



Universidad de Murcia
Facultad de Biología
Departamento de Fisiología Animal



Instituto Murciano de Investigación
y Desarrollo Agrario y Alimentario

VIDA ÚTIL DE LA DORADA ALMACENADA EN REFRIGERACIÓN CON HIELO. INFLUENCIA DE DISTINTOS FACTORES DEL CULTIVO

Memoria de Tesis Doctoral presentada por Ana María Álvarez Trujillo
para optar al grado de Doctor

Murcia, 2012



Instituto Murciano de
Investigación y Desarrollo
Agrario y Alimentario



Región de Murcia
Consejería de Agricultura
y Agua

D^a. M^a Dolores Hernández Llorente y D. Benjamín García García, Doctores Investigadores del Equipo de Acuicultura del Departamento de Producción Animal del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA),

AUTORIZAN:

La presentación, en modalidad de compendio de publicaciones, de la Tesis Doctoral titulada “Vida útil de la dorada almacenada en refrigeración con hielo. Influencia de distintos factores del cultivo.”, realizada por D^a Ana Álvarez Trujillo en el Equipo de Acuicultura del Departamento de Producción Animal del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 18 de Mayo de 2012

Dra. M^a Dolores Hernández Llorente

Dr. Benjamín García García

De acuerdo al reglamento que regula el procedimiento para la lectura de la Tesis Doctoral en la Universidad de Murcia, se presenta la Tesis Doctoral titulada "Vida útil de la dorada almacenada en refrigeración con hielo. Influencia de distintos factores del cultivo." en la modalidad de compendio de publicaciones, de trabajos previamente publicados, una vez ha sido autorizada su presentación por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia en su sesión del 15 de mayo de 2012.

Las referencias completas de los artículos publicados, indexados en SCI, y que constituyen el cuerpo de la Tesis son las siguientes:

A. Álvarez, B. García García, M. D. Garrido, M. D. Hernández (2008). The influence of starvation time prior to slaughter on the quality of commercial-sized gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture*, 284, 106-114.

Índice de impacto: 2,044

A. Álvarez, B. García García, J. Cerezo Valverde, F. Aguado Jiménez, M. D. Hernández (2009). Gastrointestinal evacuation time in gilthead seabream (*Sparus aurata*) according to the temperature. *Aquaculture Research*, 41, 1101-1106.

Índice de impacto: 1,186

A. Álvarez, B. García García, M.J. Jordán, C., Martínez-Conesa, M.D.Hernández (2012). The effect of diets supplemented with thyme essential oils and rosemary extract on the deterioration of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during storage on ice.

Índice de impacto: 3,458

Dedicado a mis padres,
por creer en mi y porque gracias
a ellos siempre he sabido que
sería capaz de conseguir todo
aquello que me propusiera.

Agradecimientos

A Lola y a Benjamín, por darme la oportunidad de vivir esta experiencia, por confiar en mí, y por poder contar con ellos en todo momento.

A mi padre, por su ejemplo de constancia y disciplina, y porque un día me enseñó que “el que quiere puede”, pero que todo requiere un esfuerzo.

A mi madre, que me hizo ver la importancia de valerme por mi misma y de vencer los miedos. Porque desde el día en que me dijo que conseguiría todo lo que me propusiera, no he dejado de marcarme objetivos.

A Alejandro, por su infinita paciencia y su esfuerzo diario. Por su amor. Por apoyarse en mi, por contar conmigo,...

A mi Odín, por esos paseos al final del día que tanto me han ayudado a evadirme y dejar la mente en blanco.

A mis hermanos y amigos, simplemente por estar ahí, porque gracias a ellos todo ha sido un poquito más fácil.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido financiada gracias a una beca predoctoral del Instituto Murciano de Investigación Agrario y Alimentario (IMIDA), en el Marco del Plan de Ciencia y Tecnología 2007-2010 de la Región de Murcia, y cofinanciada por el Fondo Social Europeo. Los proyectos de los que forma parte este trabajo han sido financiados por JACUMAR, a través de los Planes Nacionales de Cultivos Marinos; por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), a través del proyecto RTA2009-00145; y por la Consejería de Agricultura y Agua de la Comunidad Autónoma de Murcia cofinanciado por los Fondos FEDER, a través del proyecto POI-0701.

La dorada es una de las especies de cultivo con mayor producción en el Mediterráneo, siendo su comercialización mayoritariamente de procedencia acuícola. El pescado de acuicultura, a diferencia del de pesca extractiva, ofrece la ventaja de producirse bajo condiciones controladas, de manera que, mediante el conocimiento de la influencia de los factores del cultivo es posible optimizar la calidad del producto final. El objetivo de la presente Tesis Doctoral fue estudiar el efecto de distintos factores del cultivo, como el ayuno previo al sacrificio, el uso de fuentes alternativas vegetales de lípidos en la dieta, y la inclusión de conservantes naturales en el pienso, sobre la calidad y vida útil de la dorada de crianza de tamaño comercial conservada en las condiciones de almacenamiento normalmente empleadas en la industria para este producto.

El ayuno previo al sacrificio es una práctica habitual en acuicultura cuyo objetivo es obtener un pescado con las vísceras limpias, sin restos de alimento, para mejorar la calidad y conservación del producto. El tiempo necesario para vaciar el digestivo depende en gran medida de la temperatura, y éste es un factor que varía según la estación y la zona de cultivo. En la presente Tesis se estimó el tiempo necesario para vaciar el tracto gastrointestinal en la dorada a la temperatura promedio de las diferentes estaciones del año en el Mediterráneo (15, 20 y 25°C). Según los resultados obtenidos, en los meses de verano un período de 24 horas de ayuno sería suficiente, pero en invierno el ayuno no debe ser inferior a 40 horas. Además, el estudio de conservación en hielo de doradas sometidas a distintos tiempos de ayuno, reveló que un ayuno a 21°C de más de 24 horas acelera los procesos de deterioro *post mortem* del pescado (disminución del pH, pérdida de color de la piel, elevado recuento microbiológico y mayor deterioro sensorial), limitando su vida útil. Ésta fue estimada mediante el recuento microbiano en 16 días de almacenamiento para las doradas ayunadas 24 horas, 15 días para las ayunadas 48 horas y 14 días para las de 72 horas.

Por otro lado, frente al creciente interés del sector por el uso de ingredientes de origen vegetal en la fabricación de piensos, la segunda parte de la Tesis se centró en el estudio del efecto de utilizar una dieta con un 75% de sustitución del aceite de pescado por una mezcla 50/50 de aceites de colza y soja sobre la calidad y vida útil de la dorada. En los animales alimentados con estas dietas se observó un mayor contenido en el músculo de los ácidos grasos de la serie *n-6* y una menor cantidad de los ácidos grasos EPA y DHA. Se detectaron además, con técnicas instrumentales, una mayor intensidad de color y mayor firmeza (dureza, elasticidad, gomosidad, y masticabilidad) de los filetes de estos pescados. Mediante el análisis sensorial, a pesar de observar mayor intensidad de olor y de sabor, así como mayor jugosidad y carácter graso en el grupo de animales alimentado con la dieta con aceite de pescado como única fuente de lípidos, éstas no fueron percibidas por el panel de catadores de forma significativa.

El uso de aceites vegetales como parte de la fuente de lípidos de la dieta no mostró un efecto significativo sobre la vida útil de la dorada almacenada en refrigeración, que fue en ambos grupos experimentales de 17 días. Se observó un menor grado de oxidación en el pescado obtenido con la dieta vegetal (mayor incremento de ácidos grasos saturados y menor índice de oxidación), posiblemente debido al menor contenido de ácidos grasos insaturados *n*-3 de cadena larga. Sin embargo, a pesar de observar una mayor estabilidad oxidativa y algunas diferencias en el deterioro sensorial y en el recuento de microorganismos psicrófilos y de *Pseudomonas*, no se observaron diferencias significativas en el índice de calidad ni en el recuento de mesófilos, que son los que determinarían en última instancia la aceptabilidad del producto.

Tanto los procesos oxidativos como el crecimiento microbiano en el pescado *post mortem* podrían ser retrasados mediante la adición en el pienso de conservantes naturales que fueran transferidos al pez. La tercera parte de esta Tesis consistió en evaluar el efecto sobre la vida útil de doradas alimentadas con dietas suplementadas con extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*), y aceites esenciales de tomillo (*Thymbra capitata*, quimiotipo carvacrol, y *Thymus zygis subsp. gracilis*, quimiotipo timol). Estas dietas experimentales eran contrastadas con una dieta control sin aditivos, y una con butil hidroxitolueno (BHT). Los resultados revelaron menores índices de oxidación en los animales alimentados con los piensos suplementados con BHT, carvacrol y romero. En los grupos BHT y timol se observaron menores recuentos bacterianos, además de un deterioro sensorial más lento. La vida útil sensorial fue prolongada en animales que habían sido alimentados con dietas suplementadas con BHT y timol, en dos días, y con romero y carvacrol, en un día, frente a la dieta sin aditivos. Por tanto, estos compuestos añadidos al pienso pueden ser, en mayor o menor medida, acumulados en el músculo del pez, de manera que su adición en la dieta puede tener un efecto añadido sobre la calidad del pescado, retrasando su deterioro *post mortem*.

Palabras clave: dorada, *Sparus aurata*, almacenamiento en hielo, vida útil, calidad, ayuno, evacuación gastrointestinal, temperatura, aceites vegetales, aceites esenciales de tomillo, extracto de romero.

1. Introducción.....	1
1.1. Estado de la acuicultura en España.....	3
1.2. El pescado como alimento.....	5
1.2.1. Contenido en agua.....	5
1.2.2. Porción proteica.....	6
1.2.3. Porción grasa.....	7
1.2.4. Componentes minoritarios.....	8
1.2.4.1. Componentes nitrogenados no proteicos.....	8
1.2.4.2. Minerales.....	9
1.2.4.3. Vitaminas.....	9
1.3. Tendencias de consumo.....	9
1.4. Percepción de calidad en el pescado.....	11
1.4.1. Procesos de deterioro del pescado almacenado en hielo.....	12
1.4.1.1. Procesos autolíticos.....	13
1.4.1.2. Procesos oxidativos.....	15
1.4.1.3. Degradación microbiana.....	17
1.4.2. Métodos de medida de la calidad del pescado.....	20
1.4.2.1. Parámetros físicos.....	20
1.4.2.2. Parámetros químicos.....	24
1.4.2.3. Parámetros microbiológicos.....	26
1.4.2.4. Parámetros sensoriales.....	28
1.5. Factores del cultivo que influyen sobre la calidad del pescado de crianza.....	30
1.5.1. Características de la producción de la especie.....	31
1.5.1.1. Biología y distribución de la especie.....	31
1.5.1.2. Engorde de dorada en España.....	32
1.5.1.3. Comercialización de la dorada de cultivo.....	33
1.5.2. Influencia de las condiciones del cultivo sobre la calidad.....	34
1.5.2.1. Prácticas de manejo previas al sacrificio.....	35
1.5.2.2. Dieta.....	36
1.5.2.2.1. Fuentes alternativas.....	37
1.5.2.2.2. Antioxidantes.....	39
2. Justificación y Objetivos.....	43
3. Plan experimental.....	47
4. Publicaciones.....	51
Publicación I: Gastrointestinal evacuation time in gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>) according to the temperature (2009). A. Álvarez, B. García-García, J. Cerezo Valverde, F. Aguado Giménez, M.D. Hernández. <i>Aquaculture Research</i> 41, 1101-1106.....	53

Publicación II: The influence of starvation time prior to slaughter on the quality of commercial-sized gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>) during ice storage (2008). A. Álvarez, B. García-García, M.D. Garrido, M.D. Hernández. Aquaculture 284, 106-114.....	61
Publicación III: The effect of partial replacement of fish oil with vegetal oils in diets on the quality of gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>). A. Álvarez, B. García-García, R. Fontanillas, M.D. Hernández. En proceso de evaluación (LWT-Food Science and Technology).....	73
Publicación IV: Impact of dietary oil source on the shelf-life of gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>). A. Álvarez, B. García-García, R. Fontanillas, M.D. Hernández. En proceso de evaluación (LWT-Food Science and Technology).....	87
Publicación V: The effect of diets supplemented with thyme Essentials oils and Rosemary extract on the deterioration of farmed gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>) during storage on ice (2012). A. Álvarez, B. García-García, M.J. Jordán, C. Martínez Conesa, M.D. Hernández. Food Chemistry 132, 1395-1405.....	103
5. Discusión.....	117
5.1. Calidad del pescado	119
5.1.1. Calidad nutricional.....	119
5.1.2. Calidad sensorial.....	123
5.2. Deterioro del pescado durante su almacenamiento en hielo.....	128
5.2.1. Cambios en las propiedades físico-químicas.....	128
5.2.1.1. pH.....	128
5.2.1.2. Capacidad de retención de agua (CRA).....	132
5.2.1.3. Textura.....	134
5.2.1.4. Color.....	136
5.2.2. Oxidación de lípidos.....	139
5.2.3. Producción de compuestos volátiles nitrogenados asociados al deterioro.....	143
5.2.4. Crecimiento de microorganismos.....	144
5.2.5. Cambios en los atributos sensoriales.....	147
5.2.6. Estimación de la vida útil.....	151
6. Conclusiones.....	155
7. Referencias bibliográficas.....	159
Anexos.....	185
Comunicaciones a congresos.....	187
Vida útil de doradas (<i>Sparus aurata</i>) de tamaño comercial almacenadas en hielo. Álvarez, A., García García, B., Garrido, M. D., Hernández, M. D. Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y la Acuicultura. Cumaná, Venezuela, 2008.....	189
Sensory assessment of seabream (<i>Sparus aurata</i>) fed with a diet containing thyme essential oil during ice storage. Álvarez, A., García García, B., Martínez, C., Hernández, M. D. 8th Pangborn Sensory Science Symposium. Florencia, Italia, 2009.....	190

Effect of diet containing thyme essential oil on sensory attributes of seabream (<i>Sparus aurata</i>). Álvarez, A., García García, B., Jordán, M. J., Hernández, M. D. 8th Pangborn Sensory Science Symposium. Florencia, Italia, 2009.....	191
Physicochemical, sensory and microbiological evaluations on seabream (<i>Sparus aurata</i>) fed diets containing rosemary extract and thyme essential oils during ice storage. Álvarez, A., Jordán, M. J., Martínez, C., García García, B., Hernández, M. D. Aquaculture Europe 10. Oporto, Portugal, 2010.....	192
Influencia del ayuno previo al sacrificio sobre la calidad de doradas (<i>Sparus aurata</i>) de tamaño comercial almacenadas en hielo. Álvarez, A., García García, B., Garrido, M. D., Hernández, M. D. XII Congreso Nacional de Acuicultura. Madrid, España, 2009.....	194
Selección y entrenamiento de un panel de catadores para pescado. Álvarez, A., García García, B., Garrido, M. D., López, M. B., Ferrandini, E., Hernández, M. D. XII Congreso Nacional de Acuicultura. Madrid, España, 2009.....	196
Influencia de la temperatura en el tiempo de evacuación gastrointestinal en dorada (<i>Sparus aurata</i>). Álvarez, A., García García, B., Hernández, M. D. XII Congreso Nacional de Acuicultura. Madrid, España, 2009.....	198
Perfil descriptivo de besugo (<i>Pagellus bogaraveo</i>). Comparativa entre salvaje y cultivado por tres paneles de catadores entrenados. Hernández, M. D., Álvarez, A., Peleteiro, J. B., Claret, A., Guerrero, L., Rincón, L., Ginés, R. XII Congreso Nacional de Acuicultura. Madrid, España, 2009.....	200
Perfil descriptivo de dorada (<i>Sparus aurata</i>). Comparativa entre salvaje y cultivada por tres paneles de catadores entrenados. Hernández, M.D., Álvarez, A., García García, B., Claret, A., Guerrero, L., Rincón, L., Ginés, R. XII Congreso Nacional de Acuicultura. Madrid, España, 2009.....	202
Diferencias organolépticas entre la lubina de crianza y la de pesca extractiva. Rincón, L., Aguirre, E., Ginés, R., Claret, A., Guerrero, L., Hernández, M.D., Álvarez, A. XII Congreso Nacional de Acuicultura. Madrid, España, 2009.....	204
Desarrollo de perfiles sensoriales para la caracterización de tres especies de crianza: dorada, lubina y besugo. Rincón, L., Ginés, R., Hernández, M.D., Álvarez, A., Claret, A., Guerrero, L. XII Congreso Nacional de Acuicultura. Madrid, España, 2009.....	206
Otras publicaciones.....	209
Sensory, physical, Chemicals and microbiological changes in aquacultured meagre (<i>Argyrosomus regius</i>) fillets during ice storage. M. D. Hernández, M. B. López, A. Álvarez, E. Ferrandini, B. García-García, M. D. Garrido (2009). Food Chemistry 114, 237-245.....	211

Índice de tablas

Introducción

Tabla 1: Producción, valor medio en primera venta y valor total del pescado marino de crianza español en 2010 (APROMAR, 2011).....	4
Tabla 2: Porcentaje de aminoácidos esenciales en diferentes tipos de proteínas.....	6
Tabla 3: Clasificación del pescado según el contenido de grasa (Gil, 2010).....	7
Tabla 4: Frecuencia de compra y consumo (en días al mes) de los productos pesqueros en la población española.....	11
Tabla 5: Procesos autolíticos que tienen lugar en el pescado almacenado.....	14
Tabla 6: Compuestos químicos producidos por la actividad microbiana a partir de los distintos sustratos presentes en el pescado.....	19
Tabla 7: Parámetros texturales estimados con el Análisis del Perfil de Textura (TPA).....	23
Tabla 8: Parámetros y valores estándar para el ensayo de calidad microbiológica de productos frescos refrigerados y congelados procedentes de la pesca y de la acuicultura..	27
Tabla 9: Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de aceites de pescado y de aceites vegetales utilizados en la fabricación de piensos en acuicultura.....	38

Discusión

Tabla 1: Porcentaje de los PUFA de cadena larga de la serie n-3 característicos del pescado (EPA y DHA) y del ácido graso linoléico (LA) característico de aceites vegetales.	120
Tabla 2: Estimación de la cantidad de pescado necesario para cubrir las recomendaciones dietéticas de la ingesta de ácidos grasos realizadas por la “Internacional Society for the Study of Fatty Acids and Lipids” (ISSFAL, 1999).....	121
Tabla 3: Índices aterogénico (IA) y trombogénico (IT) de diversos productos cárnicos y de distintas especies de pescado alimentado con distintas fuentes de lípidos.....	123
Tabla 4: Evolución del <i>rigor mortis</i> en dorada con diversos grados de estrés pre-sacrificio, y distintos métodos de aturdimiento y sacrificio.....	129
Tabla 5: Valores de TBARS (mg MDA/kg) en diversas especies de pescado almacenado en refrigeración.....	142
Tabla 6: Sustratos y compuestos asociados a olores desagradables producidos por bacterias durante el deterioro del pescado almacenado aeróbicamente, empacado en hielo o a temperatura ambiente.....	149
Tabla 7: Cálculo de la vida útil de la dorada de los distintos grupos experimentales según la relación del deterioro con el tiempo de almacenamiento en refrigeración.....	153

Índice de figuras

Plan experimental

Figura 1: Resumen de los experimentos de ayuno previo al sacrificio.....	49
Figura 2: Resumen de los experimentos de sustitución de aceite de pescado de la dieta por aceites vegetales.....	50
Figura 3: Resumen del experimento de la inclusión de antioxidantes en la dieta.....	50

Introducción

Figura 1: Evolución de la producción acuícola de dorada en España (1999-2010) y la tasa de variación interanual (APROMAR, 2011).....	4
Figura 2: Diagrama representativo de la percepción del “alimento ideal” según los hábitos de consumo del siglo XXI.....	10
Figura 3: Representación gráfica de las fases de deterioro del pescado almacenado en hielo (adaptado de Huss, 1976; en Huss, 1995).....	13
Figura 4: Degradación autolítica del ATP.....	15
Figura 5: Representación gráfica del proceso de autooxidación de un lípido poliinsaturado.....	16
Figura 6: Modelo de los cambios en el recuento total de bacterias, en el recuento de bacterias específicos del deterioro y en los índices químicos del deterioro durante el almacenamiento frío de los productos pesqueros (Gram y Huss, 1996).....	18
Figura 7: Medidas de pH del músculo del pescado colocando los electrodos directamente dentro de la carne del pez (izquierda) y en una suspensión de músculo en agua destilada (derecha).....	21
Figura 8: Medida de textura mediante compresión.....	22
Figura 9: Representación gráfica de una curva fuerza-tiempo obtenida del Análisis del Perfil de Textura (TPA).....	23
Figura 10: Medidas de color de la piel (abajo, izquierda) y del filete (abajo, derecha) de dorada con un colorímetro portátil, y representación gráfica del sistema CIELab (derecha).....	24
Figura 11: Fórmula del valor K (Ino: inosina; Hx: Hipoxantina).....	25
Figura 12: Esquema de la reacción del malondilaldehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA) (izquierda) y fotografía del producto cromógeno resultado de la reacción (derecha, abajo).....	25
Figura 13: Análisis sensorial de pescado realizado por un panel de catadores entrenado específicamente para este producto.....	29
Figura 14: Curvas de crecimiento de dorada y de la variación de temperatura durante la fase de engorde en el Mediterráneo español (Ortega, 2008).....	33

Discusión

Figura 1: Representación gráfica de las coordenadas CIELab que definen la cromaticidad del músculo de las doradas alimentadas con dietas suplementadas con distintas fuentes de lípidos. Dieta FO: 0% aceite de aceite vegetal; Dieta VO: 75% aceites vegetales.....	125
Figura 2: Perfil descriptivo de cada uno de los grupos experimentales que fueron alimentados con las dietas con distintas fuentes de lípidos. Dieta FO: 0% aceite vegetal; Dieta VO: 75% aceites vegetales.....	126
Figura 3: Valores de pH en dorada tras pocas horas después del sacrificio, observados en los estudios de ayuno (Ayunos de 24h, 48h y 72h) y de fuentes alternativas de lípidos (Dietas FO y VO) de la presente tesis, y los aportados por otros autores.....	130
Figura 4: Evolución del pH del músculo de dorada durante el almacenamiento de animales ayunados durante distintos periodos previos al sacrificio (Ayuno de 24h, 48h y 72h) y de los alimentados con distintas fuentes de lípidos (Dieta FO y VO).....	131
Figura 5: Representación de la influencia de la disposición espacial de la red de proteínas o filamentos del músculo en la capacidad de retención de agua (CRA) de la carne (adaptado de Hamm, 1972, 1975; en Hamm, 1986).....	132
Figura 6: Evolución de la capacidad de retención de agua (CRA) del músculo de dorada durante el almacenamiento de animales alimentados con distintas fuentes de lípidos (Dietas FO y VO) y con dietas suplementadas con distintos antioxidantes (Dietas Control, BHT, Romero, Carvacrol, y Timol).....	134
Figura 7: Evolución de la firmeza, estimada mediante el método instrumental (rojo) y mediante valoración sensorial (azul), del músculo de dorada durante el almacenamiento de animales ayunados 24h (líneas continuas), 48h (líneas discontinuas) y 72h (líneas de puntos).....	135
Figura 8: Representación gráfica de las coordenadas CIELab que definen la cromaticidad de la piel de las doradas sometidas a distintos periodos de ayuno antes del sacrificio (izquierda) y de las alimentadas con dietas suplementadas con distintos antioxidantes (derecha).....	137
Figura 9: Representación gráfica de las coordenadas CIELab que definen la cromaticidad de los filetes de las doradas alimentadas con dietas suplementadas con distintos antioxidantes (izquierda) y de las alimentadas con distintas fuentes de lípidos (derecha)...	138
Figura 10: Cambios en el nitrógeno básico volátil total (NBVT) en dorada con el tiempo de almacenamiento, observados en los estudios de ayuno (Ayuno de 24, 48 y 72h) y fuentes alternativas de lípidos (Dietas FO y VO) de la presente tesis, y los aportados por otros autores.....	144
Figura 11: Crecimiento microbiano en el músculo de dorada durante el almacenamiento en hielo de cada uno de los grupos experimentales.....	145
Figura 12: Cambios en las agallas de la dorada durante almacenamiento en hielo (de izquierda a derecha mayor grado de deterioro).....	150
Figura 13: Cambios en los ojos de la dorada durante almacenamiento en hielo (de izquierda a derecha mayor grado de deterioro).....	151
Figura 14: Regresión lineal del índice de calidad frente al tiempo de almacenamiento para los distintos grupos experimentales.....	152

INTRODUCCIÓN

1.1. Estado de la acuicultura en España

Según las estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), en el año 2009 el 19,6% del volumen de la producción acuícola y pesquera total de la Unión Europea (UE) fue de productos procedentes de la acuicultura, cuya producción fue un 3,4 % superior al año anterior. Si bien el valor en primera venta disminuyó un 4,3%, la importancia de esta actividad no es igual en todos los países de la UE.

España es el Estado miembro de la UE con mayor producción en acuicultura, seguido de Francia y Reino Unido. En algunas Comunidades Autónomas, la relevancia económica y social de la acuicultura supera ya a la de la pesca. Según el último informe APROMAR (“La acuicultura marina de peces en España 2011”), la producción en 2009 de productos acuícolas en España fue de 266.479 toneladas, cuya cantidad supone el 20,9% de la cantidad total producida en la UE. Sin embargo, cuando se considera el valor de la producción, España pasa a ocupar la 5ª posición en Europa, con 413 millones de euros producidos en 2009, que supone el 12% del valor total de la producción de acuicultura de la UE. Si nos fijamos únicamente en los datos de producción de pescado de crianza, España es el tercer productor, con 64.200 toneladas (10,2%), después de Reino Unido (147.035t, 23,4% y 474 millones de euros) y Grecia (99.581t, 15,8% y 431 millones de euros), y el cuarto en valor de producción, con 286 millones de euros (15,5% del total de millones de euros).

La dorada (*Sparus aurata*), con una producción de 96.419 t (un 15,3%) en 2009, es la tercera especie de pescado de crianza producida en la UE, después de la trucha arco iris (*Onchorhynchus mykiss*), con 195.544 t (32,1%), y el salmón atlántico (*Salmo salar*), con 146.424t (23,3%). En concreto en los países europeos meridionales, la dorada, junto con la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y el rodaballo (*Psetta maxima*), son las principales especies producidas de peces marinos de crianza. Los principales países europeos productores de dorada son Grecia (72.000t, 51,5%), Turquía (21.000t, 15,0%) y España (20.360t, 14,6%).

Según las estadísticas de la Federación Europea de Productores de Acuicultura (FEAP), la producción acuícola total de dorada en Europa y el resto del mundo en 2010 fue de 139.925t, lo que supuso un descenso del 16,6% respecto a la producción del año anterior (167.000t), que ya se había reducido en un 6,5% respecto al 2008. En España, la producción de dorada de acuicultura en 2010, aunque su valor unitario fue de los más bajos, fue la más elevada con respecto a la del resto de especies (Tabla 1), aunque ésta fue un 14,1% menor respecto de 2009 (23.690t), que fue un 1% inferior a la de 2008 (Figura 1).

Tabla 1: Producción, valor medio en primera venta y valor total del pescado marino de crianza español en 2010 (APROMAR, 2011).

	Producción (TM)	Valor unitario (€/Kg)	Valor total (€)
Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	20.360	4,20	85.512.000
Rodaballo (<i>Psetta maxima</i>)	6.910	8,70	60.117.000
Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	12.495	4,29	53.603.550
Corvina (<i>Argyrosomus regius</i>)	3.250	3,92	12.740.000
Anguila (<i>Anguilla anguilla</i>)	446	3,92	12.740.000
Lenguado (<i>Solea senegalensis</i>)	204	10,70	2.182.800
Besugo (<i>Pagellus bogaraveo</i>)	185	9,60	1.776.000
TOTAL	43.850		219.508.270

Esta circunstancia de descenso continuado de la producción no había ocurrido nunca en la historia de la acuicultura de dorada en España. El nivel de producción de 2010 retorna a las cifras de 2006 (Figura 1). En 2010 la Comunidad Valenciana (con el 37% del total) ha encabezado la producción de dorada de acuicultura en España, seguida por Murcia (29%), Canarias (15%), Andalucía (12%) y Cataluña (8%). La caída de la producción de dorada ha tenido lugar en todas las Comunidades Autónomas excepto en Cataluña.



Figura 1: Evolución de la producción acuícola de dorada en España (1999-2010) y la tasa de variación interanual (APROMAR, 2011).

