- PALEOLOGOS, E. K., SAVVAIDIS, I. N., KONTAMINAS, M. G. 2004. Biogenic amines formation and its relation to micro-

- biological and sensory attributes in ice-stored whole gutted and filleted Mediterranean Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Food Microbiol. 21:549-557.
- PAPADOPOULOS, V., CHOULIARA, I., BADEKA, A., SAVVAIDIS, I. N., KONTAMINAS, M. G. 2003. Effect of gutting on microbiological, chemical and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. Food Microbiol. 20:411-420.
- TALIADOUROU, D., PAPADOPOULOS, V., DOMVRIDOU, E., SAVVAIDIS, I. N., KONTAMINAS, M. G. 2003. Microbiological, chemical and sensory changes of whole and filleted Mediterranean aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. J. Sci. Food Agric. 83:1373-1379.
- VAIKOUSI, H., BILIADERIS, C. G., KOUTSOUMANIS, K. P. 2009. Applicability of a microbial Time Temperature Indicator (TTI) for monitoring spoilage of modified atmosphere packed minced meat. Int. J. Food Microbiol. 133:272-278.
- ZOGUL, F. O., KULEY, E., YESIM, O. 2007. Sensory, chemical and microbiological quality parameters in sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice or wrapped in cling film or in aluminum foil at $2 \pm 1^\circ\text{C}$. Int. J. Food Sci. Technol. 42:903-909.