Esta caída de las producciones en España ha ocurrido en todas las especies relevantes de pescados marinos de crianza (dorada, lubina y rodaballo), de manera que la producción total

de estos pescados en 2010 (43.888t) supuso una reducción del 9,4% respecto del año previo. Ésta supone la primera reducción en los últimos 25 años de esta actividad. En los primeros años de la presente década se habían venido registrando crecimientos medios del 20%, y el crecimiento mínimo necesario para mantener la competitividad a nivel global se estima entre el 15 y 20% anual.

A pesar de este descenso de la producción acuícola, actualmente la dorada de crianza supone el 95,3% del total de su producción. Aunque sigue llegando a los puertos pesqueros españoles una cierta cantidad de dorada de pesca extractiva (1.151t en 2009), su volumen permanece relativamente constante. Durante los últimos años, los mayores esfuerzos de las empresas de acuicultura han ido orientados hacia la optimización de las producciones, y esto ha permitido la consolidación en el mercado de esta especie, alcanzando en sólo una década niveles altos de producción en la UE. Hoy, una vez superados los mayores retos técnico-productivos, y frente a la situación de descenso en su producción, la orientación al cliente es la nueva frontera a conquistar (APROMAR, 2011).

1.2. El pescado como alimento

La porción comestible del pescado supone aproximadamente el 35-60% del peso total, aunque ésta varía con la forma, la edad y si se ha capturado antes o después del desove (Suzuki, 1987). Está constituida principalmente por tejido muscular, tejido conectivo y grasa, y su composición química depende de diversos factores como la especie, la edad, el sexo, el estado fisiológico, la época del año y la región de captura (Huss, 1995; Ordóñez, 1998).

1.2.1. Contenido en agua

El agua es el nutriente más abundante en el pescado (53-80% del total), y uno de los más variables con la especie y la época del año, dándose una relación inversamente proporcional entre el contenido de agua y el de grasa (Ordóñez, 1998). El contenido hídrico es uno de los componentes más importantes que afectan a la calidad y al procesado de la parte consumible del pescado, ya que participa en la conformación y reactividad de las proteínas, cuya hidratación es responsable de las propiedades reológicas y la jugosidad del músculo (Suárez, 2006).

1.2.2. Porción proteica

El pescado constituye una importante fuente de proteínas, tanto por su alto contenido (15-20% en peso húmedo) (Ordóñez, 1998) como por la calidad de éstas, que es debida a su alto contenido en aminoácidos esenciales.

Las proteínas del músculo del pescado se dividen en tres grupos. Las proteínas sarcoplásmicas o hidrosolubles (20-30% del total de proteínas) poseen características similares a las de los productos cárnicos, aunque con menores cantidades de proteínas coloreadas (mioglobina y citocromo C), que en el músculo blanco de algunas especies de pescado se encuentran sólo en cantidades traza (Ordóñez, 1998). Estas proteínas están constituidas por enzimas que juegan un papel importante en los cambios de sabor del pescado almacenado, pero son poco relevantes para la textura. Las proteínas miofibrilares (65-75% del total de proteínas), sin embargo, están constituidas por los mismos tipos (actina, miosina y tropomiosina) y proporciones que en la carne, aunque en mayor cantidad (Ordóñez, 1998). Las proteínas contráctiles actina y miosina son más sensibles a la desnaturalización y a la proteólisis que las de la carne (Suárez, 2006). La alteración de la textura del pescado está directamente relacionada con los cambios producidos en este tipo de proteínas, por lo que son de gran importancia desde el punto de vista nutritivo y tecnológico. En cuanto al tejido conectivo, constituido por las proteínas del estroma, la proporción es menor en pescado (3% en gálidos-10% en elasmobranquios) que en mamíferos, y es más débil y fácil de romper, por lo que se desgrana más rápidamente y a temperaturas más bajas (Ordóñez, 1998). Además, el pescado es menos rico en colágeno que el de la carne, por lo que la textura del pescado es generalmente más tierna (Suárez, 2006).

Tabla 2: Porcentaje de aminoácidos esenciales en diferentes tipos de proteínas.

Aminoácido	Pescado	Leche	Vacuno	Huevos
Lisina	8,8	8,1	9,3	6,8
Triptófano	1,1	1,6	1,1	1,9
Histidina	2,0	2,6	3,8	2,2
Fenilalanina	3,9	5,3	4,5	5,4
Leucina	8,4	10,2	8,2	8,4
Isoleucina	6,0	7,2	5,2	7,1
Treonina	4,6	4,4	4,2	5,5
Metionina-Cisteína	4,0	4,3	2,9	3,3
Valina	6,0	7,6	5,0	8,1

Datos tomados de Huss (1995). Fuentes Braekkan (1976) y Moustard (1957).

El valor nutritivo de las proteínas del pescado es muy elevado debido a su alto contenido de aminoácidos esenciales (Tabla 2), de forma que con 200-250 g de carne de pescado se cubren las necesidades diarias de aminoácidos (Zamora y Rubio, 2006). La composición de aminoácidos es similar entre las distintas especies.

1.2.3. Porción grasa

El valor energético o calórico del pescado varía principalmente según el contenido en grasa. Éste es muy variable según la época del año, la dieta, la temperatura y salinidad del agua, la especie, el sexo y la parte del cuerpo del animal. Cuanto mayor es el contenido de grasa mayor es el porcentaje de lípidos de reserva energética (Ordóñez, 1998). Según el contenido de grasa del músculo los pescados se clasifican en grasos, semigrasos y magros (Tabla 3). Los pescados grasos almacenan los lípidos principalmente en el tejido subcutáneo y en el músculo, aunque, en especies con cantidades muy elevadas de lípidos, también en la cavidad abdominal, y los pescados magros en el hígado y debajo de la piel en pequeñas cantidades. En la carne del pescado, los depósitos de grasa se encuentran esparcidos por el tejido muscular en forma de gotas de aceite intramusculares, en el músculo rojo, o fuera de las células, en el músculo blanco (Huss, 1995).

Tabla 3: Clasificación del pescado según el contenido de grasa (Gil, 2010).	
	Ejemplos
Pescados magros	Bacalao, bacaladilla, besugo, gallo, lenguado, merluza, rape, rodaballo, ...
Pescados semigrasos	Dorada, lubina, pez espada, salmonete, ...
Pescados grasos	Anguila, atún, bonito, boquerón, caballa, estornino, jurel, salmón, sardina,...

La composición de lípidos de la grasa de pescado presenta unas características concretas que le confieren propiedades muy saludables. La grasa de pescado difiere de la de origen terrestre en que presentan un alto contenido de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA). Los de la serie $n-3$ constituyen el mayor porcentaje y son los que en realidad aportan las características peculiares del pescado, siendo los principales el eicosapentaenoico ($20:5n3$, EPA) y el docosahexanoico ($22:6n3$, DHA). Estos ácidos grasos son precursores de eicosanoides con funciones antiinflamatorias, antiarrítmicas y antitrombóticas (Simopoulos, 2005). En peces

marinos la cantidad de estos ácidos grasos es mayor que en peces de agua dulce, siendo también mayor la proporción *n-3/n-6* (33:5 en peces marinos y 12:5 en peces de agua dulce) (Ordóñez, 1998).

1.2.4. Componentes minoritarios

1.2.4.1. Componentes nitrogenados no proteicos

Los compuestos nitrogenados no proteicos constituyen únicamente el 9-18% del total de nitrógeno muscular, excepto en elasmobranquios, que se encuentran en mayor proporción (33-39%). Están constituidos mayoritariamente (en un 95% o más) por aminoácidos libres, dipéptidos (principalmente carnosina y anserina), compuestos de guanidina, óxido de trimetilamina (OTMA) y sus derivados, urea, y nucleótidos y compuestos afines (Ordóñez, 1998). Muchos de estos compuestos contribuyen al sabor y a la alteración de los pescados.

El óxido de trimetilamina (OTMA) es relativamente abundante en productos de origen marino y tiene una función osmorreguladora. Los niveles máximos se encuentran en los tejidos de los elasmobranquios y calamares (75-250 mg N/100g), seguido de los gádidos como el bacalao y la merluza (60-120mg N/100 g), y los peces planos y pelágicos presentan los valores mínimos (Huss, 1995). Tras ser reducido por acción bacteriana y enzimática a dimetilamina (DMA) y trimetilamina (TMA), origina el olor característico a pescado deteriorado.

La transformación de urea a amoníaco por acción bacteriana origina también olores desagradables. El contenido de urea en el músculo de los peces es variable. Los elasmobranquios son especialmente ricos (2% del tejido muscular) y, sin embargo, los peces teleósteos suelen tener bajas tasas (<0.05% del tejido muscular) (Ordóñez, 1998).

Los nucleótidos de adenina del músculo representan más del 90% del total de nucleótidos en el pescado, siendo el adenosín trifosfato (ATP) el más abundante. Tras la muerte del pez éste pasa a IMP en un proceso aulítico rápido. La presencia de inosina monofosfato (IMP) aporta un sabor agradable asociado al pescado fresco. El paso de IMP a inosina o hipoxantina tiene lugar de forma más lenta y su acumulación indica que el pescado está comenzando a perder frescura (Ordóñez, 1998).

En cuanto al contenido de aminoácidos libres es especialmente importante la histidina. Determinadas especies de pescado, activas y con músculo rojo (caballa, bonito, sardina, atún,...), contienen elevados niveles en el músculo (100-200 mg/100g de músculo) que puede

transformarse en histamina tras la descarboxilación microbiana cuando el pescado entra en descomposición (Huss, 1995; Ordóñez, 1998). El consumo en ciertos momentos de estas especies ha sido asociado a la intoxicación por consumo de histamina (intoxicación escombroide).

1.2.4.2. Minerales

Los más abundantes son calcio (5-200 mg/100g de músculo), fósforo (100-400 mg/100g de músculo), sodio (30-150 mg/100g de músculo), potasio (250-500 mg/100g de músculo) y magnesio (10-50 mg/100g de músculo) y en cantidades traza pueden encontrarse yodo (16-318 µg/100g), hierro (1mg/100g), cobre, flúor, cobalto y cinc. En general, los productos de origen marino son los alimentos naturales más ricos en yodo, ya que a pesar de ser un elemento traza, se encuentra en cantidades superiores que en otras grasas animales y que en la mayoría de aceites vegetales (Ordóñez, 1998).

1.2.4.3. Vitaminas

Respecto al contenido en vitaminas destacan las del grupo B (B1, B2, B3, B12) y las liposolubles A y D, sobre todo en los pescados grasos. Por ejemplo, los aceites de hígado de pescado, como el de bacalao, son excelentes fuentes de vitamina A (Ordóñez, 1998).

1.3. Tendencias de consumo

Según el estudio "Las tendencias del consumo y del consumidor en el siglo XXI" realizado por el Instituto Nacional del Consumo (INC), el cambio en las últimas décadas del estilo de vida ha provocado cambios en los hábitos de consumo de alimentos (Figura 2). El ritmo de vida actual, con escasa disponibilidad de tiempo, y el creciente interés por una mayor comodidad en la preparación de alimentos han conducido a una tendencia general a dedicar menos tiempo a la compra y a la cocina. También la incorporación de la mujer al mundo laboral, cuya principal función era realizar las tareas del hogar (incluyendo la compra y la cocina), y los cambios en la estructura familiar, con menor número de miembros y en ocasiones incluso sin hijos, han contribuido al consumo de productos que no requieran mucha elaboración, así como de platos preparados o precocinados.

Unido al interés por la comodidad en la alimentación, existe una creciente preocupación por la salud. El incremento de la expectativa de vida y la voluntad por llevar una vida saludable han promovido el consumo tanto de alimentos frescos como de alimentos elaborados con ingredientes y productos naturales, y sin salsas ni condimentos. En esta línea, el desarrollo y la comercialización de productos ecológicos están teniendo un gran éxito. Además la tendencia generalizada a hacer dietas cada cierto tiempo, ya sea por salud o por razones estéticas, ha provocado la incorporación a la dieta de productos dietéticos con alto contenido en nutrientes. En general, se vuelve de nuevo cada vez más a la dieta mediterránea, cuya variedad atrae de nuevo la atención del consumidor.



Figura 2: Diagrama representativo de la percepción del "alimento ideal" según los hábitos de consumo del siglo XXI.

Según el estudio "Hábitos de consumo y compra de los productos pesqueros en la población española" realizado por el Fondo de Regulación y Organización del Mercado de los productos de la pesca y cultivos marinos (FROM, 2011), la principal razón del consumo de pescado es precisamente el hecho de querer llevar una dieta sana. La percepción del pescado como fuente natural principal de ácidos grasos omega 3 es mayoritaria tanto en el sector de la hostelería y la restauración (92,2% del total de los profesionales del sector encuestados) como en los hogares (82,2% del total de consumidores responsables de la compra encuestados). Además, la obtención de productos envasados y congelados, junto con la comercialización de filetes y el desarrollo de técnicas de envasado al vacío, han favorecido el incremento del consumo de

pescado en los últimos años. La tendencia a realizar la compra en tiempos más espaciados (una o dos veces al mes), e incluso la mayor disposición a comer fuera de casa (Figura 2), ha incrementado el consumo de estos productos con una vida útil más prolongada que los productos frescos.

Sin embargo, según las últimas estadísticas del FROM (Tabla 4), el pescado fresco sigue siendo el preferido por los consumidores, adquiriéndose con mayor asiduidad que el resto de productos pesqueros, tanto en el hogar como en el sector de la hostelería y la restauración. Por el contrario, el pescado congelado preparado, es decir el pescado precocinado, tiene una aceptación muy baja entre los españoles, el 75,2% de los entrevistados no lo adquieren nunca y, los que lo adquieren, lo hacen de forma esporádica. También en la hostelería estos productos tienen menor frecuencia de compra que el resto de productos debido a su menor consumo. Esto indicaría que, a pesar de los cambios en los hábitos de consumo, la percepción de sensorial de un producto sigue siendo un componente muy valorado por el consumidor (Figura 2).

Tabla 4: Frecuencia de compra y consumo (en días al mes) de los productos pesqueros en la población española.

	Consumidores en el hogar		Hostelería y Restauración	
	Compra	Consumo	Compra	Consumo
Pescado fresco	7,1	9	8,9	13,1
Pescado congelado	3,2	5,7	6,3	11,1
Conservas, semiconservas, ahumados y salazones	3,2	6,1	3,4	11
Pescado congelado preparado (precocinado)	0,6	3,5	1,8	7,8

"Hábitos de consumo y compra de los productos pesqueros en la población española" (FROM, 2011).

1.4. Percepción de calidad en el pescado

La calidad del pescado es un concepto complejo en cuanto a que engloba numerosos atributos y características que la determinan. En términos generales, "calidad del pescado" se refiere a la apariencia estética y de frescura, o al grado de deterioro que ha sufrido (Huss, 1995). Su percepción depende, por un lado, de la persona que la valora (comprador, intermediario, procesador o consumidor) y de las necesidades que ésta tenga del producto en cuestión, y, por otro lado, del tipo de producto. Por tanto, los requerimientos de calidad pueden tener distinta importancia según el momento de la cadena de suministro y distribución, que además varían

mucho entre países (Olafsdottir y col., 2004). Para el consumidor, la calidad del pescado implica seguridad, calidad nutricional, disponibilidad, conveniencia e integridad, frescura, palatabilidad, y los atributos físicos más evidentes como los propios de la especie, el tamaño y el tipo de producto (Bremner, 2000).

La carne del pescado, comparada con otros tipos de carnes, es muy susceptible a los procesos autolíticos y a la alteración provocada por la actividad microbiana, de forma que, su calidad puede verse alterada en poco tiempo por los procesos de deterioro *post mortem*. El tiempo transcurrido tras la captura y la cadena de frío a la que el producto es sometido (Giannakourou y col., 2005), así como las técnicas de manejo, procesado y almacenamiento, tienen una importante influencia sobre la conservación de las propiedades del pescado y la duración del producto almacenado (Olafsdottir y col., 1997; Olafsdottir y col., 2004). Teniendo en cuenta que el pescado fresco es un alimento muy perecedero, la frescura de éste es quizás el atributo más determinante de su calidad.

1.4.1. Procesos de deterioro del pescado almacenado en hielo

Los cambios físicos, químicos, bioquímicos y microbiológicos que tienen lugar en el pescado *post mortem* provocan la pérdida progresiva de las características del producto en términos sensoriales y del concepto general de calidad (Olafsdottir y col., 1997). Si bien la temperatura determina en gran medida los procesos autolíticos y el crecimiento microbiano, la velocidad con que tienen lugar los procesos de descomposición dependen también de otros factores como la especie, las condiciones sanitarias durante el sacrificio y el transporte, y la cantidad de alimento que contengan en el intestino (Macagnano y col., 2005). Asimismo, la composición cualitativa y cuantitativa de la microflora inicial asociada al ambiente de procedencia, a la especie, al procesado del pescado, las condiciones de almacenamiento, etc, son también determinantes (Gram y Huss, 1996; Gram y Daalgard, 2002).

La aplicación de frío es una de las técnicas más utilizadas para conservar los productos pesqueros desde su captura hasta la llegada al consumidor. En función de la temperatura empleada, éstos se pueden clasificar en productos refrigerados, congelados y ultracongelados (Madrid y col., 1999). El pescado refrigerado habitualmente se conserva en hielo, de forma que éste se distribuye cubriendo todo el pescado en una proporción hielo/pescado que varía entre 1:1 y 1:4, con lo que se garantizan temperaturas de 1-6°C. Si bien estas condiciones no impiden los procesos autolíticos y microbiológicos implicados en el deterioro, si pueden producir un importante retraso (Madrid y col., 1999; Pascual-Anderson y Calderón-Pascual, 2000).

La degradación del pescado almacenado en hielo, a pesar de ser un proceso complejo, puede dividirse principalmente en cuatro fases en las que el grado en el que tengan lugar la autólisis, la oxidación y la actividad microbiana determina los cambios en la calidad del producto (Figura 3). Los estadios iniciales se caracterizan por la pérdida de olor y sabor principalmente debido a los procesos autolíticos, mientras que en los estadios finales se producen más el ablandamiento de la carne y la producción de volátiles causantes de olores y sabores desagradables, debidos principalmente a la actividad microbiana.

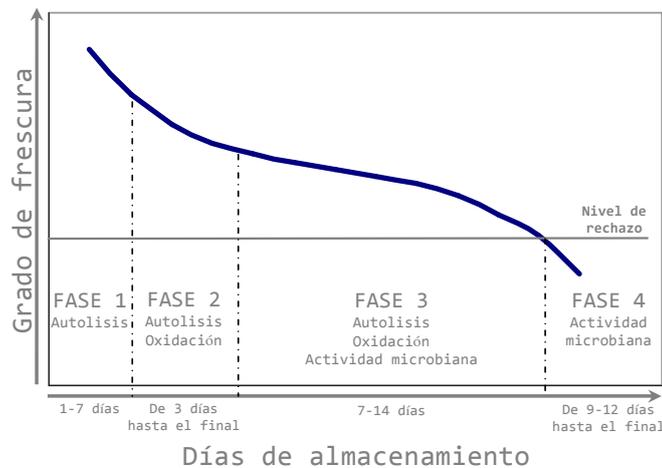


Figura 3: Representación gráfica de las fases de deterioro del pescado almacenado en hielo (adaptado de Huss, 1976, en Huss, 1995).

1.4.1.1. Procesos autolíticos

En la Tabla 5 se muestra un esquema de los procesos autolíticos y productos que resultan de estas reacciones. Los primeros procesos autolíticos que ocurren en el pescado tras su sacrificio están relacionados con la producción de energía del músculo *post mortem*. En el momento de la muerte del pez, el suministro de oxígeno al tejido muscular se interrumpe y se restringe la producción de energía a partir de los nutrientes ingeridos. En estas condiciones de anaerobiosis, la energía se produce a partir del glucógeno almacenado, que genera ácido láctico, y la consecuente disminución del pH. La glucólisis anaerobia es más ineficiente que la oxidación aeróbica, ya que en el primer caso se producen dos moles de ATP por cada mol de glucosa, y en la ruta aeróbica se producen 36 moles de ATP por cada mol de glucosa. Así, después de la muerte, el músculo anaerobio no puede mantener el nivel de ATP normal del

tejido vivo y cuando éste disminuye de 7-10 μ moles/g a $\leq 1 \mu$ moles/g el músculo entra en *rigor mortis* (Huss, 1995).

Tabla 5: Procesos autolíticos que tienen lugar en el pescado almacenado.

Proceso	Productos
Glucólisis	Ácido láctico
Hidrólisis de ATP	ADP, AMP, IMP, Inosina, Hipoxantina
Proteólisis	Péptidos de bajo peso molecular Aminoácidos libres
Lipólisis	Ácidos grasos libres

Otra secuencia importante de la pérdida de ATP en el músculo *post mortem* es su degradación mediante hidrólisis (Figura 4). En general, las moléculas de ATP se hidrolizan rápidamente hasta inosina monofosfato (IMP) por la acción de enzimas endógenas (Okuma y col., 1992), y la posterior degradación del IMP a hipoxantina (Hx) es más lenta y participan tanto enzimas autolíticas como microbianas (Ryder y col., 1993; Olafsdóttir y col., 1997). La descomposición del ATP no afecta a la inocuidad de la carne del pescado, sin embargo, se producen algunos cambios en su calidad. La IMP es un potenciador del sabor, responsable del aroma y el sabor del pescado fresco, de forma que contribuye al sabor dulce de éste durante los primeros estadios del almacenamiento (Scott y col., 1992). La formación de inosina (Ino) e hipoxantina por el contrario provocan un sabor amargo en el pescado deteriorado (Gill y col., 1987, en Huss, 1995).

Los procesos proteolíticos son debidos a la pérdida *post mortem* de la regulación biológica de las proteasas que intervienen en el recambio de las proteínas del músculo en el animal vivo, ya que ésta induce la hidrólisis de ciertas proteínas, debilitando la estructura miofibrilar (Jiang y col., 2000). Se han establecido dos líneas de degradación intracelulares: una de origen lisosomal (catepsinas), y otra de origen citosólico (calpaínas). La contribución de cada uno de estos sistemas enzimáticos no está clara, pero se ha sugerido que actúan en sinergia. Diversos estudios señalan algunas catepsinas (B, D, y L) como responsables de la degradación de las cadenas pesadas de miosina y actina (Aoki y Ueno, 1997; Ogata y col., 1998; Ladrat y col., 2003). En cuanto a las calpaínas, se ha sugerido que degradan las proteínas de la línea Z (Papa y col., 1997; Ladrat y col., 2003). Otras enzimas importantes en la degradación del tejido muscular son las colagenasas, responsables del deterioro de las fibrillas de colágeno que unen las fibras musculares a la miocomata, que es el tejido conectivo que separa cada uno de los bloques de células musculares (miotomos). Este fenómeno es conocido como *ganping*, y puede producirse durante el almacenamiento en hielo prolongado, en periodos cortos a

temperaturas elevadas, o debido a la rápida contracción del músculo durante el *rigor* (Huss, 1995).

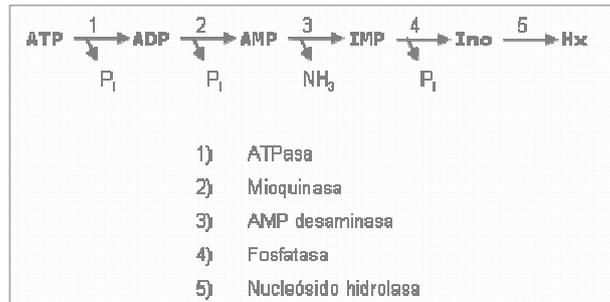


Figura 4: Degradación autolítica del ATP.

El efecto de la descomposición proteolítica está generalmente relacionado con el ablandamiento del tejido muscular. Ésta además resulta en la formación de péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres que actúan como nutrientes adecuados para el crecimiento microbiano y la producción de aminas biógenas, las cuáles afectan a la seguridad del pescado (Fraser y Sumar, 1998).

La hidrólisis de lípidos es catalizada por enzimas intracelulares y digestivas, y resulta en la formación de una cantidad considerable de ácidos grasos libres durante los primeros estadios de almacenamiento. Los triglicéridos presentes en los depósitos de grasa son escindidos principalmente por lipasas del tracto digestivo o las excretadas por ciertos microorganismos, siendo este fenómeno más profundo en el pescado no eviscerado (Huss, 1995). Las lipasas celulares, aunque pueden desempeñar un papel menor, liberan los ácidos grasos que están unidos a los fosfolípidos de membrana, degradando las paredes celulares.

Los ácidos grasos liberados de la hidrólisis de lípidos conducen a la formación de peróxidos e hidroperóxidos mediante procesos oxidativos, y además pueden interaccionar con proteínas musculares provocando efectos perjudiciales en la textura (Huss, 1995; Fraser y Sumar, 1998).

1.4.1.2. Procesos oxidativos

La oxidación de lípidos es la principal causa de deterioro de muchos alimentos que contienen grasas y aceites, de forma que a medida que se produce puede provocar cambios en el olor, el

sabor y el color, disminuyendo la aceptabilidad del producto. El pescado, además, es muy susceptible por el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados que contiene.

La principal vía de oxidación de lípidos consiste en la formación de radicales libres (Figura 5). Ésta puede ser iniciada y acelerada por calor, iones metálicos e irradiación (especialmente UV), que inducen la formación de radicales libres (L^{\bullet}) a partir de una molécula lipídica (LH) (Fase de iniciación). Éste reacciona con el oxígeno para formar un radical hidroxilo (LOO^{\bullet}), el cual reacciona posteriormente con otro lípido para formar hidroperóxidos (LOOH) y un nuevo radical (Fase de propagación). Cuando la cantidad de radicales libres incrementa, estos interaccionan para formar productos finales no radicales (NRP) terminando así la reacción en cadena (Fase de terminación). Los antioxidantes (AH) intrínsecos del pez (tocoferoles, ubiquinol, carotenoides y ascorbato) inhiben la oxidación lipídica en la primera fase de almacenamiento en hielo. Éstos actúan donando un átomo de hidrógeno a los radicales L^{\bullet} o LOO^{\bullet} .

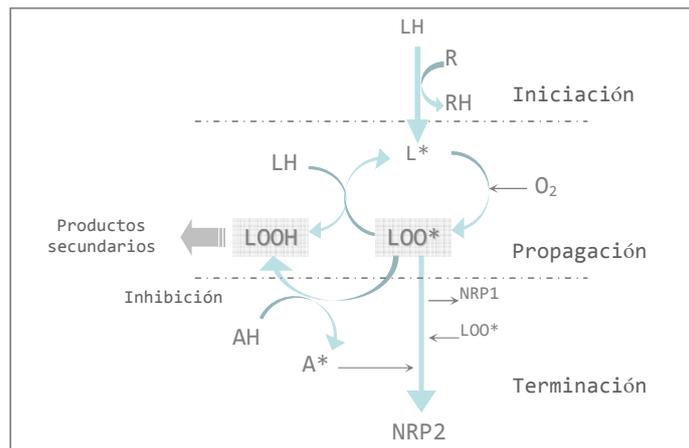


Figura 5: Representación gráfica del proceso de autooxidación de un lípido poliinsaturado.

Los lípidos hidroperóxidos son los productos primarios de la oxidación, y se producen en cantidades relativamente elevadas durante la fase de propagación. Son insípidos y carecen también de olor. Durante los estados posteriores de la oxidación, los hidroperóxidos continúan dividiéndose para formar cadenas carbonadas más cortas que constituyen los productos secundarios de la oxidación (aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos carboxílicos y alcanos). Estos compuestos son responsables de una serie de olores y sabores asociados con la

rancidez oxidativa y algunos incluso provocan una decoloración amarillenta del músculo del pescado.

1.4.1.3. Degradación microbiana

El pescado y los productos pesqueros en general, son excelentes sustratos para el crecimiento de microorganismos. El elevado contenido de nitrógeno no proteico (NPN) del pescado supone una fuente de sustratos fácilmente disponibles para el metabolismo microbiano. Los componentes que constituyen esta fracción son compuestos que contienen nitrógeno hidrosoluble de bajo peso molecular (aminoácidos, creatina, nucleótidos, urea, y OTMA). Algunos de estos compuestos (IMP, inosina, y aminoácidos libres) resultan también de los procesos autolíticos que en este sentido favorecen el crecimiento de bacterias en el músculo (Tabla 5, apartado 4.1.1.). Además, el alto pH *post mortem* (normalmente >6), comparado con otros productos, permite el crecimiento de bacterias sensibles a pH ácidos. Este efecto es debido al bajo contenido de carbohidratos del músculo del pescado (>0,5 %), que hace que se produzcan pequeñas cantidades de ácido láctico tras la muerte del pez (Gram y Huss, 1996).

Por otro lado, la naturaleza poiquiloterma de los peces permite el crecimiento de bacterias con un amplio rango de temperatura. En los peces de aguas templadas la microflora de la piel y las agallas está dominada por aerobios psicrotolerantes Gram negativos, como *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Photobacterium*, *Vibrio*, *Psychrobacter* y *Aeromonas*. En el tracto digestivo se encuentran bacterias aero-anaerobias o anaerobias, como *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, y bacterias ácido lácticas (*Lactococcus*, *Carnobacterium piscicola*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, ...) (Leroi, 2011).

El músculo de un pescado recién capturado es estéril, debido a que el sistema inmunológico del pez vivo previene el crecimiento de bacterias. Pero cuando el pez muere, su sistema inmunológico se colapsa y las bacterias proliferan libremente. En la superficie de la piel las bacterias colonizan en una amplia extensión la base de las escamas y durante el almacenamiento invaden el músculo penetrando entre las fibras musculares (Huss, 1995). Entran en la cavidad corporal y el vientre a través de los intestinos, y penetran en el tejido de las agallas y el riñón a través del sistema vascular (Fraser y Sumar, 1998, parte II).

Es importante diferenciar entre “flora del deterioro” y “bacterias específicas del deterioro”, dado que el primer término describe el total de bacterias que simplemente están presentes en el pescado cuando éste está deteriorado, y el segundo se refiere únicamente a las bacterias que

producen olores y sabores desagradables asociados con el deterioro (Daalgard, 1995). En el pescado recién procesado, las bacterias causantes del deterioro son una muy pequeña fracción de la microflora (Figura 6). Pero tras 2-3 semanas de almacenamiento la flora del pescado está constituida casi exclusivamente por estas bacterias, cuyos metabolitos son los responsables del deterioro. Las bacterias típicas del deterioro del pescado almacenado aeróbicamente en hielo son *Shewanella putrefaciens* y *Pseudomonas spp* (Huss, 1995; Gram y Huss, 1996; Leisner y Gram, 1999). Cada producto pesquero posee sus propias bacterias del deterioro y es el recuento de éstas, y no el recuento total de microorganismos, lo que guarda relación con la vida útil del producto (Huss, 1995). Sin embargo, dada la dificultad para identificar y cuantificar estas bacterias en el pescado estropeado, y que en la fase final del almacenamiento el recuento total de bacterias está constituido principalmente por estas bacterias, la legislación existente se basa en el recuento total de bacterias y no en el de bacterias del deterioro, para establecer el límite de aceptabilidad para el consumo humano (ver apartado 4.2.3.).

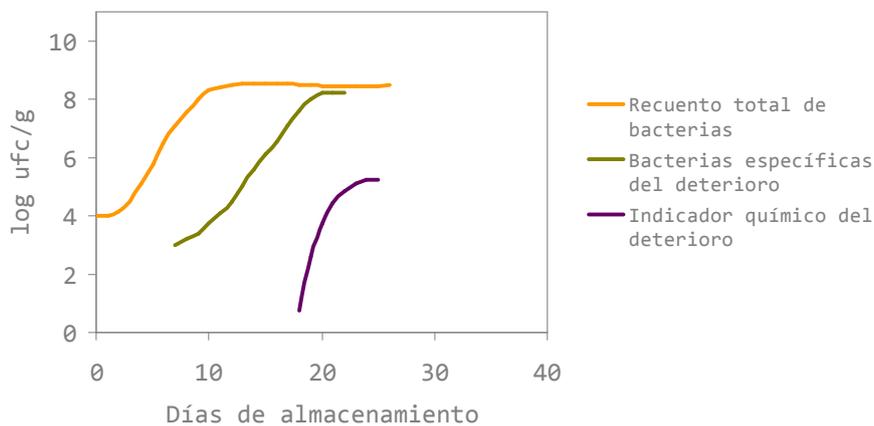


Figura 6: Modelo de los cambios en el recuento total de bacterias, en el recuento de bacterias específicas del deterioro y en los índices químicos del deterioro durante el almacenamiento frío de los productos pesqueros (Gram y Huss, 1996).

Los metabolitos de la actividad microbiana que contribuyen al deterioro del pescado se muestran en la Tabla 6. El crecimiento aeróbico inicial en pescado es dominado por bacterias que utilizan carbohidratos como sustrato y oxígeno como aceptor terminal de electrones, con la concomitante producción de CO_2 y H_2O . El metabolismo de estas bacterias provoca la formación de nichos microaerofílicos o anaeróbicos, que pueden inducir a un metabolismo facultativo o anaerobio. Es típico de muchas bacterias específicas del deterioro el uso de óxido

de trimetilamina (OTMA) como aceptor terminal de electrones en la respiración anaeróbica. Este compuesto constituye una parte importante de la fracción NPN y está presente en todos los peces marinos (Hebard y col., 1982, en Gram y Huss, 1996). El producto de la reacción, la trimetilamina (TMA), es el responsable principal del típico olor como a amoníaco del pescado estropeado (Gram y Daalgard, 2002). Aunque, éste no es necesariamente un compuesto característico durante el deterioro del pescado, ya que, por ejemplo *Pseudomonas spp* no lo producen (Gram, 1990, en Huss, 1995).

Tabla 6: Compuestos químicos producidos por la actividad microbiana a partir de los distintos sustratos presentes en el pescado.

Carbohidratos	
Ribosa, glucosa, lactato → CO ₂ +H ₂ O (respiración aerobia)	<i>Acinetobacter, Micrococcus, Moraxella, Pseudomonas</i>
Ribosa, glucosa, lactato → Metanol+CO ₂ +H ₂ O (respiración anaerobia)	<i>S.putrefaciens, P.phosphoreum, Aeromonas, Vibrio</i>
Ribosa, glucosa, lactato → Ácido acético y láctico (fermentación)	Bacterias ácido lácticas, <i>Enterobacteriaceae, B.thermosphacta</i>
Nucleótidos	
IMP, inosina → Hipoxantina	<i>Pseudomonas spp., S.putrefaciens, P.phosphoreum</i>
NPN	
OTMA → TMA	<i>S.putrefaciens, Alteromonas, Aeromonas, P.phosphoreum, Enterobacteriaceae, Vibrio</i>
Urea → Amoníaco	
Aminoácidos	
→ Amoníaco (desaminación)	
→ Aminas biógenas (descarboxilación): Histidina → histamina Tirosina → tiramina, cadaverina Arginina → ornitina, putrecina	<i>Acinetobacter, Micrococcus, Moraxella, Enterobacter, Klebsiella, Proteus</i>
Cisteína → ácido sulfúrico (H ₂ S)	<i>S.putrefaciens, Vibrionaceae</i>
Metionina → metilmercaptano (CH ₃ SH) dimetilsulfuro ((CH ₃) ₂ S)	<i>P.phosphoreum</i> <i>Pseudomonas</i> (no H ₂ S)
Glicina, leucina, serina → ésteres, aldehídos, cetonas	<i>Pseudomonas</i>

Además de la TMA, las bacterias específicas del deterioro de los productos pesqueros producen otra serie de metabolitos que contribuyen al deterioro del pescado (Tabla 6). Muchas de estas bacterias producen uno o varios sulfuros volátiles a partir de aminoácidos que contienen azufre, provocando el característico olor a podrido. *Pseudomonas spp.* producen además, aldehídos, cetonas y ésteres, siendo estos últimos responsables de olores afrutados.

La mayoría de bacterias del deterioro producen también aminas biógenas, como resultado de la descarboxilación directa de aminoácidos, en respuesta al pH ácido, presumiblemente para elevarlo (Huss, 1995).

La actividad bacteriana contribuye también a la acumulación en el músculo de hipoxantina y amoníaco. Estos compuestos son también producidos por la degradación autolítica de inosina y AMP, respectivamente (Figura 4, apartado 4.1.1.). Pero además se producen por degradación bacteriana de IMP e inosina, la hipoxantina, y de urea, el amoníaco (Tabla 6).

Aunque algunas bacterias típicas del deterioro del pescado, como *S.putrefaciens* y *Pseudomonas spp.*, puedan exhibir cierta actividad proteolítica, ésta parece no tener una importante contribución en los cambios producidos en la fracción proteica durante deterioro del pescado fresco. Se sabe también que *Pseudomonas spp.* es capaz de producir lipasas capaces de liberar ácidos grasos a partir de la hidrólisis de lípidos, pero la significación de esta habilidad en los productos pesqueros es desconocida (Leisner y Gram, 1999).

1.4.2. Métodos de medida de la calidad del pescado

1.4.2.1. Parámetros físicos

pH

El pH inicial del músculo *post mortem* es cercano a 7, posteriormente desciende a valores de 6.5 o inferiores, por la acumulación de ácido láctico. Después de algunos días el pH incrementa debido a la formación de compuestos básicos que se generan por los procesos autolíticos (fosfato inorgánico y amoníaco) y/o por la actividad de los microorganismos deteriorantes (principalmente amonio y aminas) (Connell, 1995; Huss, 1995). La determinación de este parámetro se realiza con un pH-metro, colocando los electrodos directamente dentro de la carne del pez o en una suspensión de músculo en agua destilada (Figura 7).

En principio las medidas del pH pueden proporcionar información valiosa acerca de la condición de la carne del pescado. Sin embargo, resulta difícil relacionar un determinado valor con el grado de frescura, ya que el pH que se alcanza en el músculo *post mortem* depende por un lado, de las reservas de glucógeno en el momento del sacrificio, algo que es muy variable y que depende a su vez de otros factores como el estado nutricional del pez, y, por otro lado, del método de sacrificio. Algunos autores sugieren el uso de este parámetro más como una guía de calidad que como un índice propiamente dicho (Ruíz-Casillas y Moral, 2001).



Figura 7: Medidas de pH del músculo del pescado colocando los electrodos directamente dentro de la carne del pez (izquierda) y en una suspensión de músculo en agua destilada (derecha).

Capacidad de Retención de Agua (CRA)

El concepto de la capacidad de retención de agua y los métodos empleados para su medición comenzó a trabajarse con productos cárnicos, y por extensión se han aplicado posteriormente en pescado. Las variaciones que se producen durante el almacenamiento y procesado de un producto son determinadas por el grado en que una parte de la masa de agua de la carne queda inmovilizada dentro de la microestructura del músculo intacto o desmenuzado (Hamm, 1972). Según parece existe una transición de agua fuertemente inmovilizada dentro del tejido muscular al agua suelta. El agua suelta puede ser desplazada fácilmente por una muy baja presión. El agua inmovilizada es difícilmente liberada, y su medida depende del método utilizado (Hamm, 1986). Este autor propuso cuatro conceptos para definir los distintos fenómenos de CRA y sus medidas:

- Pérdida por goteo (*Drip loss*): formación de exudado de la carne (excepto el formado por descongelación) sin aplicar fuerzas externas.
- Pérdida por descongelación (*Thawing loss*): formación de exudado de la carne después de congelar y descongelar sin aplicar fuerzas externas.
- Pérdida por cocción (*Cooking loss*): pérdida de líquido después de calentar la carne tanto si se aplica o no una fuerza externa.
- Líquido exprimido (*Expressible juice*): pérdida de líquido de la carne no calentada, incluso después de congelar y descongelar, durante la aplicación de fuerzas externas como presión (p.e. método de prensado con papel de filtro), centrifugación, o succión.

De acuerdo a estos métodos, la CRA se define como la habilidad de la carne para mantener por sí sola o durante la aplicación de una fuerza el contenido de agua.

Textura

En la industria pesquera la textura es comúnmente evaluada mediante la prueba descrita por Jellinek (1985). Éste consiste en presionar con el dedo índice el cuerpo o el filete del pescado, determinando así la firmeza, en función de la dureza del producto, y la elasticidad, según el tiempo que permanece la marca de la impresión en la muestra.

Mediciones más completas de textura pueden realizarse con un texturómetro. Las principales técnicas se basan en principios reológicos que consisten en la fuerza de corte, punción y compresión. Los ensayos de compresión consisten en deformar la muestra (Figura 8), de manera que, la extensión de la deformación y la resistencia ofrecida por la muestra se utiliza como una medida de la textura del alimento. Este análisis puede incluir una o dos compresiones. La primera compresión es necesaria para determinar la dureza (o la firmeza) y fracturabilidad de la muestra, y con dos ciclos de compresión consecutivos se puede determinar otra serie de parámetros, obteniendo así un perfil de textura. El Análisis de Perfil de Textura (TPA, del inglés "Texture Profile Analysis") se basa en el reconocimiento de la textura como un atributo multi-paramétrico. Consiste en comprimir una muestra en un movimiento de vaivén que, mediante la extracción de una curva fuerza-tiempo (Figura 9), permite calcular toda una serie de parámetros (Tabla 7). Este método fue iniciado por Szczesniak (1963), quién definió los parámetros texturales utilizados por primera vez en este método de análisis, y, posteriormente, Bourne (1978) desarrolló una adaptación para llevar a cabo el TPA en muestras de tamaño estándar mediante los dos ciclos de compresión.



Figura 8: Medida de textura mediante compresión.

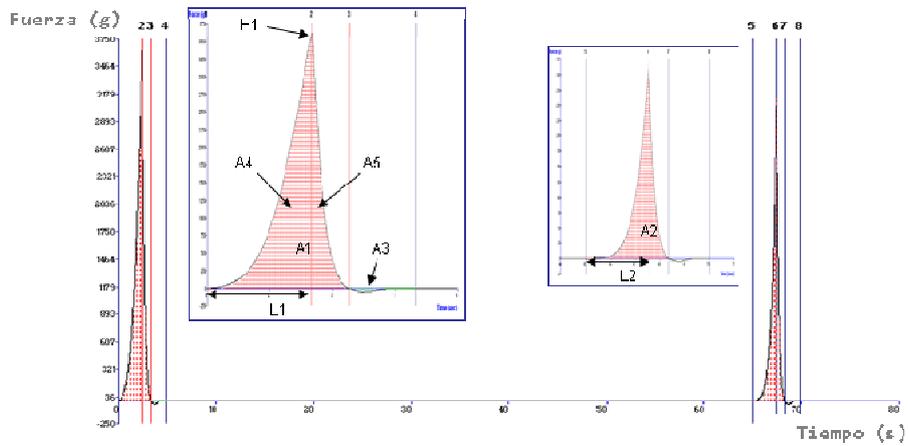


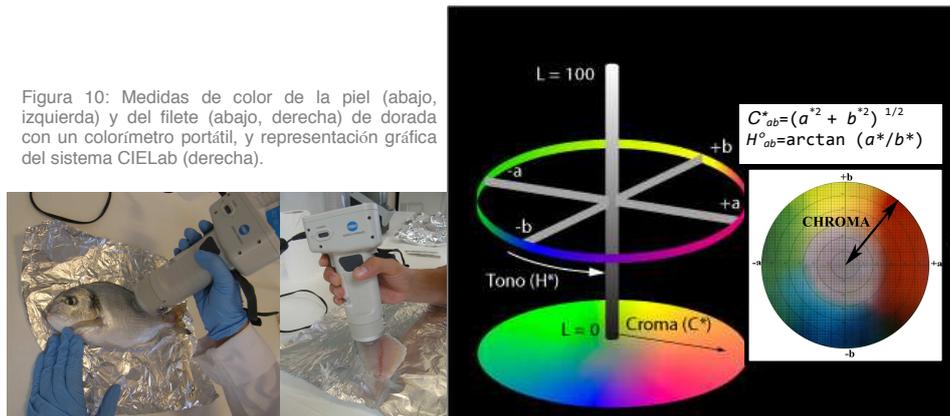
Figura 9: Representación gráfica de una curva fuerza-tiempo obtenida del Análisis del Perfil de Textura (TPA).

Tabla 7: Parámetros texturales estimados con el Análisis del Perfil de Textura (TPA).	
Dureza (H1)	Fuerza máxima durante el primer ciclo de compresión. A menudo se sustituye por el término firmeza.
Adherencia (A3)	Representa el trabajo necesario para superar las fuerzas de atracción entre la superficie de un alimento y la superficie de otros materiales con los que el alimento entra en contacto, es decir, la fuerza total necesaria para tirar del émbolo de compresión y alejarlo de la muestra.
Elasticidad (L2/L1)	Relacionada con la altura que el alimento recupera durante el tiempo que transcurre entre el final de la primera compresión y el inicio de la segunda.
Cohesividad (A1/A2)	Velocidad a la cual el material se desintegra bajo la acción mecánica. La resistencia a la tracción es una manifestación de la cohesión.
Gomosidad: dureza*cohesividad (H1*(A1/A2))	Característica de los alimentos semisólidos con un bajo grado de dureza y un alto grado de cohesión.
Masticabilidad: elasticidad*gomosidad ((L2/L1)*H1*(A1/A2))	Energía requerida para masticar un alimento sólido. Difícil de medir con precisión, debido a que consiste en la compresión, corte, perforación, trituración, y lagrimeo, junto con una adecuada lubricación por la saliva a la temperatura corporal.
Resistencia a la deformación (A5/A4)	Medida de cómo la muestra se recupera de la deformación tanto en términos de velocidad como de fuerza.

Color

Las medidas de color, tanto de la piel como del filete, pueden realizarse con un colorímetro portátil (Figura 10), de forma que, mediante el sistema recomendado por la International Commission on Illumination (CIE, 1978), este parámetro puede ser cuantificado. Según este sistema, llamado CIELab, el color es una característica tridimensional de apariencia definida por el atributo L^* y dos parámetros de cromaticidad a^* y b^* (Figura 11). El valor L^* mide la luminosidad y varía de 100, blanco perfecto, a 0, para el negro. Los parámetros cromáticos miden las escalas de color del rojo al verde (a^*), y del amarillo al azul (b^*). A partir de los parámetros cromáticos se calculan los valores Chroma (C^*_{ab}) y Hue (H°_{ab}). El Chroma se refiere a la saturación de un color y es una medida de cuánto la luz gris o blanco, según sea el valor de L^* , se mezcla con el color. Se representa como la longitud del vector cuyo origen es el eje de las coordenadas a^* y b^* . El Hue viene determinado por la longitud de onda dominante. Es representado por el ángulo formado por el vector del Chroma en el plano a^*-b^* , de forma que, incrementa en el sentido de rotación de las agujas del reloj alrededor del eje a^*-b^* .

Figura 10: Medidas de color de la piel (abajo, izquierda) y del filete (abajo, derecha) de dorada con un colorímetro portátil, y representación gráfica del sistema CIELab (derecha).



1.4.2.2. Parámetros químicos

Productos de la degradación del ATP

El contenido en nucleótidos que resultan de la hidrólisis del ATP es utilizado como un indicador de frescura del pescado, siendo el valor K (Figura 12) el índice más ampliamente utilizado. Este índice proporciona una puntuación de frescura relativa basada en las concentraciones de todos

los productos de la degradación del ATP, de modo que cuanto más alto es el valor K menor es el grado de frescura (Saito y col., 1959, en Huss, 1995).

$$\text{Valor K} = \frac{\text{Ino} + \text{Hx}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP} + \text{Ino} + \text{Hx}} \times 100$$

Figura 11: Fórmula del valor K (Ino: inosina; Hx: Hipoxantina).

Productos de la fracción lipídica

Los productos primarios de la oxidación (hidroperóxidos) pueden ser detectados por el ampliamente usado valor de peróxidos (VP), mediante yodometría y colorimetría. Pero este método está limitado por la naturaleza transitoria de los peróxidos. Los hidroperóxidos se descomponen con el tiempo para formar compuestos carbonilo, de forma que un valor bajo durante un cierto momento del almacenamiento puede indicar tanto una fase temprana de autooxidación como una fase tardía (Kanner y Rosenthal, 1992).

En cuanto a los productos secundarios, algunos aldehídos pueden ser determinados como sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS, del inglés "Thiobarbituric Acid Reactive Substances"). De estas sustancias el malondialdehído (MDA) es el compuesto mayoritario. Una molécula de MDA reacciona con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) dando un cromógeno de color rosa que absorbe a 532 nm, permitiendo su detección mediante espectrofotometría (Figura 13).

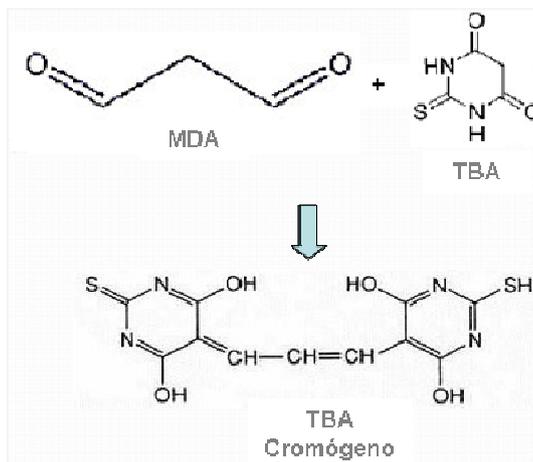


Figura 12: Esquema de la reacción del malondilaldehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA) (izquierda) y fotografía del producto cromógeno resultado de la reacción (derecha, abajo).



Productos del metabolismo microbiano

Algunos de los metabolitos de la actividad microbiana pueden ser usados como índices de calidad. El análisis químico de estos compuestos es más rápido que los métodos microbiológicos, sin embargo, algunos no son detectados hasta un estado cercano al rechazo del producto (Gram y Dalgaard, 2002), por lo que más que índices de frescura deben ser considerados como índices de deterioro.

La determinación del nitrógeno básico volátil total (NBVT) es uno de los métodos más ampliamente utilizados. La mayoría de procedimientos empleados dependen de la destilación de aminas volátiles y de la microdifusión de un extracto (Conway, 1962, en Huss, 1995). A pesar de ser un análisis relativamente simple de realizar, generalmente refleja sólo los últimos estadios del deterioro avanzado (Huss, 1995; Gram y Dalgaard, 2002). Incluye la medición de trimetilamina (TMA), dimetilamina (DMA), amoníaco y otros compuestos nitrogenados básicos volátiles asociados con el deterioro de los productos pesqueros. Las concentraciones de TMA, DMA y amoníaco pueden ser también determinados específicamente por separado. El TMA es el compuesto mayoritario de la fracción NBVT. En pescado fresco este compuesto se encuentra en muy pequeñas cantidades y se va acumulando durante el deterioro como resultado de la reducción del óxido de trimetilamina (OTMA). La medida en que se produce esta reacción presente gran variabilidad entre especies por las diferencias en el contenido inicial de OTMA (Rodríguez y col., 1997), y depende también del crecimiento de la flora deteriorante.

La determinación de las aminas biógenas, es otro índice bastante utilizado en la industria, aunque éste se utiliza más bien como un índice de calidad higiénico-sanitario del pescado (Halasz y col., 1994).

1.4.2.3. Parámetros microbiológicos

El objetivo del análisis microbiológico es proporcionar información acerca de la calidad higiénica del pescado y de la posible presencia de microorganismos de importancia para la salud (Huss, 1995). La evaluación de la calidad microbiológica que debe realizarse para productos pesqueros es la misma para los de aguas frías y templadas, pero será distinta dependiendo por un lado del tipo de producto, si se trata de peces o moluscos, y por otro lado del procesado del producto (fresco, enlatado, atmósfera modificada, al vacío, congelado, ahumado, o marinado). Para el análisis microbiológico rutinario del pescado fresco se emplean habitualmente métodos basados en el recuento del número total de microorganismos presentes

en el pescado y los que se basan en un grupo concreto (Tabla 8). La presencia de bacterias patógenas se determina de forma independiente, puesto que no existe una correlación con estos recuentos.

Tabla 8: Parámetros y valores estándar para el ensayo de calidad microbiológica de productos frescos refrigerados y congelados procedentes de la pesca y de la acuicultura.

Parámetros	Recuentos límites aptos para el consumo humano
Recuento Total de Mesófilos	10^6 ufc/g (O. 2/8/1991, B.O.E 15/8/91) 10^7 ufc/g (ICMSF, 1986)
Recuento Total de Psicrófilos	—
Enterobacterias	10^3 ufc/g (O. 2/8/1991, B.O.E 15/8/91)
Bacterias Ácido Lácticas	—
Salmonella y Shigella	Ausencia/25g (O. 2/8/1991, B.O.E 15/8/91)

O. 2/8/1991, B.O.E 15/8/91: Orden de 2/8/1991, publicada en el Boletín Oficial del Estado el 15/8/91.
ICMSF (1986): normativa de la International Commission on Microbiological Specifications for Foods.

El Recuento Total representa el número total de bacterias capaces de formar colonias visibles en un medio de cultivo a una temperatura dada. Este parámetro es sinónimo de recuento total de aerobios (RTA, en inglés TAC, total aerobic count) y de recuento estándar en placa (REP, en inglés SPC, standard plate count). Cuando este recuento se realiza después de un muestreo sistemático, con un conocimiento de la manipulación del pescado antes del muestreo (condiciones de temperatura, manipulación, etc), puede proporcionar una medida comparativa del grado de contaminación bacteriana y de las condiciones higiénicas aplicadas (Huss, 1995). El sustrato más comúnmente usado para estos recuentos es el agar, por lo que también suelen denominarse “plate count agar” (PCA). Según las condiciones de la incubación el recuento total puede ser de mesófilas (a 30°C, durante 72 h) o de psicrófilas (15°C, durante 5 días). El recuento total de mesófilos determina la cantidad de microorganismos viables (TVC, total viable count), y se utiliza como índice de la carga microbiológica del producto, cuyos límites para el consumo humano están regulados tanto a nivel nacional (O. 2/8/1991, B.O.E 15/8/91) como internacional (ICMSF, 1986) (Tabla 8). La normativa española establece también un valor máximo de Enterobacterias, dado que éstas son un indicativo de las condiciones higiénicas del medio donde el pez es capturado o cultivado y de las prácticas de manejo y procesado del producto (Kostaki y col., 2009).

Según lo comentado anteriormente, el número de bacterias específicas del deterioro está relacionado con la vida útil del producto (Figura 6, apartado 4.1.3.). Sin embargo, no es fácil determinar cuál de las bacterias aisladas del pescado en mal estado son las causantes de este deterioro. Según se describe en Gram y Huss (1996), en primer lugar deben estudiarse los

cambios químicos, microbiológicos y sensoriales que tienen lugar durante el almacenamiento del producto, incluyendo una determinación del nivel de un compuesto químico dado que se correlaciona con el deterioro (Indicador químico de deterioro). En segundo lugar, las bacterias son aisladas en el momento de rechazo sensorial. Cultivos puros y mixtos de estas bacterias se siembran en un sustrato de pescado estéril para valorar el posible deterioro, por ejemplo, la habilidad de la o las bacterias para producir cambios sensoriales y químicos típicos del deterioro. Finalmente, se selecciona una cepa y se evalúa su cinética de crecimiento y la producción cualitativa y cuantitativa de malos olores en el producto de interés. Algunas bacterias pueden producir compuestos químicos asociados con el deterioro, pero no son capaces de hacerlo en cantidades significativas en las condiciones normales que prevalecen en un producto y por tanto, no son bacterias específicas del deterioro. En el pescado almacenado aeróbicamente en hielo, se requieren recuentos de $10^8 - 10^9$ ufc/g para provocar deterioro.

1.4.2.4. Parámetros sensoriales

Evaluación en pescado fresco

La evaluación sensorial en la industria pesquera ha sido siempre esencial a la hora de determinar la frescura de los productos, siendo la apariencia externa, el olor y el color características muy importantes en el control de calidad (Olafsdottir y col., 2004). En el caso del pescado de origen extractivo es difícil controlar con cierto grado de repetibilidad la calidad inicial del producto, pero con el cultivo de peces la variación de la calidad del pescado fresco queda en gran medida reducida.

El primer método detallado para el análisis sensorial del pescado crudo fue el esquema Torry, desarrollado en Escocia por "Torry Research Station" (Shewan y col., 1953, en Hyldig y col., 2007), cuya idea fundamentalmente era que cada parámetro de calidad valorado fuera independiente del resto. Posteriormente, el esquema fue modificado de forma que se asignaba una puntuación a un amplio rango de características. Actualmente, para el pescado entero, la regulación de la Comunidad Europea requiere el sistema de clasificación de calidad de la UE, desarrollado por Howgate y col. (1992). Este esquema consiste en tres grados de calidad: E (extra), máxima calidad; A; y B, por debajo del cuál el producto no es apto para el consumo humano. El inconveniente de este método es que se basa en parámetros generales, y no considera las diferencias entre especies.

Algunas iniciativas han puesto en práctica un nuevo método llamado Método del Índice de Calidad (QIM, por la nomenclatura inglesa de Quality Index Method). Este método fue

originalmente desarrollado por “Tasmanian Food Research Unit” (TFRU) (Bremner, 1985, en Hyldig y col., 2007) y ha sido estandarizado ya para diversas especies (Jonsdottir, 1992, en Huss, 1995; Huidobro y col., 2000; Martinsdóttir y col., 2001, 2004). Consiste en la valoración de los parámetros sensoriales significativos del pescado crudo mediante un sistema de puntuación de grados deméritos. Las puntuaciones asignadas a cada característica sensorial se suman para obtener un único valor que es el índice de calidad, de forma que cuanto mayor es este índice, mayor es el grado de deterioro. Se establece por tanto una relación lineal entre la calidad sensorial y el tiempo de almacenamiento, que permite predecir la vida útil del producto, fijando una puntuación máxima cuando el pescado es rechazado por evaluación sensorial o tras determinarse el tiempo máximo de almacenamiento.

Evaluación en pescado cocinado

El análisis sensorial es el examen de las propiedades organolépticas de un producto realizable con los sentidos (UNE 87-001-94). En concreto en el control de calidad de un producto pueden emplearse pruebas discriminativas y/o descriptivas según el objetivo que se persiga. En ambos tipos de pruebas es necesario disponer de un panel de catadores entrenado según el objetivo del análisis y el producto que se vaya a evaluar (Figura 14). El análisis discriminativo sirve para detectar si hay o no diferencias entre dos o más muestras. Son normalmente utilizados para determinar el efecto en la calidad del producto de algún tratamiento incorporado en la elaboración o almacenamiento de las materias primas. En el caso del análisis descriptivo, se pretende identificar cuáles son las diferencias y con que intensidad se producen (Ibáñez y Barcina, 2001), y pueden emplearse para valorar un solo atributo de textura, sabor o apariencia, o para realizar una descripción completa del producto. Cuando se evalúa más de un atributo, se elabora un perfil sensorial del producto mediante la selección de los descriptores que serán posteriormente cuantificados. Este tipo de análisis es conocido como Análisis Descriptivo Cuantitativo (QDA, del inglés “Quantitative Descriptive Analysis”).



Figura 13: Análisis sensorial de pescado realizado por un panel de catadores entrenado específicamente para este producto.

El análisis sensorial de pescado puede ser de gran utilidad para evaluar las posibles diferencias entre pescados de origen extractivo y cultivado (Grigorakis y col., 2003a; Olsson y col., 2003c) o los procedentes de distintos sistemas de cultivo (Orban y col., 1996), así como para determinar el efecto de incluir nuevos ingredientes en la dietas (Regost y col., 2003; Izquierdo y col., 2005; Torstensen y col., 2005; Turchini y col., 2007) y de otros factores del cultivo como la temperatura o la estación del año en que son sacrificados (Olsson y col., 2003c; Ginés y col., 2004). También se puede utilizar para evaluar los cambios sensoriales que se producen durante el almacenamiento según el efecto del modo de conservación (González-Fandos y col., 2004; Jeyasekaran y col., 2004; Özogul y col., 2007; Özogul y col., 2008), del fileteado (Taliadourou y col., 2003; Chytiri y col., 2004; Paleologos y col., 2004), y del eviscerado (Tejada y Huidobro 2002; Papadopoulos y col., 2003; Paleologos y col., 2004).

1.5. Factores del cultivo que influyen sobre la calidad del pescado de crianza

La calidad del pescado depende en mayor medida de los factores *ante mortem* que la carne de los animales de sangre caliente, debido en parte a que los peces son más sensibles al entorno que los animales domésticos y las aves (Suárez, 2006). Estos factores pueden ser intrínsecos (como la especie, el tamaño, y la maduración sexual) y extrínsecos (como la fuente de nutrientes, la estación del año, la salinidad del agua, la temperatura, etc.), y pueden influir en parámetros de calidad como la composición química, la textura o el color, entre otros (Børresen, 1992). En este sentido, los productos procedentes de la acuicultura presentan una ventaja frente a los de pesca extractiva, ya que se producen bajo condiciones más controladas.

Los peces de vida libre están sujetos a considerables cambios tanto en su medio ambiente como en la disponibilidad de alimento. Factores ambientales como la profundidad del agua, la iluminación, el pH, las corrientes, salinidad, oxigenación, temperatura, contaminantes orgánicos y densidad de población dependerán en gran medida de la zona donde se pesque. Mientras que el medio de los peces de cultivo, especialmente los de cultivos intensivos, en que los peces crecen en ambientes confinados o protegidos, las condiciones ambientales son más estables (Mohr, 1987).

En la acuicultura intensiva los peces cuentan con un suministro constante de alimento rico en nutrientes que les permite depositar grandes reservas de lípidos (Orban y col., 1996; Orban y col., 2000; Flos y col., 2002; Grigorakis y col., 2002; Mnari y col., 2007). En los peces salvajes, las fluctuaciones estacionales en la disponibilidad y composición de alimento afectan a la composición proximal del músculo (Olsson y col., 2003c; Gökçe y col., 2004; Ozyurt y col., 2005; Ozyurt y Polat, 2006). En particular, los cambios estacionales en el contenido de lípidos

dependen de la abundancia de alimento (Méndez y González, 1997; Craig y col., 2000). Éstos alcanzan un pico máximo al final del verano debido a la mayor cantidad de alimento, y durante el invierno, que el pez se puede ver sometido a periodos de ayuno prolongados, se mantiene a expensas de las reservas de grasa almacenadas (Suárez, 2006).

Cambios cíclicos en los contenidos de grasa y energía se producen también en especies que en su hábitat natural dejan de alimentarse durante periodos de hibernación y/o migraciones para el desove (Slotte, 1999; Hamre y col., 2003), o en el caso de salmónidos que dejan de alimentarse durante la maduración sexual (Shearer, 1994; Bell y col., 1998). En acuicultura, aunque los peces sufran variaciones estacionales en la ingesta, el porcentaje de grasa es más constante debido a la continua alimentación (Grigorakis y col., 2002).

Otros aspectos como la edad y la talla, así como la genética, provocan una gran variabilidad en los peces de vida libre. En este sentido los peces de cultivo presentan una homogeneidad mucho mayor, ya que todos los animales de un lote provienen de los mismos reproductores y de la misma generación de descendientes. Esta capacidad de control de la actividad acuícola sobre la reproducción y los stocks de animales, así como la posibilidad de decidir cuándo y cómo se lleva a cabo el despesque, permite el suministro de estos productos de forma más o menos continua (Paterson y col., 1997).

La composición de la dieta tiene también un efecto determinante en la calidad del pescado. En pescados de acuicultura, durante el proceso de engorde, a diferencia de los de pesca, cuya dieta depende de los nutrientes disponibles, la composición de la dieta es siempre la misma. Mediante la alimentación con dietas artificiales, además de la tasa de crecimiento de los peces, se puede controlar la composición del filete, en particular su contenido de lípidos, que puede ser modificado tanto cuantitativamente como cualitativamente. También el estado nutricional del pez puede afectar a su contenido de agua y a la retención de agua del músculo, y como resultado, a su textura y otras características sensoriales (Mohr, 1987).

1.5.1. Características de la producción de dorada

1.5.1.1. Biología y distribución de la especie

La dorada es una especie común en el mar Mediterráneo, pero se distribuye también desde las costas del Atlántico Oriental hasta el Cantábrico y el Sur de las Islas Británicas. Es euriterma y eurihalina. Aunque es bastante sensible a las bajas temperaturas, dejando de alimentarse si éstas bajan de 12-13 °C, puede soportar temperaturas menores, siendo su mínimo letal del

orden de 5-7 °C. Aguanta temperaturas bastante elevadas, presentando crecimientos rápidos a 25-26 °C y soportando temperaturas de hasta 32-33 °C. En cuanto a su carácter eurihalino, es capaz de vivir en hábitats con un amplio rango de salinidad, entre 3-70 ‰, como estuarios y lagunas. Un ejemplo cercano es el Mar Menor de Murcia, donde la dorada se encuentra en gran abundancia (Ortega, 2008).

Es una especie hermafrodita proteándrica. Madura primero como macho, en el primer o segundo año de vida, aunque el primer año suelen ser inmaduros. A partir del segundo o tercer año aproximadamente un 80% de la población revierte a hembra, y el resto permanece como macho. La época de puesta puede abarcar los meses de octubre a diciembre, en zonas cálidas, o de diciembre a febrero, en zonas frías, con varias puestas secuenciadas durante este periodo (Lozano, 2005).

La dieta natural de la dorada es preferentemente carnívora, en especial moluscos (bivalvos y gasterópodos), crustáceos y peces pequeños. En general se le considera una especie de crecimiento rápido en la naturaleza, alcanzando en el segundo año los 300g y en el tercero los 600g. Su tamaño medio es de 1 kg de peso y 40 cm de longitud, pero puede llegar a alcanzar tamaños de hasta 17 kg y 70 cm, y edades de más de 10 años (Fernández y Rodríguez, 2002).

1.5.1.2. Engorde de dorada en España

El cultivo de dorada en España es de las principales actividades acuícolas, produciéndose en todo el Mediterráneo y en las Islas Canarias. El pre-engorde y el engorde de dorada comenzaron en esteros de modo extensivo y semi-extensivo, pero paulatinamente los cultivos fueron intensificándose en tanques en tierra y en jaulas ubicadas en zonas relativamente protegidas. A finales de los años 90 comenzó el desarrollo de las jaulas en mar abierto, y a partir de entonces se produjo un incremento de la producción en jaulas y un estancamiento de la producción en tierra, de forma que en 2006 la producción en jaulas era aproximadamente el 85% del total (Ortega, 2008).

El engorde se divide en dos fases, la de pre-engorde (de 1-2 hasta 15-50g) y la de engorde (de 15-20g hasta la talla comercial). La talla comercial es normalmente de 350-400g. El tiempo que tardan en alcanzar este peso, desde que comienza la fase de engorde propiamente dicha, es de 13-16 meses, dependiendo de la época de inicio del engorde, aunque en zonas frías puede llegar a los 18 meses. En las Islas Canarias sin embargo, el engorde se realiza en 11-12 meses. En el Mediterráneo español, el crecimiento es menor durante los meses de diciembre a

abril, debido a que la temperatura del agua alcanza valores inferiores a 15-16°C (Figura 15). Según lo comentado anteriormente, la temperatura óptima para el engorde es de 22-26 °C, y por debajo de 13-14 °C la dorada deja prácticamente de alimentarse y el crecimiento puede llegar a detenerse. En las Islas Canarias no se produce este parón invernal, ya que la temperatura del agua no desciende de 17 °C (Ortega, 2008).

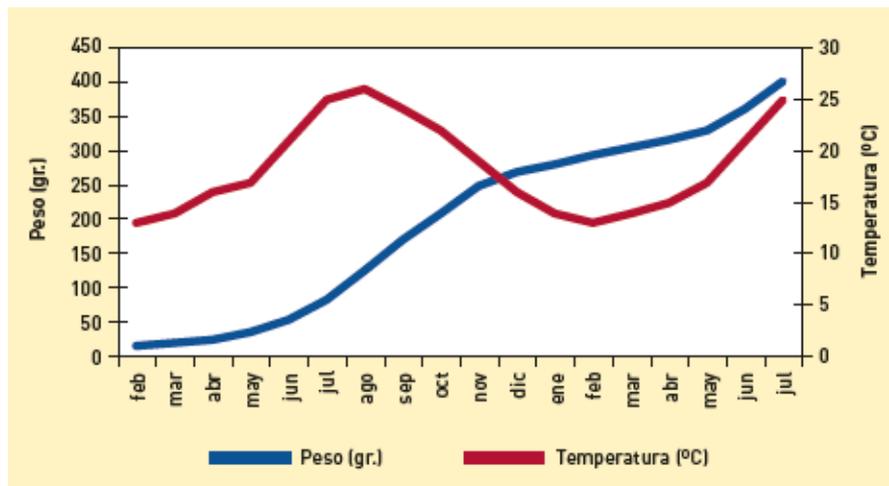


Figura 14: Curvas de crecimiento de dorada y de la variación de temperatura durante la fase de engorde en el Mediterráneo español (Ortega, 2008).

1.5.1.3. Comercialización de la dorada de cultivo

La dorada es una especie muy cotizada en acuicultura, no sólo por su calidad y porque adquiere precios aceptables en el mercado, sino también por aspectos económicos importantes en su producción, como su fácil reproducción en cautividad y adaptación al manejo, así como a su relativamente rápido crecimiento. Su mercado en España es principalmente a nivel nacional. Éste está enfocado a la comercialización del producto fresco, cuya porción comestible en animales de tamaño comercial supone un 34-48% del peso total (Grigorakis y Alexis, 2005; Testi y col., 2006). Frente a la tendencia creciente en la sustitución del consumo del producto fresco por el de transformados, especialmente de filetes, actualmente algunas empresas ya se están planteando la incorporación de nuevos productos como el filete e incluso el enlatado.

1.5.2. Influencia de las condiciones del cultivo sobre la calidad

Como ya hemos comentado, existen numerosos factores que pueden influir en la calidad del pescado. En los peces de cultivo, aspectos fisiológicos (como la edad, la tasa de crecimiento, o la maduración sexual), ambientales (temperatura, salinidad, presión, flujo del agua, etc) y dietéticos (frecuencia alimentaria, ayuno, sobrealimentación, composición de la dieta) pueden influir en la calidad del producto final (Haard, 1992). En este sentido, la gestión de los procesos de producción depende en gran medida del tipo de cultivo.

En cultivos intensivos el nivel de control depende principalmente de la intensidad del sistema en términos de densidad de biomasa, tipo de instalación, estrategias de alimentación, y control de la calidad del agua (Flos y col., 2002). Desde un punto de vista ambiental, el cultivo en los tanques ofrece la posibilidad de un mayor control en la producción que otro tipo de instalaciones, como los estanques en tierra o las jaulas en mar abierto. En el cultivo en tanques, la calidad del agua, el régimen de luz o la temperatura pueden ser estrictamente controlados para conseguir mayores tasas de crecimiento y/o mantener stocks de altas densidades (Paterson y col, 1997). Según Flos y col. (2002), doradas cultivadas en tanques alcanzaron un mayor tamaño en menos tiempo, comparado con las cultivadas en estanques, debido al crecimiento a una temperatura constante. En instalaciones en el mar, al igual que en los estanques en tierra, estos parámetros no pueden ser directamente controlados.

Tanto en tanques como en jaulas la densidad del cultivo es de gran importancia, puesto que de este parámetro puede depender el bienestar de los animales. En general, los efectos adversos de las altas densidades en el cultivo están relacionados con el deterioro de la calidad del agua y /o alteraciones en el comportamiento (por ejemplo, competencia por el espacio y la comida, comportamientos agresivos, y establecimiento de jerarquías), así como con la imposición de condiciones de estrés crónico (Ashley, 2007). Una reducción en el crecimiento y la conversión de alimento durante condiciones de estrés crónico se han atribuido a un cambio en el metabolismo, basado en la suposición de que afrontar el estrés aumenta la demanda total de energía del pez, que deja entonces de estar disponible para el crecimiento (Wendelaar Bonga, 1997). Cualquier factor estresante que provoque alteraciones metabólicas en el pez, puede a su vez afectar a la calidad *post mortem* del pescado. Según Flos y col. (2002), el estrés *ante mortem* producido por una elevada densidad del cultivo podría conducir a una cantidad inferior de las reservas de glucógeno en el momento del sacrificio, resultando en valores *post mortem* de pH más elevados. Estos mismos autores observaron además, un color más rojizo de las agallas, mayor decoloración y menor brillo de piel, y menor intensidad de olor a pescado fresco en doradas de cultivo super-intensivo, que atribuyeron al menor nivel de oxígeno y al mayor nivel de residuos de nitrógeno.

1.5.2.1. Prácticas de manejo previas al sacrificio

Además del control del ambiente de la producción y la manipulación del alimento proporcionado, la acuicultura permite controlar la calidad del producto a través de la adopción de prácticas óptimas de manejo, el control de las condiciones antes del despesque, y la explotación adecuada de la granja durante el procesado y manejo *post mortem* del producto (Paterson y col., 1997). Si bien durante el ciclo productivo las condiciones del cultivo tienen una importante influencia en la calidad del producto, en el momento del despesque, tanto las condiciones durante los días previos como el manejo en el momento del sacrificio pueden afectar de forma decisiva sobre la calidad del pescado. La lucha de los peces durante el despesque no sólo les provoca daños físicos, sino que también puede acelerar los procesos bioquímicos *post mortem*, con implicaciones en el deterioro del pescado (Izquierdo-Pulido y col., 1992; Lowe y col., 1993).

La intensa actividad del músculo *ante mortem* incrementa el metabolismo anaerobio que conlleva el consumo de las reservas de energía, acelerando posteriormente el inicio y la resolución del *rigor mortis* (Nakayama y col., 1992; Erikson y col., 1997; Robb, 2001). Se produce además una acumulación de ácido láctico en el músculo que provoca valores de pH bajos durante el sacrificio, de manera que la caída de pH *post mortem* es más rápida en peces expuestos a estrés antes de la muerte. El pH es un buen indicador de calidad asociado tanto con la textura del músculo (Love, 1980), como con la vida útil del pescado (Foegeding y col., 1996). Por tanto, los métodos de sacrificio deben resultar en una pérdida rápida e irreversible de la conciencia del pez, para reducir el estrés y mejorar así tanto el bienestar del animal como la calidad posterior del producto (Ottera y col., 2001).

Además de la importancia del sacrificio, las condiciones del cultivo durante los días previos pueden afectar de forma decisiva sobre la calidad. Mantener a los peces en ayuno durante unos días antes del sacrificio es una práctica habitual en acuicultura. El fin de esta actividad es la obtención de un pescado cuyo digestivo esté completamente limpio, sin restos de alimento, para aumentar la calidad del producto. Este ayuno mejora la estabilidad bioquímica y microbiológica del pescado durante su almacenamiento (Paterson y col., 1997).

El tiempo mínimo necesario de ayuno para vaciar el digestivo depende principalmente de la tasa de evacuación gastrointestinal. Ésta varía según la especie (Temming y Herrmann, 2003; Nikolopoulou y col., 2011) y depende de factores como la temperatura (Santulli y col., 1993; Handeland y col., 2008), la cantidad de alimento ingerido (Pääkkönen y col., 1999), la frecuencia de alimentación (Pääkkönen y col., 1999, Lee, 2000) y las características de la dieta, como su composición y tamaño del grano (Storebakken y col., 1999; Sveier y col., 1999).

En acuicultura, mediante estudios de este tipo se puede optimizar la alimentación, pero además, conocer el tiempo de evacuación permite ajustar el periodo de ayuno previo al sacrificio.

Normalmente el periodo mínimo de ayuno es de un día, aunque en ocasiones este se prolonga hasta varios días por razones que van más allá de la evacuación intestinal, como son el precio del producto en el mercado o el tiempo necesario para vaciar la jaula (Ferreira y col., 2007). El ayuno y la restricción de alimento en la parte final del proceso productivo, ha sido también estudiado como estrategia para reducir el contenido de grasa de los peces y mejorar así la calidad del producto final (Einen y Thomassen, 1998 I; Einen y Thomassen, 1998 II; Rasmussen y col., 2000; Grigorakis y Alexis, 2005), ya que la alimentación con piensos altamente energéticos provoca la acumulación de grandes cantidades de grasa en el músculo y en las vísceras del pescado.

El efecto del ayuno sobre el contenido de grasa está asociado a los procesos metabólicos que tienen lugar en el pez por la privación de alimento. El efecto más inmediato es la disminución de la actividad metabólica, de manera que las necesidades energéticas deben cubrirse con el consumo de sustancias corporales (Rueda, 2002). Los estudios realizados al respecto consisten en ayunos prolongados, pero según nuestro conocimiento, no se han aportado datos sobre los cambios metabólicos que ocurren durante las primeras horas después de la ingesta y de ayuno, así como la importancia de sacrificar a los peces tras pocos días después de la ingesta sobre la calidad.

1.5.2.2. Dieta

En acuicultura, la dieta es uno de los factores más importantes, no sólo por su importancia sobre aspectos metabólicos del pez, sino porque la composición de los piensos determina en gran medida la composición química del pescado. El cultivo intensivo depende del suministro externo de alimento mediante piensos, y estos pueden afectar a la calidad nutricional y sensorial de los productos acuícolas (De Silva y Anderson, 1995). Una dieta artificial no puede incluir la diversidad típica de una dieta natural (Paterson y col., 1997), de manera que, la ingesta de un pienso comercial puede provocar diferencias en la apariencia, especialmente el color (Flos y col., 2002; Grigorakis y col., 2002; Mairesse y col., 2005; Valente y col., 2011), y en el perfil de ácidos grasos del filete (Alasalvar y col., 2002; Grigorakis y col., 2002; Fuentes y col., 2010). La composición de la dieta será por tanto un factor clave a la hora de establecer la calidad del producto obtenido.

1.5.2.2.1. Fuentes alternativas

Los piensos comerciales utilizados en acuicultura, sobretudo para salmónidos y peces marinos, tienen una cantidad importante de harinas y aceites procedentes de productos de la pesca (Sargent y col., 2002). En este sentido el sector acuícola es altamente dependiente de las capturas de los productos marinos, que suponen el abastecimiento de las materias primas clave de las dietas de los peces de cultivo, especialmente dentro de los alimentos acuícolas para especies carnívoras (Tacon y Metian, 2008). Sin embargo, mientras que la captura de peces ha permanecido básicamente estable desde mediados de los 1980s, la acuicultura ha experimentado un crecimiento entorno al 8% anual durante el mismo período (Pickova y Morkore, 2007), provocando un problema de abastecimiento de estos ingredientes. El estancamiento del suministro mundial de harina y aceite de pescado y la fuerte demanda del mercado han provocado un importante incremento del precio de estos productos (Tacon y Metian, 2008).

Con el fin de reducir la dependencia del aceite de pescado en la fabricación de piensos de acuicultura, en los últimos años se han producido avances significativos en su sustitución por aceites vegetales, siendo los más comunes los aceites de soja, colza, linaza, girasol, palma y oliva (Nasopoulou y Zabetakis, 2012). Dado el incremento constante de la producción de estos aceites, su alta disponibilidad y el mejor valor económico, suponen una fuente alternativa sostenible a los aceites de pescado.

Diversos estudios indican que de forma similar al aceite de pescado, algunos aceites vegetales pueden ser fácilmente catabolizados por los peces como fuentes de energía para el crecimiento (Bell y col., 2001; Regost y col., 2003; Ng y col., 2007; Stubhaug y col., 2007). Sin embargo, las características químicas de estos aceites, especialmente la composición de ácidos grasos, supone un problema en cuanto al uso de éstos como única fuente de lípidos de la dieta. La mayoría de aceites vegetales actualmente considerados como posibles alternativas son fuentes relativamente pobres de ácidos grasos *n*-3 en comparación con los aceites de pescado marinos (Tabla 9). En concreto los HUFA *n*-3 son esenciales para el crecimiento saludable de los peces y estos únicamente se encuentran en los productos procedentes del medio marino. En general, las investigaciones han reportado que estos aceites pueden reemplazar cantidades substanciales de aceite de pescado en las dietas de muchas especies sin afectar al crecimiento o a la eficacia de alimentación, siempre que el suministro de los ácidos grasos esenciales sea el adecuado (Turchini y col., 2009).

Pero, la sustitución del aceite de pescado de la dieta por estos aceites presenta un importante inconveniente, y es la modificación de la composición de ácidos grasos de los peces, con la

consecuente pérdida de las propiedades saludables para el hombre asociadas particularmente con el consumo de pescado. Estas cualidades del pescado se deben al aporte de HUFA *n*-3, en concreto EPA y DHA, y a la contribución, por su alto contenido de PUFA *n*-3, al balance del ratio *n*-6/*n*-3 de la dieta humana. El EPA y el DHA presentan toda una serie de propiedades beneficiosas para la salud y el desarrollo infantil (Simopoulos, 2005). Los productos marinos son la única fuente de estos ácidos grasos en la dieta humana, por lo que su contenido debe ser mantenido (Pickova y Morkore, 2007). La mayoría de aceites vegetales, además de no contener EPA y DHA y ser pobres en PUFA *n*-3, son ricos en ácidos grasos de 18 átomos de carbono de las series *n*-6 y *n*-9, principalmente linoléico (18:2*n*-6) y oleico (18:1*n*-9), excepto el aceite de linaza que es rico en linolénico (18:3*n*-3) (Tabla 9). Cuando se reemplaza el aceite de pescado por aceites vegetales en la dieta de los peces, las principales modificaciones en la composición de ácidos grasos del filete suponen un incremento en el contenido de PUFA C18, particularmente linoléico, y un decrecimiento en el contenido de HUFA *n*-3.

Tabla 9: Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de aceites de pescado y de aceites vegetales utilizados en la fabricación de piensos en acuicultura.

	SFA	MUFA	LA	ALA	EPA	DHA	PUFA <i>n</i> -6	PUFA <i>n</i> -3	Ratio <i>n</i> -3/ <i>n</i> -6
Aceites de pescado									
Anchoa	28,8	24,9	1,2	0,8	17,0	8,8	1,3	32,2	24,0
Capelán	20,0	61,7	1,7	0,4	4,6	3,0	1,8	12,2	6,8
Lacha	30,5	24,8	1,3	0,3	11,0	9,1	1,5	25,1	16,7
Arenque	20,0	56,4	1,1	0,6	8,4	4,9	1,4	17,8	12,7
Hígado de bacalao	19,4	46,0	1,4	0,6	11,2	12,6	3,0	27,0	9,0
Aceites vegetales									
Palma (crudo)	48,8	37,0	9,1	0,2	-	-	9,1	0,2	0,0
Soja	14,2	23,2	51,0	6,8	-	-	51,0	6,8	0,1
Colza	4,6	62,3	20,2	12,0	-	-	20,2	12,0	0,6
Linaza	9,4	20,2	12,7	53,3	-	-	12,7	53,3	4,2
Girasol	10,4	19,5	65,7	-	-	-	65,7	0,0	0,0

Datos tomados de Turchini y col. (2009).

SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; LA: ácido linoléico; ALA: ácido linolénico; EPA: eicosapentaenoico; DHA: docosahexaenoico; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados.

Además de los cambios producidos en la composición nutricional, es importante valorar los posibles efectos del uso de estos aceites en la percepción de la calidad sensorial. Numerosos estudios han reportado efectos de la fuente de lípidos de la dieta en propiedades del pescado como la textura, el perfil de compuestos volátiles asociados con el sabor, la pigmentación, y la estabilidad del producto durante el almacenamiento. Aunque los datos disponibles hasta el

momento son muy diversos y no han permitido obtener una interpretación concluyente (Turchini y col., 2009).

A pesar de las repercusiones que tiene el uso de aceites vegetales en las dietas sobre la calidad del producto, ésta parece cada vez más inevitable. Según las predicciones, los niveles de inclusión tanto de aceite como de harina de pescado en los piensos disminuirán a largo plazo, siendo su uso cada vez más específico como ingredientes de alto valor destinados a la alimentación de arranque y acabado, y de reproductores (Tacon y Metian, 2008). El descenso del uso de estos compuestos irá acompañado del incremento global del uso de fuentes alternativas de proteína y lípidos más baratos procedentes de plantas y otros animales (Tacon y col., 2006; Gatlin y col., 2007). Frente a esta situación, urge encontrar fuentes alternativas capaces de producir los mismos resultados en cuanto a crecimiento y salud de los peces sin afectar a la calidad del producto final (Barlow, 2000).

1.5.2.2.2. Antioxidantes

Otro aspecto en la fabricación de los piensos es la adición de ingredientes que, si bien no están dirigidos por sí mismos a la nutrición de los peces, pueden favorecer la comercialización y la aceptabilidad del producto por parte del consumidor. El uso de dietas de acabado para manipular el perfil de ácidos grasos (Robin y col., 2003; Fountoulaki y col., 2009), de pigmentos carotenoides que proporcionen una coloración atractiva para el consumidor (Gomes y col., 2002; Gouveia y col., 2002; Bjerkeng y col., 2007), y de antioxidantes naturales que mejoren la vida útil del producto durante su almacenamiento (Scaife y col., 2000; Ruff y col., 2002, Ruff y col., 2003; Ortiz y col., 2009), han sido ampliamente estudiados.

La elevada concentración de aceites y harinas de pescado utilizadas en los piensos hace necesaria la inclusión de antioxidantes para evitar su enranciamiento. Debido a su alto contenido en lípidos insaturados, especialmente los HUFA *n*-3, estos ingredientes son muy susceptibles al deterioro oxidativo (Hsieh y Kinsella, 1989; Frankel, 1998). La autooxidación de lípidos puede producirse tanto durante los procesos de fabricación y empaquetado del pienso, como durante su almacenaje, desde su comercialización y distribución hasta el momento de ser utilizados. Para asegurar el efecto de los antioxidantes en las dietas, éstos deben ser añadidos tan pronto como sea posible en el proceso de fabricación de las materias primas o del pienso, pero siempre teniendo en cuenta que el procesado puede disminuir su presencia o eficacia.

Antioxidante se define como una sustancia, de origen sintético o natural, que es capaz de prevenir o retrasar la oxidación radicalaria de sustratos biológicos (lípidos, proteínas, ADN e hidratos de carbono) a bajas concentraciones respecto a dichos sustratos (Valenzuela y Nieto, 1996; Jiménez y Speisky, 2000). Desde un punto de vista práctico, un antioxidante debe ser inocuo, muy activo a bajas concentraciones (0,01-0,02%), liposoluble, para acumularse a la fase lipídica, y ser estable durante el procesado del producto (Belitz y Grosch, 1997). Según el modo de acción, los antioxidantes pueden ser primarios, cuando actúan interrumpiendo la reacción en cadena de los radicales libres durante el periodo de inducción, y secundarios, que previenen la formación de radicales libres mediante diversos mecanismos (complejando iones metálicos, como limpiadores del oxígeno, convirtiendo los hidroperóxidos en especies no radicalarias, absorbiendo radicación UV o desactivando el oxígeno singlete) (Gordon, 2001).

Entre los antioxidantes más utilizados en la industria de fabricación de piensos de acuicultura se encuentran los antioxidantes sintéticos butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA), y etoxiquina (EQ). El creciente interés de la población por la ingesta de alimentos de origen natural ha provocado un aumento en la demanda de antioxidantes naturales (Ibáñez y col., 2003), cuyo uso está emergiendo como una metodología efectiva para controlar la rancidez y la limitación de la vida útil de productos susceptibles a la oxidación lipídica. Los tocoferoles (vitamina E) son ampliamente utilizados como alternativa a los antioxidantes sintéticos (Tang y col., 2001), tanto a nivel experimental como en la industria.

En los últimos años, los extractos y aceites de plantas aromáticas han ido ganando cada vez más interés como conservantes naturales aplicados por diversas técnicas en los alimentos. Las propiedades antioxidantes que presentan muchas especias y plantas aromáticas son atribuidas al elevado contenido de compuestos fenólicos, cuyo efecto antioxidante se debe a la presencia de grupos hidroxilo en sus estructuras químicas (Shahadi y col., 1992). Estos compuestos se caracterizan por tener propiedades redox, que les permite actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno y secuestradores de oxígeno singlete (Rice-Evans y col., 1997; Kähkönen y col., 1999). Entre las diferentes especies de plantas estudiadas con estas propiedades destaca la familia Labiada, a la cuál pertenecen el romero (*Rosmarinus officinalis*) y el tomillo (*Thymbra capitata*, y *Thymus zygis* subsp. *gracilis*) objeto de estudio de nuestras investigaciones. El extracto de romero es uno de los más utilizados y comercializados. En él se ha reportado la presencia de varios compuestos fenólicos con actividad antioxidante (carnosol, ácido carnósico, ácido rosmarínico, rosmadial, rosmanol, epirosmanol, iso rosmanol y metil carnosato) (Frankel y col. 1996; Ibáñez y col. 2000; Zeng y Wang, 2001). En el tomillo, el timol y el carvacrol, junto con los monoterpenos hidrocarbonados *p*-cimeno y γ -terpineno, constituyen los compuestos fenólicos más activos y abundantes, que además de sus propiedades antioxidantes presentan actividad antibacteriana (Burt, 2004).

La transferencia de estos compuestos o de sus principios activos al pez por medio de la dieta y su acumulación en el músculo, supondría una ventaja en cuanto a que estos podrían no sólo prevenir la oxidación de la dieta, sino también retrasar este proceso en el pescado durante su posterior almacenamiento. Teniendo en cuenta además las propiedades antibacterianas, y que el crecimiento microbiano es principal responsable del deterioro del pescado fresco, la presencia de estos compuestos podrían ejercer también un efecto de conservación *post mortem* del pescado, prolongando su vida útil.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El incremento de la demanda de los productos procedentes de la acuicultura ha conducido a un creciente interés por obtener un producto cada vez de mayor calidad y competitivo con el de origen extractivo. La dorada es una de las especies de peces marinos de cultivo más importantes en la producción de los países mediterráneos. En España, el 95 % de la dorada que se comercializa es de crianza. El pescado de acuicultura presenta una importante ventaja frente al de origen extractivo, y es que existe la posibilidad de controlar algunas de las condiciones que podrían determinar en gran medida la calidad del producto. Algunos de estos factores pueden ser aspectos dietéticos como el ayuno, la sobrealimentación, y la presencia o ausencia de componentes específicos en la dieta.

Aspectos como la seguridad, las propiedades nutricionales y sensoriales, y los cambios en la calidad durante el procesado y conservación son de gran importancia en los alimentos. Una parte importante de la investigación de las últimas décadas en el ámbito de la Nutrición Animal se ha dirigido a mejorar el valor nutritivo de los alimentos, y ofrecer al consumidor un producto acorde a sus necesidades, con un valor añadido y una mayor vida útil. El pescado, comparado con otros productos, es un alimento muy perecedero y su calidad puede verse modificada en poco tiempo. Su manipulación y la forma de conservación son determinantes en la durabilidad del producto. La dorada es un pescado que se comercializa normalmente fresco y entero, y se conserva en refrigeración con hielo. Debido a las tendencias actuales de mercado y consumo de alimentos, el mantener la calidad y prolongar la vida útil de la dorada en estas condiciones de almacenamiento puede ser de gran interés para el sector. El estudio de los procesos de deterioro *post mortem* de la especie y cómo las condiciones del cultivo pueden influir en la conservación del producto, podría ayudar a adoptar estrategias de producción que contribuyeran a una mejora en la calidad del producto final y a prolongar su vida útil, aportando así un valor añadido a la dorada de crianza.

Los peces son más sensibles al entorno que los animales de origen terrestre, por lo que la calidad del pescado depende en gran medida de los factores *ante mortem*. El ayuno previo al sacrificio es una práctica habitual en acuicultura. Éste es imprescindible para obtener un pescado cuyo digestivo no contenga restos de alimento. Sin embargo, un ayuno de pocos días podría ser suficiente para que se produzcan ciertos cambios en la calidad del pescado. Someter a los peces a un ayuno superior al necesario para vaciar el digestivo puede ocasionar una serie de perjuicios sobre la calidad y el deterioro del pescado que deben ser considerados. Por tanto, ajustar el periodo de ayuno al tiempo necesario para la evacuación digestiva permitiría minimizar estos efectos.

Además de las prácticas de manejo, la formulación de la dieta es un factor clave a la hora de establecer la calidad nutricional y sensorial del producto obtenido. Frente a la problemática sobre el abastecimiento del aceite de pescado para la fabricación de piensos, el uso de aceites

vegetales como fuente alternativa de lípidos parece ser cada vez más inevitable. Una vez conseguido que las dietas con estos aceites cubran las necesidades metabólicas del pez durante su engorde, cabe preguntarse si la inclusión de estos aceites en la dieta de los peces puede provocar modificaciones en el producto que comprometan la aceptación de éste por el consumidor, tanto en relativo a la calidad del producto final como a la vida útil de éste.

Otro aspecto importante en la elaboración de las dietas para peces es la susceptibilidad de éstas a la rancidez oxidativa. El elevado contenido de ácidos grasos altamente insaturados de los aceites y harinas de pescado utilizadas, hace necesario el uso de antioxidantes para evitar la oxidación lipídica de los piensos. Dado que estos compuestos pueden ser transferidos al pez y acumulados en el músculo, podría suponer una ventaja en cuanto a que el antioxidante podría no sólo prevenir la oxidación de la dieta, sino también retrasar este proceso en el pescado durante su almacenamiento. Dado el creciente interés de la población por el consumo de alimentos de origen natural, el uso de antioxidantes naturales, como aceites y extractos procedentes de plantas aromáticas, que además presentan propiedades antimicrobianas, aportaría un valor añadido al producto obtenido.

El objetivo principal de la presente memoria de Tesis Doctoral fue estudiar el efecto de distintos factores del cultivo sobre la calidad y vida útil de la dorada, para determinar de qué manera la optimización de las condiciones del cultivo puede contribuir a alcanzar un equilibrio entre las técnicas de producción y la calidad del producto final.

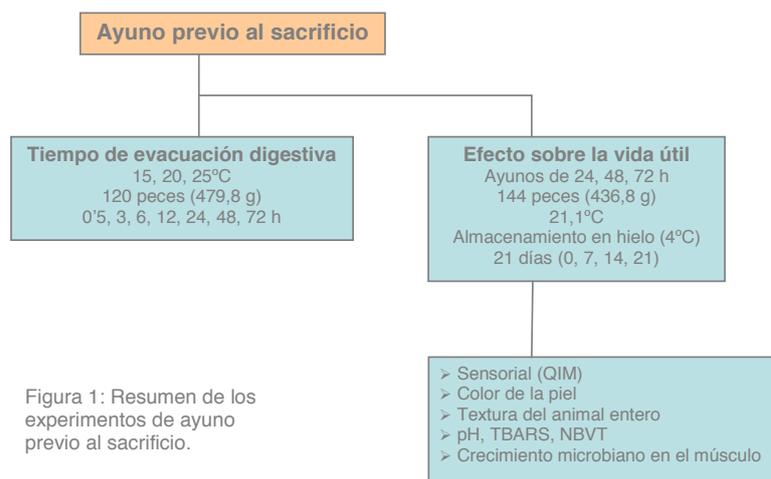
Este objetivo general se concreta en los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Determinar el tiempo de ayuno necesario para completar la evacuación gastrointestinal en función de la temperatura.
- 2.- Evaluar la influencia del tiempo de ayuno previo al sacrificio sobre la vida útil del pescado de tamaño comercial en refrigeración.
- 3.- Evaluar el efecto de la sustitución parcial del aceite de pescado por aceites vegetales de la dieta sobre la calidad del producto final y su deterioro en refrigeración.
- 4.- Evaluar el efecto de la inclusión en la dieta de aceites esenciales de tomillo (*Thymbra capitata* y *Thymus zygis* subsp. *gracilis*) y extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre la vida útil en refrigeración.

PLAN EXPERIMENTAL

Los experimentos de la presente Tesis Doctoral se dividieron en tres partes. Dado que el estudio de la presente tesis se centró en la calidad y vida útil de dorada, todos los experimentos tuvieron la duración necesaria para que los animales alcanzaran el tamaño comercial. Los estudios de vida útil se realizaron almacenando el pescado en refrigeración con hielo, que es la forma normalmente se empleada para la distribución de la dorada como producto fresco en el mercado.

El estudio sobre el ayuno previo al sacrificio consta de dos experimentos (Figura 1). Primero se llevó a cabo un experimento para determinar el tiempo de ayuno necesario para completar la evacuación gastrointestinal a distintas temperaturas (15, 20 y 25°). Para ello se sacrificaban 5 animales por cada temperatura en periodos de tiempo de 0'5, 3, 6, 12, 24, 48, y 72 horas tras la ingesta, para determinar el contenido gastrointestinal. Posteriormente se llevó a cabo un estudio de conservación en hielo con doradas sometidas a distintos periodos de ayuno previos al sacrificio para valorar el efecto sobre la vida útil del producto.



En el siguiente estudio se estimó la influencia de la inclusión de una mezcla de aceites de colza y soja como parte de la fuente de lípidos de la dieta sobre la calidad de la dorada, estudiando el efecto en el producto final y en el deterioro durante su conservación en hielo (Figura 2). Se hicieron dos grupos experimentales: el grupo de animales alimentado con la dieta FO, con el 100% de aceite de pescado, y el de los alimentados con la dieta VO, con un 75% de la fuente de lípidos constituida por aceites vegetales. Se emplearon de cada grupo experimental 18 animales para valorar la calidad del producto final y 16 se almacenaron para estimar su vida útil.

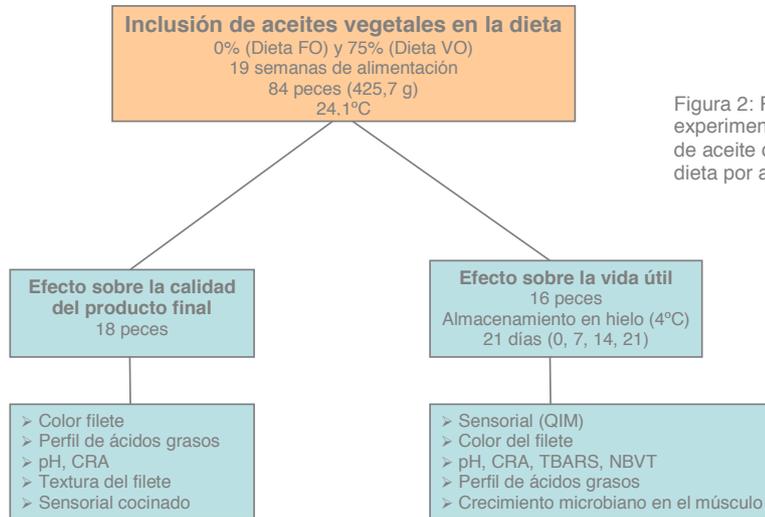


Figura 2: Resumen de los experimentos de sustitución de aceite de pescado de la dieta por aceites vegetales.

Por último, se realizó un estudio de almacenamiento con doradas que habían sido alimentadas con dietas suplementadas con aceites esenciales de tomillo (grupo Carvacrol, con *Thymbra capitata* -quimiotipo carvacrol- y grupo Timol, con *Thymus zygis* subsp. *Gracilis* -quimiotipo timol) y extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) para valorar la influencia de éstos sobre la vida útil del producto (Figura 3). El efecto de estas dietas fue comparado con una dieta sin aditivos (grupo Control), y otra con butil hidroxitolueno (grupo BHT).

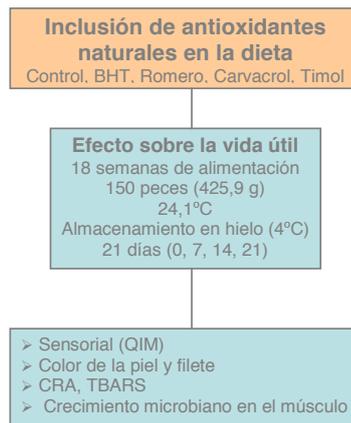


Figura 3: Resumen del experimento de la inclusión de antioxidantes en la dieta.

PUBLICACIONES

PUBLICACIÓN I:
Gastrointestinal evacuation time in gilthead seabream
(*Sparus aurata*) according to the temperature

SHORT COMMUNICATION

Gastrointestinal evacuation time in gilthead seabream (*Sparus aurata*) according to the temperature

Ana Álvarez, Benjamín García García, Jesús Cerezo Valverde, Felipe Aguado Giménez & María Dolores Hernández

IMIDA Acuicultura, Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia, Murcia, Spain

Correspondence: M^o D Hernández, IMIDA Acuicultura, Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia, PO 65, 30740 San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain. E-mail: mdolores.hernandez6@carm.es

From a bioclimatic point of view, Mediterranean aquaculture is characterized by temperate-warm waters, with the typical winter–summer range along its coasts being 13–29 °C (Person-Le Ruyet, Mahé, Le Bayon & Le Delliou 2004). As a result, temperature is an important factor to consider for aquatic production in this area. Gilthead seabream is one of the most widely cultivated species of fish in the Mediterranean. The optimal temperature for its culture ranges from 24 to 26 °C (Ravagnan 1984; Barnabé 1991; García García 1994), and the fish are sent to market when they attain a body weight between 300 g and 1 kg, requiring 15–18 months in order to reach this minimum commercial weight. During this period of time, gilthead seabream are subjected to temperature variations that occur in the Mediterranean throughout the year.

In fish farming, in order to obtain fish with completely empty digestive tracts (free of any food remains), the normal procedure is to fast them during the days before slaughter. The minimum required fasting time depends mainly on the gastrointestinal evacuation rate (*ER*). Temperature is one of the variables that have been studied the most regarding its effect on gastric evacuation (Bromley 1994). However, to date, there is no information available on the effect of temperature on gilthead seabream *ER*. According to recent data (Álvarez, García García, Garrido & Hernández 2008), starvation periods longer than that required to empty the digestive tract have detrimental effects on the quality of the final product, which must be considered.

The objective of our study was to estimate, using laboratory data, the time required for complete evacuation of the gastrointestinal tract in commercial-sized gilthead seabream (400–500 g) at the average temperatures typically found in the Mediterranean during the different seasons of the year (15, 20 and 25 °C). This information would allow us to determine the minimum fasting times the fish must be subjected to before being slaughtered, depending on the season of the year in which they are harvested.

Materials and methods

Facilities and experimental design

Gilthead seabream with an average weight of 200 g were obtained from a fish farm located on the eastern Mediterranean coast of Spain and kept at the IMIDA aquaculture facilities (San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain) until they reached the required experimental size. A total of 120 commercial-size fish (479.8 ± 23.3 g) were used, divided among six 850-L circular tanks supplied with running seawater (salinity: 37 g L⁻¹; NO₂⁻ < 0.1 mg L⁻¹; NO₃⁻ < 0.1 mg L⁻¹; NH₃ < 0.5 mg L⁻¹; pH: 7.7). These tanks formed a part of a recirculating system and were equipped with biological filtration, an ultraviolet lamp and a thermostat used to control the experimental temperature. The tanks were placed under natural photoperiod conditions (37°50'N, 0°46'W). The dissolved oxygen level, which was measured twice a day, was maintained above saturation level (80%).

The fish were fed by hand to satiety twice a day, using a dry commercial feed from Skretting (Cojobar, Burgos, Spain) (EXCEL, 6-mm-diameter pellets) (Table 1).

The fish were divided among three experimental groups of 40 animals each, with each experimental group being distributed into two tanks (20 fish-tank⁻¹). The circuit temperature was initially maintained at 24.9 ± 0.6 °C during the 2 weeks before the slaughter of the first experimental group. Temperature was lowered (0.7 °C day⁻¹) until it reached a value of approximately 20 °C, and then maintained at 19.8 ± 0.7 °C for 2 weeks before the slaughter of the second group. Finally, it was lowered (0.5 °C day⁻¹) until it reached approximately 15 °C, resulting in an average temperature of 15.0 ± 0.4 °C over the 4 weeks before the slaughter of the last group.

Each experimental group was fasted for 3 days before slaughter in order to ensure evacuation of the digestive system, and then fed by hand to satiety (for approximately 20 min at 25 and 20 °C, and 10 min at 15 °C). Five animals were slaughtered at 0.5, 3, 6, 12, 24, 36, 48 and 72 h after feeding. In order to minimize the disturbance of the animals, these fish were alternately taken from each of the two tanks into which each experimental group had been divided. The fish were anaesthetized with 2-phenoxyethanol (0.2 mL L⁻¹) and then weighed and slaughtered by a cut to the spinal cord. They were then dissected in order to remove their digestive tracts. The digestive tracts were weighed whole and then frozen until the time of the analysis. After partially thawing the digestive tract, the stomach and the intestine were separated in order to remove the contents of each part separately. Partial thawing facilitated the extraction of the intestinal contents and minimized contamination from material from the intestine itself (mucus or

sloughed epithelium). The contents from both sections were maintained for 24 h in an oven at 105 ± 1 °C in order to obtain the dry weight. The total digestive system contents were calculated by adding the gastric contents to the intestinal contents.

Statistical analysis

Geometric mean and standard deviation values were calculated for each set of replicates, and a regression procedure was conducted in each of the datasets, using STATISTICA software.

The ER for each of the temperatures (*T*) studied was calculated based on the ratio between the time elapsed after feeding (*t*) and the gastrointestinal contents (GC), fitting the data to the following equation by means of regression analysis:

$$GC = n + mt \quad (1)$$

where *m*, the straight-line slope, is the ER (g h⁻¹).

The effect of *T* on the ER, as well as the interaction between *t* and *T*, was analysed using multiple regression analysis; the data were fit to the following equation:

$$GC = a + bT + ct + dTt \quad (2)$$

This may be expressed as $GC = a + bT + (c + dT)t$, where *t* coefficient has a linear relationship with *T* in the following manner: $b' = c + dT$, when *b*, *c* and *d* are significantly different from zero. The evacuation time was then calculated based on eqn. 2, with GC = 0, according to the following expression:

$$t = -(a + bT)/(c + dT) \quad (3)$$

Results and discussion

Table 2 shows the average weights and the average daily intake rate (DIR) for each experimental group. Feed intake increased as temperature increased, with a greater daily intake at 25 °C (1.12%) as compared with 20 °C (0.65%) or 15 °C (0.18%). It is also well known that when food is unlimited, ingestion in-

Table 1 Ingredients (g kg⁻¹) and proximate composition (g kg⁻¹ of dry matter) of the diet

Fish meal	270
Soybean meal	210
Corn gluten meal	150
Fish oil	130
Broad bean	90
Peas	50
Soybean oil	50
Corn DDGS	30
Wheat gluten	20
Protein	440
Fat	220
Ash	85

DDGS, distiller's dried grains with soluble.

Table 2 Average weight (g) and average daily intake rate (DIR) for each experimental group

Temperature	24.9 ± 0.6 °C	19.8 ± 0.7 °C	15.0 ± 0.4 °C
Body weight	491.6 ± 16.6	484.3 ± 22.2	463.1 ± 21.1
DIR	1.12 ± 0.07	0.65 ± 0.05	0.18 ± 0.01

DIR = [(feed intake/mean body weight)/no. days] × 100.

creases with increasing temperature, reaching a peak at the optimum temperature before declining steeply as the temperature approaches the species' thermal limit (Jobling 1993; Yamashita, Tanaka & Miller 2001). For gilthead seabream, this occurs at around 27 °C (García García 1994) with the temperature limit being 30 °C. Similar results have been obtained for other species (Santulli, Modica, Cusenza, Curatolo & D'Amelio 1993; Temming, Bohle, Skagen & Knudsen 2002; Handeland, Imsland & Stefansson 2008).

A number of models have been proposed to describe the gastric *ER* in fish (Bromley 1994). Linear models (Santulli *et al.* 1993; Miyasaka, Kawaguchi, Genkai-Kato, Yoshino, Ohnishi, Kuhara, Shibata, Tamate, Taniguchi, Urabe & Nakano 2005; Adamidou, Nengas, Alexis, Foundoulaki, Nikolopoulou, Campbell, Karacostas, Rigos, Bell & Jauncey 2009) and exponential models (Vinagre, Maia & Cabral 2007) have probably been the most used. Few studies exist that consider intestinal evacuation.

The gastric and intestinal contents extracted at each of the post-ingestion sampling points are shown in Table 3. As the food bolus leaves the stomach, the intestinal contents increase, reaching a maximum value and then decreasing until they are evacuated. The initial gastric contents at 25 °C were greater than at 20 or 15 °C. Evacuation, both gastric and intestinal, was delayed in the experimental group subjected to 15 °C, as compared with the other two temperature groups. After 24 h, fish subjected to 25 and 20 °C conditions had completely emptied their stomachs, while the 15 °C group still had 0.009 g of contents. At 36 h post ingestion, when the 25 and 20 °C groups had emptied their intestines, at 15 °C, the fish had an average content of 0.016 g.

Fitting the *GC* versus time (Fig. 1) relationship at 25 and 20 °C yielded high *R*² values, 0.9946 and 0.9463 respectively, that were highly significant (*P* < 0.005). For 15 °C, the data demonstrated a poorer, albeit still statistically significant fit (0.806, *P* < 0.006). This poorer goodness-of-fit may be due to a greater data dispersion, particularly during the first 10 h, resulting from a reduced *ER* due to the temperature; in our work, the *R*² value decreases with temperature. It may also be that at low temperatures, the *GC*–*t* relationship is better fit by an exponential equation. In fact, in this case the data were better fitted by the equation $\text{LnGC} = 0.1808 - 0.0042 t$, with an *R*² value of 0.9578 (*P* < 0.006). However, this better fit may be more because of the result of the data distribution observed than the physiological process itself, which is something that must be experimentally verified. In any case, the *ER* increased as the temperature rose, with values of -0.0042 g h^{-1} at 15 °C, -0.0093 g h^{-1} at 20 °C and -0.0273 g h^{-1} at 25 °C. Similar results have been obtained for salmonids (Elliot 1972; Sweka, Cox & Hartman 2004; Kawaguchi, Miyasaka & Genkai-Kato 2007; Handeland *et al.* 2008) and other species (Parrish & Margraf 1990; Santulli *et al.* 1993; Pääkkönen & Marjomäki 1997; Temming *et al.* 2002; Hurst 2004; Miyasaka *et al.* 2005; Vinagre *et al.* 2007).

The point of intersection with the *y*-axis (*n*) reflects the level of intake before slaughter (Fig. 1). This level increased with temperature, and was far greater in the 25 °C group (0.652).

A higher *ER* reduces the time required to empty the digestive tract. The estimated evacuation times, indicated by the intercept of the regression line with the *x*-axis (Santulli *et al.* 1993) are 23.6 h at 25 °C and 26.5 h at 20 °C (Fig. 1). These values are similar; how-

Table 3 Gastric and intestinal content calculated as grams of dry matter as the percentage of body weight for each experimental group

Time (h)	25 °C		20 °C		15 °C	
	Stomach	Gut	Stomach	Gut	Stomach	Gut
0.5	0.647 ± 0.16	0.001 ± 0.01	0.206 ± 0.14	0.006 ± 0.01	0.228 ± 0.19	0.004 ± 0.01
3	0.485 ± 0.29	0.054 ± 0.02	0.179 ± 0.06	0.052 ± 0.01	0.159 ± 0.19	0.013 ± 0.03
6	0.403 ± 0.11	0.086 ± 0.01	0.126 ± 0.05	0.061 ± 0.01	0.071 ± 0.22	0.028 ± 0.05
12	0.197 ± 0.08	0.079 ± 0.03	0.080 ± 0.07	0.069 ± 0.02	0.035 ± 0.02	0.067 ± 0.05
24	0.000	0.001 ± 0.01	0.000	0.009 ± 0.03	0.009 ± 0.02	0.052 ± 0.02
36	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016 ± 0.02
48	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008 ± 0.01
72	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Geometric mean values of five samples ± standard deviation.

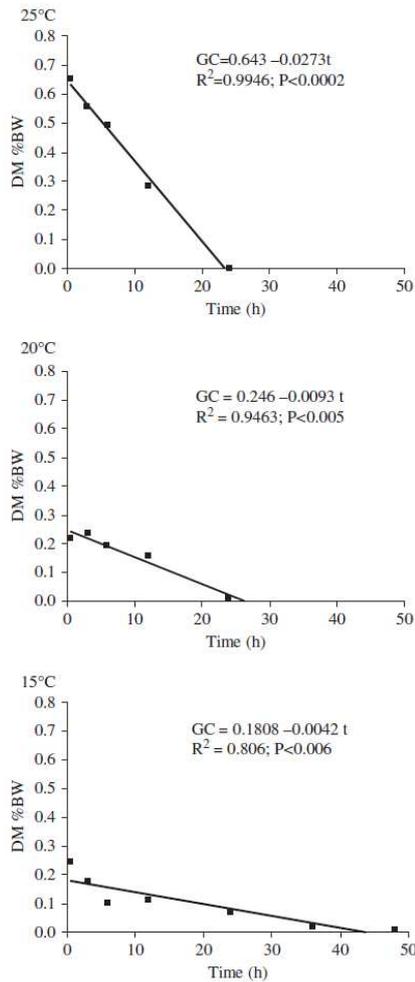


Figure 1 Gastrointestinal evacuation rate, calculated as grams of dry matter as percentage of body weight (DM %BW), in sea bream reared at 25, 20 and 15 °C. $GC = n + mt$ ($ER = m$). ER , evacuation rate; GC , gastrointestinal contents.

ever, the initial gastric content was higher at 25 °C. The experimental group housed at 20 °C almost needed the same amount of time as the 25 °C group to evacuate a considerably smaller amount of gastric contents. According to Finstad (2005), increased feed consumption followed by a temperature increase is

counteracted by greater gastric ER s, and therefore, does not necessarily result in an increase in stomach content mass. Greater feed consumption before slaughter at 25 °C was compensated by a higher ER for this group as compared with the 20 °C group. At 15 °C, on the other hand, the time required to empty the digestive tract (43.3 h) of the fish was far longer than at the other two higher temperatures. Similar results were obtained by Santulli *et al.* (1993) for seabass, where the stomach evacuation time at 15 °C was 10 h longer than at 25 and 20 °C. Vinagre *et al.* (2007) also observed shorter evacuation times for juvenile sole as the temperature increased: 14 h at 26 °C and 16 h at 20 °C and 14 °C for *Solea senegalensis*, and 14 h at 26 °C, 16 h at 20 °C and 20 h at 14 °C for *Solea solea*.

In the $GC-t$ relationship, both m and n decreased with temperature decrease (Fig. 1). This suggests an interaction between t and T , which has been demonstrated by means of multiple regression analysis (Fig. 2), where all coefficients, including the coefficient for interaction d [Eq. (2)] are significantly different from 0 ($P < 0.0001$). The equation obtained explains 88% of the variance observed and may be expressed as

$$GC = -0.5570 \pm (0.1161) + 0.0460 \pm (0.0059)T + 0.0307 \pm (0.0064)t - 0.0022 \pm (0.0004)tT; (\pm \text{standard error})$$

where $R = 0.9489$, $R^2_{\text{adj}} = 0.8773$, $P < 0.0001$, $SEE = 0.068$ (SEE , standard error of estimation).

According to this equation, the slope of t varies linearly with the temperature ($b' = 0.0307 + 0.0022T$) and t as a function of T when $GC = 0$ would be given by

$$t = \frac{-0.5570 + 0.0460T}{0.0307 - 0.0022T}$$

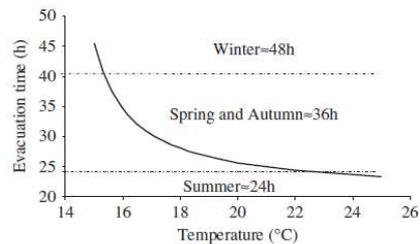


Figure 2 Relationship between evacuation time and temperature, as described by the equation: $t = (-0.5570 + 0.0460T) / (0.0307 - 0.0022T)$ where t is the evacuation time and T is the temperature.

This equation estimates t values for $GC = 0$ at the three temperatures studied (23.4 at 25 °C, 25.7 at 20 °C and 45.5 at 15 °C) very similar to those obtained using Eq. (1) (Fig. 1) and furthermore, it enables us to estimate values over the entire temperature range we have recorded (15–25 °C). Obviously, the values estimated by Eq. (3) are valid for the experimental conditions in this study and cannot be considered as a general model. However, given the lack of information regarding the effect of temperature on evacuation times of seabream, they may be considered as a reliable estimate of what occurs in seabream fish farming operations in order to estimate the fasting times before sacrifice.

The evacuation time drops sharply between 15 and 18 °C (Fig. 2), from 45.5 to 28.1 h, and then the decrease is very slight. In the case of *Salmo salar*, ER changes were most noticeable between the lowest temperature tested (6 °C) and the other experimental temperatures (10, 14 and 18 °C), which all produced similar rates (Handeland *et al.* 2008). According to Sweka *et al.* (2004), the ER s stabilize as they approach the upper thermal limit tolerated by the species.

In addition to temperature, there is a series of factors that may have an effect on the evacuation process. Predator size, prey type and meal size are the most commonly studied variables (Bromley 1994; Andersen 1999; Temming & Herrmann 2001; Temming *et al.* 2002). Other studies on farmed fish consider variables such as feed composition (Adamidou *et al.* 2009), meal particle size (Sveier, Wathne & Lied 1999), the extrusion of flours present in the feed (Venou, Alexis, Fountoulaki, Nengas, Apostolopoulou & Castritsi-Cathariou 2003), salinity (Vinagre *et al.* 2007), feeding regime and fish size in juveniles (Booth, Tucker, Allan & Stewart Fielder 2008), as well as feeding frequency and dietary moisture (Lee, Hwang & Hwon Cho 2000).

In the present study, apart from the amount of feed consumed, all these conditions were held constant for the experimental groups. The animals were fed to apparent satiety before sacrifice, as occurred during their housing at our facilities and according to common practice in the sector. For seabream farming in cages, the aforementioned factors, with the exception of temperature, may be controlled and held constant.

The effect of temperature on digestion-related processes results in seasonal variations in feed intake and gastrointestinal evacuation. The evacuation time decreases as the temperature increases, making it advisable to vary the fasting times before harvest,

according to the season of the year in the Mediterranean. The time needed to empty the digestive tract depends directly on the ER . However, other conditioning factors (such as feed intake level) must be considered in addition to the temperature. Under *ad libitum* feeding conditions, gilthead seabream increase their feed consumption and ER as the temperature increases. When the average temperature range is 20–25 °C, a 24-h period of fasting would be sufficient to obtain animals with empty digestive tracts. However, at 15 °C fasting should last no <40 h. In practice in a fish farm, the fasting time (Fig. 2) should be roughly 24 h in summer, 36 h in spring and autumn and 48 h in winter.

Acknowledgments

This research was supported by grants from the project (POI-0701) of the 'Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia' financed jointly with funds from FEDER. The authors wish to thank the company Culmarex S.A. (Águilas, Murcia, Spain) for donating the animals.

References

- Adamidou S., Nengas I., Alexis M., Foundoulaki E., Nikolopoulou D., Campbell P., Karacostas I., Rigos G., Bell G.J. & Jauncey K. (2009) Apparent nutrient digestibility and gastrointestinal evacuation time in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing different levels of legumes. *Aquaculture* **289**, 106–112.
- Álvarez A., García García B., Garrido M.D. & Hernández M.D. (2008) The influence of starvation time prior to slaughter on the quality of commercial-sized gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture* **284**, 106–114.
- Andersen N.G. (1999) The effect of predator size, temperature, and prey characteristics on gastric evacuation in whiting. *Journal of Fish Biology* **54**, 287–301.
- Barnabé G. (1991) La cría de lubina y de dorada. In: *Acuicultura* (ed. by G. Barnabé), pp. 573–612. Ediciones Omega, S.A., Barcelona, Spain.
- Booth M.A., Tucker B.J., Allan G.L. & Stewart Fielder D. (2008) Effect of feeding regime and fish size on weight gain, feed intake and gastric evacuation in juvenile Australian snapper *Pagrus auratus*. *Aquaculture* **282**, 104–110.
- Bromley P.J. (1994) The role of gastric evacuation experiments in quantifying the feeding rates of predatory fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **4**, 36–66.
- Elliot J.M. (1972) Rates of gastric evacuation in brown trout, *Salmo trutta* L. *Freshwater Biology* **2**, 1–18.

- Finstad A.C. (2005) Effect of sampling interval and temperature on the accuracy of food consumption estimates from stomach contents. *Journal of Fish Biology* **66**, 33–44.
- García García B. (1994). *Factores que influyen sobre el consumo de oxígeno, ingesta y crecimiento en la dorada (Sparus aurata L.): una aproximación al establecimiento de modelos lineales*. Tesis doctoral, Universidad de Murcia, 231pp.
- Handeland S.O., Imsland A.K. & Stefansson S.O. (2008) The effect of temperature and fish size on growth, feed intake, food conversion efficiency and stomach evacuation rate of Atlantic salmon post-smolts. *Aquaculture* **283**, 36–42.
- Hurst T.P. (2004) Temperature and state-dependence of feeding and gastric evacuation in juvenile Pacific halibut. *Journal of Fish Biology* **65**, 157–169.
- Jobling M. (1993) Bioenergetics: feed intake and energy partitioning. In: *Fish Ecophysiology* (eds. by J.C. Rankin & F.B. Jensen), pp. 1–44. Chapman & Hall, London, UK.
- Kawaguchi Y., Miyasaka H. & Genkai-Kato M. (2007) Seasonal change in the gastric evacuation rate of rainbow trout feeding on natural prey. *Journal of Fish Biology* **71**, 1873–1878.
- Lee S-M., Hwang U-G. & Hwon Cho S. (2000) Effects of feeding frequency and dietary moisture content on growth, body composition and gastric evacuation of juvenile Korean rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Aquaculture* **187**, 399–409.
- Miyasaka H., Kawaguchi Y., Genkai-Kato M., Yoshino K., Ohnishi H., Kuhara N., Shibata Y., Tamate T., Taniguchi H., Urabe H. & Nakano S. (2005) Thermal changes in the gastric evacuation rate of the fresh water sculpin *Cottus nozawae* Snyder. *Limnology* **6**, 169–172.
- Pääkkönen J.-P. & Marjomäki T.J. (1997) Gastric evacuation rate of burbot fed single-fish meals at different temperatures. *Journal of Fish Biology* **50**, 555–563.
- Parrish D.L. & Margraf F.J. (1990) Gastric evacuation rates of white perch, *Morone americana*, determined from laboratory and field data. *Environmental Biology of Fishes* **29**, 155–158.
- Person-Le Ruyet J., Mahé K., Le Bayon N. & Le Delliou H. (2004) Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* **237**, 269–280.
- Ravagnan G. (1984) L'évage du loup et de la daurade en valliculture. In: *L'Aquaculture Du Bar Et Des Sparidés* (eds. by G. Barnabé & R. Billard), pp. 425–446. INRA Publications, Paris, France.
- Santulli A., Modica A., Cusenza L., Curatolo A. & D'Amelio V. (1993) Effects of temperature on gastric evacuation rate and absorption and transport of dietary lipids in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Comparative Biochemistry and Physiology* **105A**, 363–367.
- Sveier H., Wathne E. & Lied E. (1999) Growth, feed and nutrient utilisation and gastrointestinal evacuation time in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): the effect of dietary fish meal particle size and protein concentration. *Aquaculture* **180**, 265–282.
- Sweka J.A., Cox M.K. & Hartman K.J. (2004) Gastric evacuation rates of brook trout. *Transactions of the American Fisheries Society* **133**, 204–210.
- Temming A. & Herrmann J.-P. (2001) Gastric evacuation in horse mackerel. I. The effects of meal size, temperature and predator weight. *Journal of Fish Biology* **58**, 1230–1245.
- Temming A., Bohle B., Skagen DW. & Knudsen FR. (2002) Gastric evacuation in mackerel: the effects of meal size, prey type and temperature. *Journal of Fish Biology* **61**, 50–70.
- Venou B., Alexis M.N., Fountoulaki E., Nengas I., Apostolopoulou M. & Castritsi-Cathariou I. (2003) Effect of extrusion of wheat and corn on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, nutrient utilization efficiency, rates of gastric evacuation and digestive enzyme activities. *Aquaculture* **225**, 207–223.
- Vinagre C., Maia A. & Cabral H.N. (2007) Effect of temperature and salinity on the gastric evacuation of juvenile sole *Solea solea* and *Solea senegalensis*. *Journal of Applied Ichthyology* **23**, 240–245.
- Yamashita Y., Tanaka M. & Miller J.M. (2001) Ecophysiology of juvenile flatfish in nursery grounds. *Journal of Sea Research* **45**, 205–218.

Keywords: gastrointestinal evacuation, feed intake, temperature, gilt head seabream

PUBLICACIÓN II:
The influence of starvation time prior to slaughter on the
quality of commercial-sized gilthead seabream
(*Sparus aurata*) during ice storage



The influence of starvation time prior to slaughter on the quality of commercial-sized gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage

A. Álvarez^a, B. García García^a, M.D. Garrido^b, M.D. Hernández^{a,*}

^a IMIDA Acuicultura, Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia, P.O. Box 65, 30740, San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain

^b Department of Food Technology, Faculty of Veterinary, University of Murcia, Espinardo Campus, 30071, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 November 2007

Received in revised form 15 July 2008

Accepted 16 July 2008

Keywords:

Seabream

Sparus aurata

Starvation

Ice storage

Quality

Shelf-life

ABSTRACT

Farmed commercial-sized gilthead seabream were subjected to different periods of starvation (24, 48 and 72 h) before being slaughtered in order to study the effect this had on *post mortem* quality and shelf-life. Once slaughtered (by immersion in a 1:3 ice water mixture), the animals were stored on ice at 4 °C for 0, 7, 14, and 21 days. In this manner, 12 groups were formed, each subjected to a different combination of starvation periods and storage times. At each point during the sampling, physical–chemical (pH, TBA, TVBN, color and texture), microbiological and sensory analyses were performed to determine the spoilage that had occurred in the fish. Higher pH values were found in animals that were starved for 24 or 48 h, than in those starved for 72 h. These values were the highest on days 14 and 21. Variations in TBA were not significant in any of the treatments. The TVBN increased with the number of days stored on ice. Color variations were most significant on the dorsal parts of the fish, with a discoloration occurring as the days went by in ice storage. The texture analysis revealed a certain softening of the flesh with time spent in storage, as well as a reduction in cohesiveness as the starvation period was prolonged. The microbiological analysis (total aerobic and *Pseudomonas* counts) and the quality index showed very significantly the deterioration in gilthead seabream as the on-ice storage time and the starvation time increased. The shelf-life was estimated to be 16 days for seabream starved for 24 h, 15 days for those starved for 48 h and 14 days for those starved for 72 h.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The demand for fish and other aquaculture products has experienced a worldwide increase that has been especially significant in Europe and other regions. A growing percentage of human fish consumption is supported by aquaculture (FAO, 2006). Currently, aquaculture in the Mediterranean is practically centered on seabream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) farming. With a high commercial value, gilthead seabream is already well established on the market, having reached very high production levels in only one decade. Consequently, intensive and semi-intensive gilthead seabream production has increased significantly over the past years (Flos et al., 2002; Huidobro and Tejada, 2004). The increase in demand for this fish from the Mediterranean coast to Northern European countries has resulted in a more competitive market and very demanding consumers. As a result, there is now a need to obtain high-quality aquaculture products in order to further develop this sector. It is, therefore, of considerable interest to the farming industry, retailers and consumers alike to investigate the changes in cultured seabream quality that occur during its handling, distribution and storage on ice (Alasalvar et al., 2001).

Starving the fish for a few days before slaughter is a common practice in aquaculture. Flos et al. (2002), Huidobro et al. (2001), and Huidobro and Tejada (2004) each mention periods of feeding interruption lasting 24 and 48 h in order to empty the gastrointestinal tracts of the fish. More recently, in a questionnaire sent to aquaculturists, Ferreira Pinto et al. (2007) observed that 1 day was considered to be the minimum feeding interruption period, with 8 days being the maximum. Reasons for extending this period beyond 48 h included variations in the market price for the fish and the time needed to empty the fishpond. During feeding periods, the digestive tract of the fish contains many bacteria that produce digestive enzymes capable of causing intense *post mortem* autolysis, resulting in strong odors and flavors, especially in the abdominal area (Huss, 1995). By reducing the amount of faeces in the intestines, spoilage is delayed, and digestive enzyme activity is reduced after *rigor mortis* has occurred. If further processing steps are considered, e.g. filleting and freezing, feeding interruption may be a determinant of the product shelf-life (Huidobro and Tejada, 2004).

The quality of fresh fish is a major concern to the industry and consumers (Chytiri et al., 2004). Fish is an extremely perishable food commodity. Freshness is one of the most important attributes when evaluating the quality of the fish. The freshness and quality of the end product are dependent on different biological and processing factors that influence the degree of various physical, chemical, biochemical

* Corresponding author. Tel./fax: +34 968 184518.

E-mail address: mdolores.hernandez6@carm.es (M.D. Hernández).

and microbiological changes that occur *post mortem* (Huss, 1995), and which result in a progressive loss of food characteristics in terms of taste and the general perception of quality (Olafsdottir et al., 1997). Both the time elapsed since slaughter and the storage temperature are key factors in determining the ultimate quality of the product. In fact, fish spoilage depends mostly on temperature, which controls to a large extent the bacterial and autolytic breakdown. Moreover, the rate of spoilage depends on several factors, such as the fish species and the amount of food found in the intestines (Macagnano et al., 2005). An estimate of freshness can be obtained by defining criteria related to changes in sensory attributes, such as appearance, odor, color and texture, which can be measured and quantified by sensory or instrumental methods (Olafsdottir et al., 2004). Microbiological, physical–chemical and sensory methods are used to determine these parameters, albeit sensory analysis is the most reliable method to determine fish freshness. For this reason, all the physical–chemical and microbiological methods must be combined and demonstrate a strong correlation with this type of analysis.

Therefore, the objective of this project was to study the influence that the starvation period prior to slaughter (24, 48 or 72 h) has on the quality and safety parameters (physical–chemical, microbiological and sensory) for commercial-sized gilthead seabream throughout their storage on ice.

2. Materials and methods

2.1. Animals and housing

Gilthead seabream, with an initial average weight of 436.8 ± 87.3 g, were obtained from Culmarex S.A. farm (Águilas, Murcia, Spain) and kept at the IMIDA aquaculture facilities (San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain). The fish were divided among six 850-l cylindrical–conical tanks, which were supplied with running seawater (salinity: 37 g/l; NO^{-2} : <0.1 mg/l; NO^{-3} : <0.1 mg/l; NH_3 : <0.5 mg/l; and pH: 7.7). The tanks were part of a recirculation system equipped with biological filtration, an ultraviolet lamp and a thermostat to control the experimental temperature. The water flow was constantly regulated to maintain dissolved oxygen at 70% of the saturation level. Animals were subjected to natural photoperiod ($37^{\circ}50'N$, $0^{\circ}46'W$) conditions at a constant temperature (21.1 ± 2.1 °C), and were fed a commercially available seabream diet (44% protein, 22% fat, 8.5% ash and 1.3% fiber) two times a day to satiety.

2.2. Experimental design

The animals needed a period of 4 weeks to adapt to the conditions found at the installations. They began to eat regularly, reaching an adequate ingestion rate for their body weight at 2 weeks, and with starvation starting 2 weeks later. During the starvation period, three samples were taken (at 24, 48 and 72 h following the start of the starvation), obtaining three groups of animals that had each been subjected to a different type of starvation. They were killed by hypothermia, using a mix of water and ice (1:3). A total of 144 animals were slaughtered, 48 for each starvation period.

Each starvation group was divided into four groups of 12 animals each and stored for 0, 7, 14 and 21 days, respectively. Day zero was considered to be the real period of time of 24 h following slaughter. There were no external variation factors. They were kept in refrigeration at 4 ± 1 °C, placed in polystyrene boxes with outlets for water drainage and covered with flaked ice inside a plastic bag. The fish were positioned on their sides, with one side of their bodies in contact with the box and the other with the ice. Both the refrigeration temperature and the ice/fish ratio (1:1) were maintained constant throughout the experiment.

Eight fish from each group were used for texture evaluations, and the remaining four for the rest of the analyses. Both the sensory evaluation and the color measurement were estimated using whole

fish. They were later filleted and homogenized, using the fillets from the right side for the microbiological analysis and from the left side for the physical–chemical analysis.

2.3. Analytical determinations

2.3.1. Chemical analysis

Five grams of each sample were blended with 15 ml distilled water, and the pH value of the fish homogenate was measured using a digital pH-meter (ORION, Beverly, MA, USA), standardized at pH 4.01 and 7.00. Thiobarbituric acid (TBA, mg malonaldehyde/kg fish flesh) was determined according to the method used by Botsoglou et al. (1994), and total volatile basic nitrogen analysis (TVBN, mg N/100 g fish flesh) was performed according to the EU reference (EEC, 1995). All analyses were performed in duplicate.

2.3.2. Physical analysis

A Minolta Chroma Meter CR400 (Minolta, Osaka, Japan) was used for color measurements. Colors were expressed as CIELab coordinates. In this system, L^* denotes lightness on a 0–100 scale of black to white; a^* , (+) red or (–) green; b^* , (+) yellow or (–) blue. Color intensity is expressed by chroma value, and hue is the name of a color as it is found in its pure state on the spectrum. Both values were calculated using the formulae: $C^*_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ and $H^*_{ab} = \arctan(b^*/a^*)$. Eight color measurements (four per body side) were performed on each individual, as described by Pavlidis et al. (2006); two on the dorsal skin area, (i) at the positions where the vertical line to the longitudinal body axis passes through the anterior margin of the dorsal fin (D1) and (ii) through the anus (D2), and two at the ventral skin area, (i) below the pelvic fin (V1) and (ii) at the position where the vertical line to the longitudinal body axis passes through the anus, crossing the parallel line to the longitudinal body axis as it passes through the ventral margin of the caudal peduncle (V2) (Fig. 1).

The texture profile analysis (TPA) was conducted using a texture analyzer QTS-25 (CNS Farnell, Borehamwood, Hertfordshire, England) equipped with a 25 kg load cell and Texture Pro V. 2.1 software. The samples were compressed perpendicular to the fish body, using a 20 mm-diameter cylindrical probe. The testing conditions were: two consecutive cycles of 25% compression; cross-head movement at a constant speed of 50 mm/min, and a trigger point of 0.05 N. Texture variables (hardness, gumminess, adhesiveness, cohesiveness, chewiness and springiness) were calculated as described by Bourne (1978). Measurements were made on the left side of the fish, and were taken from the central part of the body. After cutting the pectoral fin, an approximate distance of 3 cm was measured from its origin, in the middle of the body.

2.3.3. Microbiological analysis

For microbiological counts, 10 g of sample were mixed with 90 ml of 0.1% peptone–water (Oxoid code CM 9) and homogenized with a

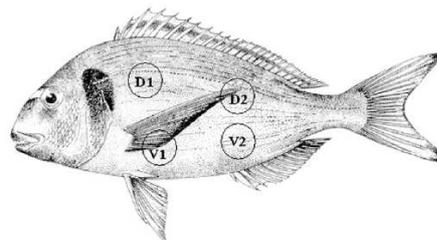


Fig. 1. Representation of the points on the seabream where color was measured.

Table 1
Quality Index Method for whole, raw seabream (*Sparus aurata*)

Parameter being assessed	Defined characteristic	Demerit points
Appearance		
Skin	Very shiny	1
	Waxy shine	3
	Matt	5
Slime	Clear-transparent	1
	Cloudy	3
	Milky-yellowish	5
Body color	Bright, iridescent pigmentation, white-silver	1
	Pigmentation in process of discoloration	3
	Dull pigmentation	5
Surface	Smooth	1
	Noticeable roughness on the tail, sunken bellies	3
	Very rough, very sunken bellies	5
Flesh		
Springiness	Very elastic, mark left when poked	1
	None, mark left when poked	5
Firmness	Very hard	1
	Very soft	5
Body odor		
Eyes	Like fresh fish	1
	Neutral	3
	Like spoiled fish	5
Clarity	Clear-translucent, black and shiny pupil	1
	Opaque	3
	Bloodshot opaque	5
Shape	Convex	1
	Flat	3
	Concave	5
Gills		
Color	Red-pink	1
	Dark red-brown	3
	Brown-greenish	5
Odor	Fresh, more intense than the body	1
	Neutral	3
	Like spoiled fish	5

stomacher (IUL-Instruments, Barcelona, Spain). From this dilution, other decimal dilutions were prepared and plated on the appropriate media. Total aerobic viable bacterial counts were determined by the pour plate method, using plate count agar (PCA, Oxoid code CM 325). The inoculated plates were incubated at 30 °C for 72 h for total viable mesophilic counts, and at 15 °C for 5 days for psychrophilic counts. For *Enterobacteriaceae*, the sample was inoculated into 10 ml of molten (45 °C) violet red bile glucose agar (VRBGA, Oxoid code CM 485). After setting, a 10 ml overlay of molten medium was added. Incubation was carried out at 37 °C for 24 h. Large colonies with purple haloes were counted. A chromogenic medium (Oxoid code CM 956) was used for culturing coliform/*E. coli* bacteria, with incubation at 37 °C for 24 h.

To determine the presence of *Salmonella*, a pre-enrichment process was performed, homogenizing 25 g of sample with 225 ml of nutrient broth in the stomacher and then incubating it for 18 h at 37 °C. Following this first incubation, an aliquot of 0.1 ml was taken and incubated in 10 ml of Rappaport Vassiliadis medium (RV, Oxoid code CM 669) for 24 h at 41.5 °C, and 1 ml in selenite broth (Oxoid code CM 395) for 24 h at 37 °C. Samples from each of these broths were then isolated on plates, using an XLD medium (Oxoid code CM 469), incubating them at 37 °C for 24 h. This was then confirmed by means of API 20 (Oxoid code 20100).

Listeria monocytogenes counts were taken from two incubations: a pre-enrichment with half-concentrated Fraser broth at 37 °C for 24 h, and an enrichment with Fraser broth (Oxoid code CM 895) at 37 °C for 24 h, using a miniVidas system to confirm the presence/absence of these bacteria. In the case of *Pseudomonas*, cetrimide fusidin cep-

haloridine agar (CFC, Oxoid code CM 559, supplemented with SR 102) was used and incubated at 20 °C for 2 days.

The presence of *Shewanella* was determined by means of three separate cultures, each using a different medium. It was considered to be present only if the growth proved to be positive in all three cases. The conditions for each incubation were: Mac Conkey agar medium (Oxoid code CM 7) at 30 °C for 24 h; iron agar (IA, Oxoid code CM 867) at 20 °C for 4 days; and blood agar medium (Oxoid code CM 55) at 25 °C for 3 days.

Microbiological data were transformed into logarithms for the number of colony-forming units (cfu g⁻¹). All plates were examined visually for the typical colony types and morphology characteristics associated with each growth medium. All counts were performed in duplicate.

2.3.4. Sensory assessment

A descriptive analysis was performed using the Quality Index Method (QIM) developed for raw gilthead seabream by Huidobro et al. (2000) as a reference, and the procedure for this species followed by González Cortés et al. (2000) in accordance with current legislation (EEC, 1996). Five experienced panelists evaluated the external appearance (shiny skin, slime and color), the muscular condition (springiness, firmness, and surface roughness), body odor and the appearance of the eyes (shape and clarity) and gills (color and odor) for four animals from each group. A total of eleven parameters were evaluated, with each sensory characteristic that was modified during storage being scored on a continuous scale of 1 to 5 demerit points (Table 1). The sum of the scores given for each parameter is the final quality index. QIM uses a score of one for very fresh fish, with increasingly higher scores as the fish deteriorate.

2.4. Statistical analysis

A multiple regression analysis was used to evaluate the influence of the starvation period and storage time on the parameters measured. The data were fitted using a linear model, $Y = a + bt + cd$, where Y represents each of the parameters, t is the storage time, d is the starvation time, and a , b and c are the coefficients calculated by the

Table 2
Seabream muscle chemical parameter changes during ice storage after different starvation periods

Starvation (h)	Storage (days)	pH	TBA (mg malonaldehyde/kg)	TVBN (mg N/100 g)
t ₂₄	d ₀	6.36±0.03	2.50±0.90	19.18±1.03
	d ₇	6.22±0.03	4.95±1.62	25.44±0.38
	d ₁₄	6.56±0.07	4.66±0.95	20.36±0.42
	d ₂₁	6.46±0.07	3.87±2.65	24.53±1.14
t ₄₈	d ₀	6.28±0.13	3.63±1.62	19.84±2.02
	d ₇	6.36±0.11	5.62±1.02	24.92±0.59
	d ₁₄	6.54±0.03	2.92±0.74	23.97±1.62
	d ₂₁	6.44±0.04	4.00±1.14	25.96±1.17
t ₇₂	d ₀	6.12±0.11	4.57±1.75	22.33±0.29
	d ₇	6.27±0.06	4.78±1.47	21.31±0.46
	d ₁₄	6.45±0.01	5.67±1.85	22.84±0.29
	d ₂₁	6.38±0.05	4.89±2.45	23.48±1.63
Multiple regression				
R		0.665	0.252	0.526
R _{adj} (%)		41.78	2.21	24.39
ANOVA		***	ns	**
a		6.355***	3.158***	21.07***
b		-0.002*	0.020 ns	0.002 ns
c		0.011***	0.019 ns	0.159***

Mean values of four samples ± standard deviation.

$Y = a + bt + cd$, t : starvation period, d : storage time.

TBA, thiobarbituric acid; TVBN, total volatile base nitrogen.

*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns: not significant.

Table 3
Color measurements during ice storage of seabream starved for different lengths of time before slaughter

Starvation (h)	Storage (day)	Dorsal					Ventral				
		L*	a*	b*	C _{ab} *	H _{ab} *	L*	a*	b*	C _{ab} *	H _{ab} *
t ₂₄	d ₀	80.99±2.26	-0.40±0.53	8.19±1.40	8.22±1.37	-0.73±1.52	90.64±0.88	1.07±0.43	3.34±0.72	3.54±0.60	-1.24±0.16
	d ₇	77.17±2.73	0.04±0.20	3.51±0.61	3.52±0.61	0.77±1.52	87.64±1.65	0.88±0.24	3.77±0.57	3.88±0.51	-1.34±0.09
	d ₁₄	80.32±1.15	-0.76±0.58	1.87±1.30	2.20±1.03	-1.05±0.50	89.81±1.88	1.17±0.12	2.07±0.83	2.40±0.75	-1.02±0.15
	d ₂₁	74.49±1.82	-1.47±0.15	1.33±0.93	2.05±0.70	-0.67±0.31	87.97±2.24	1.26±0.37	3.06±1.56	3.40±1.36	-1.11±0.24
t ₄₈	d ₀	78.41±4.30	-0.63±0.26	3.99±0.95	4.05±0.91	-1.40±0.1	89.21±0.93	0.80±0.24	2.54±0.65	2.69±0.56	-1.24±0.15
	d ₇	76.82±3.64	-0.67±0.58	3.55±0.51	3.64±0.56	-0.62±1.42	87.56±2.09	0.88±0.11	2.84±0.60	2.98±0.58	-1.26±0.06
	d ₁₄	75.29±1.67	-1.38±0.42	1.65±1.02	2.30±0.55	-0.81±0.43	86.40±2.19	1.17±0.06	2.42±0.23	2.69±0.23	-1.12±0.10
	d ₂₁	70.68±2.24	-1.46±0.18	2.08±0.50	2.54±0.49	-0.95±0.08	85.07±1.54	1.20±0.14	3.28±0.70	3.50±0.63	-1.21±0.10
t ₇₂	d ₀	79.23±2.53	-0.63±0.49	5.35±1.92	5.42±1.86	-0.64±1.47	89.21±0.33	1.01±0.10	3.42±0.27	3.56±0.28	-1.28±0.02
	d ₇	78.45±1.32	-0.62±0.38	3.23±1.14	3.32±1.10	-1.35±0.14	88.44±0.85	0.93±0.18	2.57±0.55	2.74±0.49	-1.21±0.11
	d ₁₄	77.94±2.22	-1.37±0.14	1.88±0.91	2.37±0.75	-0.89±0.23	86.82±1.58	1.13±0.12	2.45±0.34	2.71±0.28	-1.14±0.08
	d ₂₁	71.98±2.03	-1.53±0.12	1.57±1.32	2.34±0.92	-0.67±0.45	86.13±0.37	1.25±0.16	2.36±0.36	2.67±0.38	-1.08±0.04
Multiple regression											
R		0.651	0.724	0.754	0.713	0.205	0.613	0.503	0.267	0.256	0.444
R _{adj} ² (%)		39.77	50.28	54.97	48.65	98.58	34.78	21.98	29.89	2.39	16.11
ANOVA		***	***	***	***	ns	***	***	ns	ns	**
a		81.32***	0.021 ns	6.030***	5.922***	-0.274 ns	90.79***	-0.915 ***	3.406***	3.571***	-1.270***
b		-0.028 ns	-0.008*	-0.015 ns	-0.013 ns	-0.010 ns	-0.028*	0.0003 ns	-0.008 ns	-0.008 ns	0.000 ns
c		-0.301***	-0.051***	-0.203***	-0.171***	-0.001ns	-0.144***	-0.016***	-0.019ns	-0.012ns	0.008**

Mean values of four samples ± standard deviation. Y = a + bt + cd. t, starvation period; d, storage time.
***P < 0.001; **P < 0.01; *P < 0.05; ns, not significant.

regression analysis. A b value significantly different from zero (P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001) indicates that the starvation variable (t) has a significant effect upon the parameter being measured, as occurs in the case of the storage variable (d) when the coefficient c is significantly different from zero. An analysis of variance (ANOVA) was used to obtain the significance of the equation, and a Student's t-test was used to determine the significance of the coefficients (95%). The correlation between the different parameters was also analyzed using a Pearson correlation coefficient (95%). A factor analysis was used to determine which variables, independent as well as dependent, had a greater factor loading or weight, with those having a value greater than 0.7 being considered significant (Hair et al., 1999). All data were normalized (Z_i = (X_i - S_i) / X_i), and the factors were extracted using the principal components method. To facilitate the interpretation of the results, the axes were rotated according to the VARIMAX method.

3. Results

3.1. Chemical and physical analysis

3.1.1. pH

The recorded pH values for commercial-sized gilthead seabream throughout the study varied between 6.12 and 6.56 (Table 2). Significant variations were observed for both the starvation time prior to slaughter and ice storage time. A very significant positive correlation exists (P < 0.001) between the pH and the time stored on ice, with the pH increasing as the fish spend more days in storage. With regards to the effects of starvation, the longer the period lasts, the lower the pH. In this case, however, in addition to having a flatter slope, the correlation is not as significant as the one observed between pH and storage time.

Table 4
Instrumental texture analyses during ice storage for seabream starved during different lengths of time before slaughter

Starvation (h)	Storage (days)	Hardness (N)	Gumminess (N)	Adhesiveness (Ns)	Cohesiveness	Chewiness (Nmm)	Springiness (mm)
t ₂₄	d ₀	89.99±5.61	43.89±3.88	-0.22±0.09	0.48±0.02	227.41±30.48	5.18±0.47
	d ₇	71.30±2.67	33.55±1.09	-0.05±0.09	0.47±0.02	205.01±42.59	6.10±1.18
	d ₁₄	68.60±7.39	34.60±2.90	-0.04±0.05	0.51±0.03	223.43±14.56	6.47±0.39
	d ₂₁	57.70±5.13	28.74±2.29	-0.05±0.03	0.50±0.01	173.55±19.91	6.05±0.66
t ₄₈	d ₀	102.92±17.32	46.94±8.37	-0.15±0.07	0.46±0.01	271.05±47.95	5.78±0.23
	d ₇	61.45±6.71	28.45±4.20	-0.01±0.02	0.46±0.02	147.28±42.54	6.08±0.68
	d ₁₄	68.82±9.29	33.07±4.18	-0.09±0.03	0.48±0.01	196.42±27.05	5.96±0.66
	d ₂₁	59.50±7.17	29.26±2.79	-0.05±0.07	0.50±0.02	185.17±31.45	6.31±0.66
t ₇₂	d ₀	88.83±10.02	38.59±4.13	-0.10±0.08	0.43±0.01	226.10±21.01	5.87±0.16
	d ₇	72.01±11.96	33.82±5.76	-0.02±0.04	0.47±0.00	207.10±36.05	6.17±0.77
	d ₁₄	67.92±7.36	32.47±3.60	-0.03±0.04	0.48±0.01	213.87±27.24	6.58±0.12
	d ₂₁	56.84±10.60	28.55±5.16	-0.05±0.03	0.51±0.02	156.94±28.87	5.50±0.28
Multiple regression							
R		0.752	0.679	0.483	0.737	0.535	0.224
R _{adj} ² (%)		54.7	43.64	19.92	52.33	25.47	0.79
ANOVA		***	***	**	***	***	ns
a		88.778***	42.387***	-1.154***	0.476***	240.34***	5.738***
b		-0.010 ns	-0.038 ns	0.001 ns	-0.0004**	-0.132 ns	0.002 ns
c		-1.536***	-0.592***	0.004**	0.002***	-2.759***	0.018 ns

Mean values of eight samples ± standard deviation. Y = a + bt + cd. t, starvation period; d, storage time.
***P < 0.001; **P < 0.01; *P < 0.05; ns, not significant.

Table 5
Microbiological evaluation of seabream muscle during ice storage after different starvation periods

Starvation (h)	Storage (days)	Total aerobic mesophilic	Total aerobic psychrophilic	<i>Pseudomonas</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Coliforms
t ₂₄	d ₀	3.56±0.65	2.42±0.08	<10	2.75±0.12	2.59±0.17
	d ₇	3.55±0.14	3.26±0.22	2.30±0.22	2.78±0.27	2.54±0.33
	d ₁₄	6.69±0.33	6.41±0.36	3.73±0.05	2.95±0.08	2.85±0.13
t ₄₈	d ₂₁	7.81±0.19	7.11±0.05	5.25±0.07	3.02±0.15	2.46±0.37
	d ₀	3.13±0.29	2.65±0.26	<10	2.85±0.07	2.65±0.13
	d ₇	4.52±0.31	4.40±0.26	2.98±0.08	2.68±0.21	2.44±0.24
t ₇₂	d ₁₄	6.97±0.16	6.33±0.48	3.90±0.06	3.35±0.06	2.38±0.11
	d ₂₁	8.93±0.11	8.71±0.24	5.29±0.04	3.37±0.21	3.22±0.15
	d ₀	3.51±0.26	2.57±0.27	<10	2.92±0.06	2.82±0.08
t ₇₂	d ₇	4.39±0.12	4.22±0.11	3.10±0.11	2.82±0.34	2.71±0.35
	d ₁₄	7.01±0.17	6.56±0.41	4.30±0.07	2.75±0.15	2.42±0.28
	d ₂₁	8.80±0.23	8.67±0.27	5.41±0.12	3.97±0.11	3.86±0.14
<i>Multiple regression</i>						
R		0.965	0.977	0.974	0.652	0.478
R _{adj} ² (%)		92.82	95.21	94.67	40.01	19.44
ANOVA		***	***	***	***	***
a		2.497***	1.676***	0.065 ns	2.461***	2.183***
b		0.011***	0.015***	0.008***	0.005*	0.007*
c		0.259***	0.276***	0.245***	0.030***	0.021**

Mean values of four samples±standard deviation. Y=a+bt+cd. t, starvation period; d, storage time.

***P<0.001; **P<0.01; *P<0.05; ns, not significant.

<10, negative counts; ABS, absence.

3.1.2. TBA and TVBN

The TBA analysis failed to show any significant variations with regards to storage time or with different starvation periods. The TVBN analyses showed a very significant ($P<0.001$) positive correlation ($b=0.159$) with storage time. TVBN values at the beginning of the storage period were 19.18 ± 1.0 , 19.84 ± 2.0 , and 22.33 ± 0.3 mg N/100 g for the 24, 48 and 72 h starvation periods, respectively. After 21 days in storage, these values were 24.53 ± 1.1 , 25.96 ± 1.2 , and 23.48 ± 1.6 for each of the respective starvation periods.

3.1.3. Color

Table 3 shows the values for the three parameters describing gilthead seabream skin color. On the dorsal side of the body, the variations in parameters L^* , a^* and b^* and the chroma (C^*_{ab}) were very significant ($P<0.001$) for storage time, with a marked reduction as the fish spent more days in storage.

On the ventral side, L^* and a^* displayed a very significant negative correlation ($P<0.001$) with storage time, although the slope was not very steep ($c=-0.144$ and $c=-0.016$, respectively). Hue (H^*_{ab}) showed a slight increase as storage time increased ($c=0.008$), although this correlation was less significant than that of L^* and a^* parameters.

3.1.4. Texture

Table 4 shows the results obtained for the six texture parameters measured. Except for springiness, all parameters showed significant variations with storage time on ice, but only cohesiveness showed any significant difference with the different starvation periods. Hardness, gumminess and chewiness declined as the number of days on ice increased, demonstrating very steep slopes (-1.536 , -0.592 and -2.759 , respectively). Adhesiveness and cohesiveness increased with time in storage, with very small (0.004 and 0.002), albeit significant ($P<0.01$), slopes.

Table 6
Sensory evaluations of seabream during ice storage for each starvation period

Starvation (h)	Storage (days)	Appearance				Flesh		Body odor	Eyes		Gills		Quality index
		Skin	Slime	Body color	Surface	Springiness	Firmness		Clarity	Shape	Color	Odor	
t ₂₄	d ₀	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	0	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.03±0.05	1.10±0.00	10.13±0.05
	d ₇	1.19±0.16	3.05±0.10	1.08±0.09	1.00±0.00	1.00±0.00	2.36±0.12	2.54±0.11	2.41±0.13	4.55±0.42	2.49±0.35	2.56±0.00	24.23±0.47
	d ₁₄	2.69±0.13	4.14±0.02	2.72±0.18	2.31±0.00	2.29±0.00	2.76±0.13	3.00±0.19	2.33±0.01	4.60±0.15	2.69±0.33	3.73±0.13	33.27±0.56
t ₄₈	d ₂₁	3.44±0.02	4.88±0.00	3.77±0.06	2.35±0.14	3.98±0.44	3.90±0.36	4.01±0.13	4.84±0.20	4.88±0.00	3.12±0.36	4.77±0.20	43.92±0.65
	d ₀	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	0	1.05±0.06	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.30±0.00	10.35±0.06
	d ₇	1.61±0.10	3.20±0.00	1.62±0.25	1.08±0.31	1.09±0.14	2.63±0.00	3.17±0.19	2.24±0.36	4.02±0.56	2.96±0.33	3.52±0.26	27.14±0.85
t ₇₂	d ₁₄	2.90±0.10	3.83±0.00	2.68±0.05	2.79±0.14	3.09±0.24	3.21±0.20	3.34±0.21	2.70±0.08	4.54±0.00	3.15±0.36	4.10±0.35	36.32±1.55
	d ₂₁	3.68±0.07	5.00±0.00	4.00±0.00	2.13±0.00	4.10±0.16	3.98±0.01	4.45±0.10	4.88±0.21	5.00±0.00	3.62±0.24	5.00±0.00	45.83±0.17
	d ₀	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	0	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.38±0.00	10.38±0.00
t ₇₂	d ₇	1.98±0.16	3.12±0.00	1.74±0.00	1.66±0.18	1.76±0.05	2.85±0.06	3.03±0.44	2.11±0.09	4.25±0.04	2.77±0.22	3.59±0.33	28.85±0.60
	d ₁₄	2.68±0.13	3.83±0.00	2.83±0.00	2.23±0.28	2.77±0.33	3.02±0.48	3.81±0.28	2.63±0.16	4.50±0.00	3.13±0.39	4.16±0.57	35.57±1.53
	d ₂₁	3.75±0.10	4.92±0.10	4.03±0.04	2.50±0.00	4.05±0.10	3.97±0.00	4.40±0.27	4.76±0.30	5.00±0.00	3.70±0.44	5.00±0.00	46.08±0.98
<i>Multiple regression</i>													
R		0.98	0.972	0.977	0.855	0.971	0.954	0.945	0.946	0.855	0.88	0.957	0.985
R _{adj} ² (%)		95.95	94.27	95.17	71.89	93.94	90.63	88.74	88.93	71.99	76.37	91.21	96.96
ANOVA		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
a		0.617***	1.406***	0.521***	0.798***	-0.517***	1.063***	0.922***	0.914***	1.941***	1.086***	1.092***	10.010***
b		0.006***	-0.001 ns	0.005**	0.004 ns	0.009***	0.004 ns	0.009**	-0.0004 ns	-0.001 ns	0.007 ns	0.010**	0.049**
c		0.129***	0.180***	0.144***	0.074***	0.197***	0.131***	0.148***	0.168***	0.174***	0.109***	0.168***	1.619***

Mean values of four samples±standard deviation. Y=a+bt+cd. t, starvation period; d, storage time.

***P<0.001; **P<0.01; *P<0.05; ns, not significant.

3.2. Microbiological analysis

The changes in the microbiological flora of aquacultured seabream during ice storage for various starvation periods are shown in Table 5. Microbial growth was significant for the different starvation periods and for time in ice storage. All the counts increased with storage time (especially total aerobic and *Pseudomonas* counts), demonstrating very significant correlations. Aerobic counts for both mesophiles and psychrophiles, as well as *Pseudomonas*, significantly increased ($P < 0.001$) along with the starvation period. The count for *Enterobacteriaceae* and coliform bacteria also increased the longer the starvation period lasted, although the differences were not as significant ($P < 0.05$). For the rest of the microorganisms, the count was < 10 for *Shewanella* and *E. coli*, with the absence of *Salmonella* and *Listeria*.

3.3. Sensory assessment

The Quality Index values varied between 10.1 on day 0 of the 24 h starvation period, and 46.1 on day 21 of the 72 h starvation period (Table 6). The differences were significant between the different

starvation periods ($P < 0.01$) and with the days kept on ice ($P < 0.001$). The Index increased as the fish spent more days in ice storage, with higher values being observed for the 48 and 72 h starvation periods.

Table 6 shows the average values for the scores assigned to each parameter evaluated during the analysis. All the parameters considered showed a very significant positive correlation with storage time ($P < 0.001$). The minimum values appeared on day 0, with scores of 1.00 for all parameters except for gill odor, which was 1.10; springiness could not be evaluated on day 0, given the rigidity of the fish as the result of *rigor mortis*. The maximum values were found on day 21. With regards to the starvation effects, the parameters that showed significant correlations were: skin appearance, body color, springiness, body odor and gill odor.

3.4. Factor analysis

The factor analysis using the principal components method for extracting factors obtained two factors. Table 7 shows the results after having rotated the axes using the VARIMAX method. Factor 1 explains 55.1% of the variance, while factor 2 only accounts for 10.6%.

Table 7
Rotated factor loading matrix (VARIMAX) for the communality attributes and values and factor statistics

		Factor 1	Factor 2	Factor	Eigenvalue	% Total variance	Cumulative eigenvalue	Cumulative %
Starvation		0.1049	0.007	1	20.939	55.1026	20.939	55.1026
Storage		0.9695 ^a	0.1427	2	4.0226	10.5857	24.9616	65.6884
Chemical analysis								
pH		0.5254	0.5071					
TBA		0.1665	-0.3986					
TVBN		0.6182	-0.4638					
Color								
Dorsal	<i>L</i> [*]	-0.6867	0.1938					
	<i>a</i> [*]	-0.6535	-0.2774					
	<i>b</i> [*]	-0.775 ^a	-0.2072					
	<i>C</i> _{ab} ^{ab}	-0.7408 ^a	-0.19					
	<i>H</i> _{ab} ^{ab}	0.0338	-0.4492					
Ventral	<i>L</i> [*]	-0.6595	0.3291					
	<i>a</i> [*]	-0.4137	-0.6241					
	<i>b</i> [*]	-0.1282	-0.8532 ^a					
	<i>C</i> _{ab} ^{ab}	-0.0802	-0.8176 ^a					
	<i>H</i> _{ab} ^{ab}	0.3385	0.8685 ^a					
Texture								
Hardness		-0.8302 ^a	0.0921					
Gumminess		-0.7743 ^a	0.1831					
Adhesiveness		0.5373	-0.2128					
Cohesiveness		0.5829	0.3227					
Chewiness		-0.6133	0.1135					
Springiness		0.2553	-0.1194					
Microbiological analysis								
Aerobic mesophilic		0.9159 ^a	0.2552					
Aerobic psychrophilic		0.9404 ^a	0.2176					
<i>Pseudomonas</i>		0.9812 ^a	0.0987					
<i>Enterobacteriaceae</i>		0.5819	0.2417					
Coliforms		0.3521	0.1232					
Sensory assessment								
Appearance	Skin	0.9381 ^a	0.2322					
	Slime	0.9763 ^a	0.0751					
	Body color	0.9257 ^a	0.2281					
	Surface	0.8059 ^a	0.3816					
Flesh	Springiness	0.9637 ^a	0.1402					
	Firmness	0.9767 ^a	0.0172					
Body odor		0.9708 ^a	0.0281					
Eyes	Clarity	0.9335 ^a	-0.0134					
	Shape	0.9055 ^a	-0.0415					
Gills	Color	0.9197 ^a	0.0303					
	Odor	0.9678 ^a	0.1001					
QIM		0.9883 ^a	0.0952					

^aIndicates a loading > 0.7 .

variables most closely related to factor 1 were the microbiological and the sensory variables. All the sensory analysis attributes and most of the microbiological counts showed factor loadings above 0.7. In the case of the independent variables, only storage was significantly related to factor 1, with a factor loading of 0.97, while the value for starvation was 0.11.

4. Discussion

Fish is one of the most perishable products found, due to its chemical composition. The sensory, physical–chemical and nutritional quality of fish may be affected by changes in physiological factors (age, sex, maturity), environmental factors (water, temperature, pressure), and factors related to the animal's diet, all of which determine the degree of freshness at the time of slaughter (Haard, 1992). Any stress factor occurring during fish farming causes alterations in its metabolism, and if this occurs during the days immediately prior to slaughter, the *post mortem* quality may be affected. The most immediate effect of starvation is that of reducing metabolic activity, so that energy needs must be fulfilled by consuming body reserves. In our study, the factor loading for the starvation variable is much smaller than that of the storage variable, and the variations in the parameters measured by each analysis are more significant as the fish spends more days in ice storage. However, on each of the sampling days, significant differences were observed for some variables among the different starvation groups, making its effect evident. In particular, the microbiological and sensory parameters were the most significant for both treatments, and had a strong correlation to one another. It bears noting that the total aerobic (mesophilic and psychrophilic) and *Pseudomonas* counts have a much higher significance than the rest with both storage time and starvation time, and demonstrate an adjustment of greater than 90% and a factor loading above 0.7. In the case of the sensory analysis, the most significant variables also demonstrate a high adjustment (87–97%), and all show a factor loading greater than 0.7. The results of these analyses have allowed us to clearly see the effect starvation has on the quality and deterioration of the fish during storage.

The pH remained practically constant over the first 2 weeks of storage on ice, and then increased, showing similar values on days 14 and 21. Similar results have been obtained in other studies (Grigorakis et al., 2003; Papadopoulos et al., 2003; Cakli et al., 2007; Özden et al., 2007), where the pH remained constant over the first few days of storage, and then increased. However, in another study where gilthead seabream and sea bass were kept refrigerated (2–4 °C), a pH increase was observed (especially in gilthead seabream) over all 7 days of storage (Taskaya et al., 2003). In fish, an initial pH reduction right after death is attributed to the concentration of lactic acid produced by the anaerobic metabolism of glycogen in the muscle (Grigorakis et al., 2003), and this pH reduction is accompanied by the onset of *rigor mortis* (Huss, 1995). In our study, as in the study conducted by Grigorakis et al. (2003), no significant initial reduction was observed, and this may be due to the fact that the lowest pH value may have occurred during the hours spent in storage before sampling on day zero. The onset of *rigor mortis* occurred in gilthead seabream more than 2 h after their slaughter, and gradually decreased after 24 h, with a reduction of pH occurring during this period (Bagni et al., 2007). With regards to starvation, our results revealed higher pH values for starvation periods lasting 24 or 48 h, as compared to those lasting 72 h. In the case of Atlantic salmon (*Salmo salar*), the muscle pH also increased with starvation time after 4 and 12 days of ice storage (Einen and Thomassen, 1998).

The results we obtained in the TBA analysis were not significant for any of the treatments. No oxidation spoilage occurred for sea bass or seabream at the end of a storage period lasting 18 days (Cakli et al., 2007). It is important to note that according to Auburg (1993), TBA records may not reveal the actual rate of lipid oxidation, since malonaldehyde can interact with other components of the fish body.

Such components may include amines, nucleosides and nucleic acids, proteins, amino acids from phospholipids, and other aldehydes that are end products of lipid oxidation. This interaction may vary greatly, depending on the fish species (Papadopoulos et al., 2003).

The total volatile basic nitrogen (TVBN) includes measurements of TMA (trimethylamine), DMA (dimethylamine), ammonia and other volatile basic nitrogen compounds (Huss, 1995). The TVBN for gilthead seabream increased with storage time; however, the increase was small. Similar results were obtained in other studies on seabream stored on ice for different periods of time (Grigorakis et al., 2003; Taskaya et al., 2003). A slow and regular TVBN increase with a pattern similar to the one we have presently found has also been observed in three Sparidae species during refrigerated storage (Civera et al., 1995). The TVBN increased exponentially in seabream during storage, reaching relatively high levels (50–100 mg/100 g) at the end of the storage period, depending on the storage temperature (Koutsoumanis and Nychas, 2000). The concentration of TVBN in freshly caught fish is typically between 5 and 20 mg N/100 g, whereas levels of 30–35 mg N/100 g in flesh are generally regarded as the acceptable limits for ice-stored cold water fish (Connell, 1995). The present findings indicate that, according to the EU classification (95/149/CE), gilthead seabream should actually be included in the group of fish with a TVBN limit for human consumption set at 35 mg N/100 g. In this study, the TVBN concentration fell under the limit of acceptability at the end of the storage period.

The color changes we observed with storage time on ice were very significant, and were most noticeable on the dorsal part of the body. Similar results were obtained for *Pagrus pagrus*, with storage time affecting lightness and hue only on the dorsal skin area (Pavlidis et al., 2006). In our study, L^* varied between a maximum value of 80.99 and a minimum value of 70.68, decreasing with the number of days spent in storage, and resulting in a discoloration of gilthead seabream skin. The chromaticity parameters also decreased with days spent in storage, the decrease in b^* being sharper than that of a^* . This indicates a color change in gilthead seabream from a yellowish tone to one that is more bluish. However, in a study performed on whole ungutted seabream and sea bass, lightness values varied between 56 and 49, and between 60 and 54, respectively, and as time passed, the fish flesh became darker and more yellow (Cakli et al., 2007). In addition, the chroma decrease on the top part of the body indicates a loss of color intensity that supports the idea that the animals suffer discoloration as they spend more days in storage.

As a result of prolonged storage, proteolysis in fish muscle occurs, causing undesirable changes in the texture of many fishes. Myosin heavy chain (MHC) and actin are the main structural proteins in fish flesh. In a post-rigor state, fish muscle softens with increasing ice storage time (Azam et al., 1989; Montero and Borderias, 1990; Ando et al., 1995). In the present study, parameters like hardness, springiness and chewiness decreased with the days spent in storage. Chewiness, in sensory terms, corresponds to the energy required to chew a solid food product (Bourne, 2002). Therefore, a decrease in this parameter is due to a softening of the flesh. There were statistically significant differences in the hardness of seabream fillets during an ice storage period of 23 days (Alasalvar et al., 2001). With regards to the effect of starvation, the force (N) differences observed at 5 mm ($F_{5\text{ mm}}$) after 4 days of ice storage indicated a toughening of raw Atlantic salmon fillets when the starvation period was extended beyond 58 days (Einen and Thomassen, 1998). Since low pH contributes to softening fish muscle (Love, 1988; Montero and Borderias, 1990), the pH increase after long-term starvation could contribute to a tougher muscle texture. In these experiments, cohesiveness was the only parameter that changed significantly with different periods of starvation, which besides increasing with the days spent on ice, showed higher values for animals subjected to 24 h fasting, over 48 and 72 h periods.

Since fish are poikilothermal, both their metabolism and the commensal microflora present on their skin, gills and intestines are

adapted to lower temperatures than those of mammals (Fraser and Sumar, 1998). For this reason, even if the fish are kept at low temperatures, as the days go by in refrigeration, the levels of microorganisms increase, reaching unacceptable limits for human health. Microbial development takes place during the last stages of the storage period, and the release of basic compounds as a product of their metabolism increases the pH. Since we stored the fish under aerobic conditions, the aerobic microorganism count was high from the first day, and then showed a high growth rate with the days spent on ice. The total aerobic bacteria count was higher during the last 2 weeks, coinciding with the pH increase, and it was also dominant with regards to the rest of the bacteria examined. Very similar values were obtained for the mesophile and psychrophile count by Cakli et al. (2007) and Özden et al. (2007). *Enterobacteriaceae* and coliforms were also present on the first day, although in this case, the growth was not as high with the days spent on ice. Besides storage, the starvation time seemed to have an influence on the growth and proliferation of microorganisms. Aerobes, *Enterobacteriaceae* and coliforms were more abundant with starvation periods lasting 48 and 72 h than with 24 h periods.

Fish deterioration is directly related to the growth of bacteria. However, it is important to keep in mind that the bacteria contributing to this deterioration are not the same as those that appear as a result of it (Fraser and Sumar, 1998). *Pseudomonas* is a clear example of bacteria responsible for deterioration, and which usually grow rapidly during the early stages of storage. In our study, the growth of *Pseudomonas* was not positive until the second week, when they began to proliferate, although without reaching the growth of the other aerobic bacteria. These results coincide with those of Özden et al. (2007), where *Pseudomonas* did not appear until day 5 and 9 of storage. *Shewanella putrefaciens* is considered to be the most destructive bacteria with regards to food spoilage, but in this case it was not detected, most likely due to the presence of *Pseudomonas*, a competitor which inhibited its growth.

A microbiological analysis ultimately determines the shelf-life for fresh fish. The maximum limit of acceptability used to count the aerobic mesophile microorganisms is 7 log cfu/g (ICMSF, 1986). In our study, this value was not reached until day 14, but only for fish subjected to 72 h of starvation, although the seabream that were starved for 48 h showed a value very close to this limit on day 14. On day 21, the total aerobic count showed values above the established value for all starvation groups.

The main characteristic of the fish sensory evaluation using the Quality Index Method (QIM) is that it is expressed with a score based on demerit points, which can be linearly related to the time the fish are kept on ice. The data obtained by Lougovois et al. (2003) showed a highly significant relationship with storage time on ice, and indicated that the QIM does, in fact, successfully describe the different degrees of freshness for seabream stored on ice. The procedure we used for the sensory evaluation of the degree of freshness also produced very good results, and the Quality Index obtained shows a high significance for storage time on ice. Significant differences were also observed with different starvation periods, with greater deterioration being observed in gilthead seabream that were deprived of food for 48 and 72 h. On day zero, the seabream were in a state of *rigor mortis*, which is why the springiness was null. However, differences could already be seen in the deterioration of the gills on seabream that were subjected to different starvation periods. In particular, gill odor was the parameter that received the worst evaluation on day zero. The eyes also showed rapid deterioration, with their shape receiving a score greater than 4 as early as the second week of shelf-life. These results agree with the appraisal method usually used by the consumer, with body rigidity, gill condition and eye appearance being the most prominent parameters for estimating the freshness of the fish.

According to the results obtained by Cakli et al. (2007) for both microbiological and sensory analyses, the shelf-life for gilthead

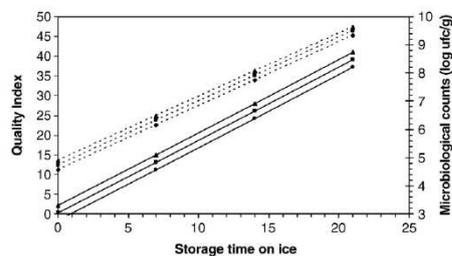


Fig. 2. Linear regression for quality index (dotted lines) and microbiological count (solid lines) versus storage time for starvation periods of 24 h (■), 48 h (●) and 72 h (▲). Quality Index = $10.010 + 0.049t + 1.619d$ and mesophilic count = $2.497 + 0.011t + 0.259d$.

seabream stored on ice is 15 days. The shelf-life of sea bass stored on ice has also been estimated at 15 days in some studies (Papadopoulos et al., 2003; Cakli et al., 2007). Using sensory analysis, however, Alasalvar et al. (2001) obtained an acceptability limit of 17–18 days for seabream stored under the same conditions. This contrasts with a study conducted by Özden et al. (2007) where the sensory analysis indicated a shelf-life for sea bass of 13 days, which is shorter than that suggested by other studies that used a microbiological analysis. Tejada and Huidobro (2002) also estimated a shelf-life for seabream of 13–14 days, which is shorter than those reported by the abovementioned studies, but in this case the results were obtained by both sensory and microbiological analyses.

In our study, the parameters that were most sensitive to ice storage and starvation were those related to the sensory and microbiological analyses, which were significantly correlated to each other. Therefore, we can establish the shelf-life based on the value of 7 log cfu/g for the aerobic mesophilic count set by current regulations (ICMSF, 1986). The equation we have obtained for this parameter (Table 5) estimates that the legal limits would be reached after 14, 15 or 16 days, depending on whether the starvation period lasted 72, 48 or 24 h, respectively. The Quality Index estimated with the corresponding equation (Table 6) would be 38 (Fig. 2).

5. Concluding remarks

According to our results, starvation lasting more than 24 h seems to accelerate the *post mortem* deterioration process in fish (increased pH, color loss, high microbiological counts and a higher Quality Index), limiting its shelf-life. The microbiological analysis (overall mesophilic and psychrophilic counts, in addition to *Pseudomonas* counts) and the Quality Index showed a very significant deterioration of gilthead seabream with increasing ice storage and starvation times. Based on the mesophilic count, the shelf-life for seabream that have been starved for 24 h, 48 h and 72 h, is estimated to be 16, 15 and 14 days, respectively. Subjecting the fish to starvation periods longer than required to empty the digestive tract has other detrimental effects that must be considered when estimating the starvation time prior to slaughter. As a result, it becomes necessary to reach a compromise between the advantages of emptying the digestive tract and the detrimental changes caused by starvation on the final product. Additional studies are necessary in order to determine the causes behind this effect.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the project (POI-0701) of the "Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia"

financed jointly with funds FEDER. The authors wish to thank the company Culmarex S.A. (Águilas, Murcia, Spain) for donating the animals.

References

- Alasalvar, C., Taylor, K.D.A., Öksüz, A., Garthwaite, T., Alexis, M.N., Grigorakis, K., 2001. Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods. *Food Chem.* 72, 33–40.
- Ando, M., Yoshimoto, Y., Inabu, K., Nakagawa, Y., Makinodan, Y., 1995. Post-mortem change in three-dimensional structure of collagen fibrillar network in fish muscle pericellular connective tissues corresponding to post-mortem tenderization. *Fish. Sci.* 61, 327–330.
- Auburg, S.P., 1993. Review: interaction of malonaldehyde with biological molecules—new trends about reactivity and significance. *Int. J. Food Sci. Technol.* 28, 323–335.
- Azam, K., Mackie, I.M., Smith, J., 1989. The effect of slaughter method on the quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during ice storage. *Int. J. Food Sci. Technol.* 24, 69–79.
- Bagni, M., Civitareale, C., Priori, A., Ballerini, A., Finoa, M., Brambilla, G., Marino, G., 2007. Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 263, 52–60.
- Botsooglou, N.A., Fletouris, D.J., Papageorgiou, G.E., Vassilopoulos, V.N., Mantis, A.J., Trakatlis, A.G., 1994. Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1931–1937.
- Bourne, M.C., 1978. Texture profile analysis. *Food Technol.* 32 (7), 62–66.
- Bourne, M.C., 2002. Food Texture and Viscosity. Academic Press, New York, p. 201.
- 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.
- Chytiri, S., Choulara, I., Savvaids, I.N., Kontominas, M.G., 2004. Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. *Food Microbiol.* 21, 157–165.
- Civera, T., Turi, R.S., Parisi, E., Fazio, G., 1995. Further investigations on total volatile basic nitrogen and trimethylamine in some Mediterranean teleosts during chilled storage. *Sci. Aliments* 15, 179–186.
- Connell, J.J., 1995. Control of Fish Quality, 4th ed. Fishing News Books Limited, London.
- EEC, 1995. Total volatile basic nitrogen (TVB-N) limit values for certain categories of fishery products and specifying the analysis methods to be used. Commission Decision 95/149/EEC of 8 March 1995, Official Journal of European Communities, L 97, 84–87.
- EEC, 1996. Laying Down Common Marketing Standards for Certain Fishery Products. Council Regulation (EC) No 2406/96 of 26 November 1996 Official Journal of European Communities, L 334, 1–15.
- Einen, O., Thomassen, M.S., 1998. Starvation prior to slaughter in Atlantic salmon (*Salmo salar*) II. White muscle composition and evaluation of freshness, texture and colour characteristics in raw and cooked filets. *Aquaculture* 169, 37–53.
- FAO, 2006. State of world aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper, No. 500. FAO, Rome, 134 pp.
- Ferreira Pinto, J., Nunes, M.L., Cardoso, C., 2007. Feeding interruption and quality of cultured gilthead sea bream. *Food Chem.* 100, 1504–1510.
- Flos, R., Reig, L., Oca, J., Ginovart, M., 2002. Influence of marketing and different land-based systems on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) quality. *Aquac. Int.* 10, 189–206.
- Fraser, O., Sumar, S., 1998. Compositional changes and spoilage in fish—an introduction. *Nutr. Food Sci.* 5, 275–279.
- González Cortés, M.A., Penedo, J.C., Millán, R., Sanjuán, E., Estupiñán, S., 2000. Cambios en la vida útil de la dorada acuaclivada en Canarias (*Sparus aurata*) conservada en hielo. *Alimentaria* 61–64 marzo.
- Grigorakis, K., Taylor, K.D.A., Alexis, M.N., 2003. Seasonal patterns of spoilage of ice-stored cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chem.* 81, 263–268.
- Haard, N., 1992. Control of chemical composition and food quality attributes of culture fish. *Food Res. Int.* 25, 289–307.
- Hair Jr., F.J., Anderson, R.E., Tatham, R.L., Black, W.C., 1999. *Análisis multivariante*, 5 ed. Prentice Hall Iberia, Madrid, Spain, 832 pp.
- Huidobro, A., Tejada, M., 2004. Gilthead seabream (*Sparus aurata*): suitability for freezing and commercial alternatives. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1405–1413.
- Huidobro, A., Pastor, A., Tejada, M., 2000. Quality Index Method developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *J. Food Sci.* 65, 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 sea bream, *Sparus aurata*. *Eur. Food Res. Technol.* 212, 408–412.
- Huss, H.H., 1995. Quality and Quality Changes in Fresh Fish. FAO Fisheries Technical Paper, vol. 348. FAO, Rome.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1986. Sampling plans for fish and shellfish, 2nd Edition. ICMSF, Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications, vol. 2. University of Toronto Press, Toronto, Canada, pp. 181–196.
- Koutsoumanis, K., Nychas, G.J., 2000. Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf life predictions. *Int. J. Food Microbiol.* 60, 171–184.
- Lougovois, V.P., Kyranas, E.R., Kyranas, 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.
- Love, R.M., 1988. The Food Fishes—Their Intrinsic Variation and Practical Implications. Farrand Press, London, UK.
- Macagnano, A., Careche, M., Herrero, A., Paolesse, R., Martinelli, E., Pennazza, G., Carmona, P., D'Amico, A., Di Natale, C., 2005. A model to predict fish quality from instrumental features. *Sens. Actuators, B* 111–112, 293–298.
- Montero, P., Borderias, J., 1990. Effects of rigor mortis and ageing on collagen in trout (*Salmo irideus*) muscle. *J. Sci. Food Agric.* 52, 141–146.
- Olafsdottir, G., Martindottir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., Mackie, L., Henehan, G., Nielsen, J., Nilsen, H., 1997. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 258–265.
- Olafsdottir, G., Nesvadba, P., Di Natale, C., Careche, M., Oehlenschläger, J., Tryggvadottir, S.V., Schubring, R., Kroeger, M., Heia, K., Esaiassen, M., Macagnano, A., Jørgensen, B.M., 2004. Multisensor for fish quality determination. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 86–93.
- Özden, O., Inugur, M., Erkan, N., 2007. Effect of different dose gamma radiation and refrigeration on the chemical and sensory properties and microbiological status of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Radiat. Phys. Chem.* 76, 1169–1178.
- Papadopoulos, V., Choulara, I., Badeka, A., Savvaids, I.N., Kontominas, 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.
- Pavlidis, M., Papandroulakis, N., Divanach, P., 2006. A method for the comparison of chromaticity parameters in fish skin: preliminary results for coloration pattern of red skin Sparidae. *Aquaculture* 258, 211–219.
- Taskaya, L., Cakli, S., Celik, U., 2003. A study on the quality changes of cultured gilthead seabream (*Sparus aurata* L., 1758) and sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) under the market conditions. *EU. J. Fish. Aquatic Sci.* 20, 313–320.
- Tejada, M., Huidobro, A., 2002. Quality of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage related to the slaughter method and gutting. *Eur. Food Res. Technol.* 215, 1–7.

PUBLICACIÓN III:
The effect of partial replacement of fish oil with vegetal oils
in diets on the quality of gilthead seabream (*Sparus aurata*)

The effect of partial replacement of fish oil with vegetal oils in diets on the quality of gilthead seabream (*Sparus aurata*)

A. Álvarez^a, B. García-García^a, R. Fontanillas^b, M.D. Hernández^{a*}

^aIMIDA-Acuicultura. Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia. Apdo. 65. 30740. San Pedro del Pinatar. Murcia. Spain.

^bSkretting Aquaculture Research Center, ARC, Stavanger, Norway.

*e-mail: mdolores.hernandez6@carm.es. Tel/Fax: +34 968184518

Abstract

Farmed gilthead seabream were fed one of two diets containing either 100% fish oil (FO) or a 75% vegetable oil blend (VO) (50/50 mixture of soybean and rapeseed oil) in order to study the effect of the dietary oil source on flesh quality. After slaughter, physical-chemical analyses (Fatty Acids (FAs); flesh color; Water-Holding Capacity (WHC); pH; and Texture Profile Analysis (TPA)) and a sensory analysis were performed. Fish fed either diet displayed similar growth and feed conversion rates (SGR and CI). The fish fed the VO diet showed an increase in muscular *n-6* fatty acids, which resulted in a lower *n-3/n-6* ratio. A lower presence of EPA and DHA fatty acids was also recorded, although the total quantity of *n-3* fatty acids was similar in both groups. With regard to fat quality, the Atherogenic Index (AI) was lower in the VO-diet group, while both groups presented a similar Thrombogenic Index (TI). The diet had some effects on quality parameters, but the changes were not very intense. The differences observed in the *a** and *b** chromatic parameters were not significant, but a greater and significant color saturation in the vegetable oil group was observed. No significant differences in pH and WHC were observed, although WHC values were lower in the VO group. Fish fed the vegetal oil diet also scored higher for hardness, springiness, gumminess and chewiness ($p < 0.05$). The sensory analysis revealed a greater intensity of characteristic odor and flavors, both marine and oil, as well as greater juiciness and an oily flavor for the FO group ($p > 0.05$). In spite of the differences observed for both the fatty acid profile and the quality parameters, these do not appear to have important implications for either health or the sensory properties of gilthead seabream fed a mix of vegetable oils.

Keywords: *Sparus aurata*, quality, soybean oil, rapeseed oil.

1. Introduction

The recommendations that have been made to consume more fish because of its high content of *n-3* series highly polyunsaturated fatty acids (HUFA) has resulted in increased consumption in recent years. According to the latest report issued by the FAO (FAO, 2010), the world fish supply reached a new historical record in 2008, with the aquaculture sector producing nearly half of the fish destined for human consumption.

The raw materials used in the aquaculture sector come mainly from fishing. According to predictions, the use of fish oil as a dietary energy source in the composition of aquaculture feeds will not be financially sustainable over the long-term (Tacon and Metian, 2008). This being the case, the need to find alternative

sources that make up for the future scarcity of raw materials is becoming increasingly more obvious.

Several authors have found that in many species it is feasible to replace certain amounts of fish oil with vegetable oils in the diet without affecting their growth or the feed conversion efficiency (Menoyo et al., 2004; Izquierdo et al., 2005; Fountoulaki et al., 2009), as long as enough essential fatty acids are provided. While the use of fish oil enables the production of farmed fish rich in *n-3* fatty acids, most vegetable oils are relatively poor in these fatty acids. Vegetable oils are rich in *n-6* and *n-9* fatty acid sources (mainly linoleic and oleic acids) with the exception of linseed oil, which is rich in linolenic acid (Turchini et al., 2009). For this reason, many studies over recent years have attempted to evaluate the extent to which diet formulas based on different vegetable oils as part of their lipid sources are capable of reproducing

the fatty acid composition of marine fish oils (Izquierdo et al., 2003; Regost et al., 2003; Torstensen et al., 2005; Fountoulaki et al., 2009; Benedito-Palos et al., 2011; Turchini et al., 2011).

The main disadvantage of modifying the fatty acid profile of the edible portion of fish is the loss of their healthy properties and the benefits associated with its consumption. We must also bear in mind that besides the effect these changes might have on the quality of the product, any alteration in the sensory properties may have a negative effect on its acceptance by consumers. Several studies have examined the changes that occur in different quality parameters according to the different dietary lipid sources (Izquierdo et al., 2003; Regost et al., 2003; Regost et al., 2004; Izquierdo et al., 2005; Montero et al., 2005; Røra et al., 2005; Mørkøre et al., 2007), but so far the available data do not permit drawing any definitive conclusions.

For these reasons, the objective of the present study was to evaluate the effect of the partial replacement of fish oil with vegetable oils in the diet of the gilthead seabream on the quality of the final product.

2. Materials and methods

2.1. Experimental diets

Fish were fed two different diets: a fish oil diet (FO), with fish oil as the only lipid source; and a vegetable oil diet (VO), in which 75% of the fish oil was replaced by oils of a vegetable origin (50% soybean oil and 50% rapeseed oil). The isonitrogenous and isoenergetic diets were manufactured by Skretting ARC, and had a lipid content of about 20% (Table 1). Samples of all diets were subjected to proximate composition (AOAC, 1997) and gross energy (IKA Adiabatic Calorimeter) analyses, and their fatty acid profiles were determined, the results of which are presented in Table 1 and Table 2, respectively.

2.2. Animals and housing

Gilthead seabream were obtained from a fish farm located in southern Spain and transported to the IMIDA aquaculture facilities (San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain). Fish were allowed to acclimate in circular, 850-l tanks, feeding on a commercially available feed for gilthead seabream. Afterwards, the fish were distributed among 450-l cylindro-conical tanks supplied with running seawater (salinity: 37 g·l⁻¹; NO₂⁻: <0.1 mg·l⁻¹; NO₃⁻: <0.1 mg·l⁻¹; NH₃: <0.5 mg·l⁻¹; and pH: 7.7). The tanks were part of a recirculating system equipped with biological filtration, an ultraviolet lamp and a heat pump that controlled the experimental temperature. Dissolved oxygen was measured twice a day and water flowing through each tank was regulated to maintain values above 70-80% saturation, meaning that this parameter was not limiting. Animals were subjected to a controlled

photoperiod (12 h light/12 h dark) and a constant temperature (24.1±1.0°C).

2.3. Experimental design and sampling procedures

Testing conditions included a total of 84 fish (with an initial average weight of 197.2±14.1g), randomly distributed in 6 tanks (14 fish per tank), with each diet being experimentally tested in triplicate. Animals were fed the experimental diets two times a day to apparent satiation, and feed consumption was recorded daily. The experiment lasted 19 weeks (from May to September), until the animals reached commercial size (425.7±42.0g).

Table 1
Ingredients (g·kg⁻¹ diet) and proximate composition analysis of experimental diets (as % of dry matter).

	FO	VO
<i>Ingredients</i>		
Fish meal	200.0	200.0
Wheat gluten	164.1	164.1
Wheat meal	156.5	156.5
Soy bean concentrate	150.0	150.0
Extracted soybean oil	150.0	150.0
Fish oil	158.4	38.4
Rapeseed oil	—	60.0
Soybean oil	—	60.0
Vitamin-mineral premix	20.0	20.0
<i>Proximate composition</i>		
Dry matter	93.3	92.6
Crude protein	46.7	47.3
Crude fat	19.8	18.8
Ash	5.4	5.5
NFE ⁽¹⁾	19.9	19.8
Fiber	1.4	1.3
Gross energy (MJ·kg ⁻¹ of feed)	20.7	20.6

⁽¹⁾ Nitrogen-free extract

The Daily Intake Rate (DIR), Specific Growth Rate (SGR) and Conversion Index (CI) were calculated using the following formulae: DIR = ((feed intake/final body weight)/No. of experimental days); SGR = ((Ln(Final body weight) - Ln(Initial body weight))/ No. of experimental days)*100; and CI = Feed intake/(Final body weight - Initial body weight).

At the end of the experiment, all fish were individually weighed and slaughtered by hypothermia, using a mix of water and ice (1:3). They were later filleted, using fourteen fish from each group for the texture and sensory evaluation, and four for the rest of the analyses.

First, the color of the left side fillets was measured and a piece of fillet was taken for water-holding capacity (WHC) measurements. The fillets of each fish were then homogenized, five grams were used for pH measurements and the rest of muscle was vacuum-packed individually and stored under -80°C until it was analyzed to determine the fatty acid profile.

2.4. Analytical determinations

2.4.1. Fatty acids

Fatty acid methyl esters were obtained directly from feeds and muscle according to the method described by O'Fallon et al. (2007). Samples were hydrolyzed for 1.5 h at 55°C in 1 N KOH in MeOH containing C21:0 as the internal standard (SIGMA-ALDRICH). The KOH was neutralized, and the FFA were methylated by H₂SO₄ catalysis for 1.5 h at 55°C. Hexane was then added to the reaction tube, which was vortex-mixed and centrifuged. The hexane was pipetted into a gas chromatography vial for subsequent gas chromatography. The fatty acid profile was determined after methanolysis in a gas chromatograph (Varian 3900) equipped with a FID detector, and using a 100-m/0.25 mm ID SP™ 2560 column with helium as the carrier gas. The injector and detector temperatures were both kept at 260°C. The column temperature was programmed for an initial temperature of 140°C for 5 min and a final temperature of 240°C at 4°C/min. Fatty acid methyl esters were identified by comparison to external standards (SIGMA-ALDRICH).

Fat quality indices were calculated according to Ulbright and Southgate (1991) as follows: Atherogenic Index (AI) = (12:0 + 4 x 14:0 + 16:0)/(PUFA *n*-3 + PUFA *n*-6 + 18:1 + sum of other MUFA), where PUFA are polyunsaturated fatty acids and MUFA represents monounsaturated fatty acids. Since lauric acid (12:0) was not detected in the samples, it was not taken into account for the calculations. The Thrombogenic Index was calculated as (TI) = (14:0 + 16:0 + 18:0)/0.5 x 18:1 + 0.5 x sum of other MUFA + 0.5 x PUFA *n*-6 + 3 x PUFA *n*-3 + (PUFA *n*-3/PUFA *n*-6).

2.4.2. Flesh quality measurements

A Minolta Chroma Meter CR400 (Minolta, Osaka, Japan) was used for color measurements. Colors were expressed as CIELab coordinates. In this system, *L** denotes lightness on a 0-100 scale of black to white; *a** (+) red or (-) green; *b** (+) yellow or (-) blue. Color intensity is expressed by a chroma value (*C**_{ab}), and hue (*H**_{ab}) is a color as it is found in its pure state on the spectrum, calculated using the formulae: $C^*_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ and $H^*_{ab} = \arctan(b^*/a^*)$, respectively. Three measurements of the left side fillets were taken per individual; two on the dorsal fillet area (D1 and D2), and one on the ventral fillet area (V1) (Figure 1). The

average of the three fillet measurements was then calculated.

Two portions (1x1cm) of the anterior part of left side fillets located next to the head of the animal (Figure 1) were collected to determine Water-Holding Capacity (WHC). This was measured by centrifuging 3g of raw sample for 10 minutes at 3000g at 25 °C and collecting the water in a Whatman filter (n° 540). WHC was expressed as the percentage of retained water/total water in the sample before centrifuging (Tejada and Huidobro, 2002).

Table 2
Fatty acid profile of experimental diets expressed as mg·g⁻¹ of lipid (% of total fatty acids in brackets).

Fatty acid ^a	FO	VO
C14:0	86.7 (7.45)	46.8 (3.33)
C15:0	5.4 (0.47)	3.3 (0.23)
C16:0	230.2 (19.92)	189.5 (13.57)
C17:0	3.7 (0.32)	2.3 (0.17)
C18:0	35.8 (3.06)	36.1 (2.55)
C20:0	2.5 (0.22)	4.4 (0.32)
Σ Saturated	365.8 (31.58)	282.8 (20.18)
C16:1	97.0 (7.80)	49.6 (3.30)
C17:1	12.8 (1.12)	6.2 (0.44)
C18:1 <i>n</i> -9	157.3 (13.82)	393.0 (28.64)
C20:1 <i>n</i> -9	28.9 (2.28)	27.4 (1.79)
C22:1 <i>n</i> -9	39.3 (2.80)	37.9 (2.24)
C24:1 <i>n</i> -9	3.6 (0.31)	3.8 (0.26)
Σ Monounsaturated	338.9 (28.12)	517.9 (36.68)
C18:2 <i>n</i> -6	142.2 (12.84)	340.3 (25.43)
C18:3 <i>n</i> -6	2.2 (0.20)	1.7 (0.13)
C18:3 <i>n</i> -3	21.4 (2.04)	63.7 (5.02)
C20:2	5.6 (0.46)	16.0 (1.08)
C20:4 <i>n</i> -6	11.5 (0.93)	5.3 (0.36)
C22:2	8.0 (0.67)	5.0 (0.35)
C20:5 <i>n</i> -3	159.3 (15.02)	87.5 (6.83)
C22:6 <i>n</i> -3	120.4 (8.15)	70.5 (3.95)
Σ Polyunsaturated	476.7 (40.78)	579.3 (42.42)
Σ <i>n</i> -3	180.7 (17.05)	151.2 (11.85)
Σ <i>n</i> -6	156.0 (13.97)	347.3 (25.91)
Σ <i>n</i> -9	196.6 (16.62)	430.9 (30.88)
<i>n</i> -3/ <i>n</i> -6	1.16 (1.22)	0.44 (0.46)
EPA/DHA	1.32 (1.84)	1.24 (1.73)

^aSome minor fatty acids (<0.1 % of fatty acids) are not shown.

After homogenizing the fillets, five grams of each sample were blended with 15 ml distilled water, and the pH value of the fish homogenate was measured using a

digital pH-meter (ORION, Beverly, MA, USA), standardized at pH 4.01 and 7.00. All analyses were performed in duplicate.

The Texture Profile Analysis (TPA) was conducted using a Texture Analyzer TA-XT2 (Stable Micro Systems, Surrey, England) equipped with a 30 kg load cell and the Texture Exponent 32 data analysis software. The samples were compressed perpendicularly to the fillet, using a 25 mm-diameter cylindrical probe. The testing conditions were: two consecutive cycles of 25% compression; cross-head movement at a constant speed of 50 mm·min⁻¹ and a trigger point of 0.05 N. Texture variables (hardness, springiness, cohesiveness, gumminess, chewiness, adhesiveness, and resilience) were calculated. Measurements were taken on the left side of the fillets, and from the dorsal fillet area (D1) (Figure 1).

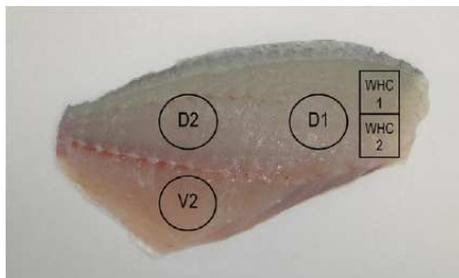


Fig.1. Representation of the areas of seabream fillets where color was measured (D1, D2, and V1) and the portions which were collected for Water Holding Capacity (WHC 1 and 2) tests.

2.4.3. Sensory evaluations

A Quantitative Descriptive Analysis (QDA) was conducted by a 9-member trained panel according to *International ISO Standard* (ISO 8586-1:1993; ISO 4121:2003). Sensory analyses were carried out on thirteen different attributes of odor (characteristic, marine and oily), appearance (color and shine), flavor (characteristic, marine, oily and persistence), and texture (firmness, juiciness, chewiness and fat). A linear non-structured 10-cm scale was established using two fish that represented low and high intensity for each attribute.

The fish were slaughtered the day before the tests were conducted. They were gutted and filleted, and the fillets were stored vacuum-packed in the refrigerator. The samples were prepared in portions of homogeneous size and shape (3 x 2 cm), using only the dorsal part of the animal. This part was divided into three sections: an anterior section, closest to the animal's head; a middle section; and a posterior section, closest to the tail. Each sample was cooked for 10 minutes with no additives in an aluminium container with a lid in an air-heated oven pre-heated to 115°C.

2.5. Statistical analysis

Values throughout this text are expressed as mean ± standard deviation. The data were analyzed using a one-way ANOVA in order to determine the significance of the effect of the diet. A Tukey's test at $p < 0.05$ was used to compare the means.

3. Results

3.1. Growth performance and feed utilization

Both diets were well accepted and no significant differences were found in feed intake at any point during the experimental period (Table 3). The Conversion Index (CI) was similar in both groups, so at the end of feeding period, the growth performance was similar, in terms of both the Specific Growth Rate (SGR) and body weight gain.

3.2. Fatty acid profile

The significant differences observed between the experimental groups in muscular fatty acid composition demonstrated the effect of the different diets (Table 4). The monounsaturated and polyunsaturated fatty acids were more abundant in the muscle of animals fed the VO diet than they were in those fed the FO diet ($p < 0.01$). Of the most abundant monounsaturated fatty acids, palmitoleic acid (C16:1) was present in greater quantities in the FO group ($p < 0.05$) and oleic acid (C18:1n9) in the VO group ($p < 0.001$). With regard to polyunsaturated fatty acids, linoleic (C18:2n6, LA) and linolenic (18:3n3, ALA) acids were more prevalent in the VO group ($p < 0.001$), while eicosapentaenoic (20:5n3, EPA) and docosahexaenoic (22:6n3, DHA) acids were more abundant in the FO group ($p < 0.05$).

Table 3

Effects of dietary fish oil replacement with vegetal oil on seabream growth and nutrient utilization.

	FO	VO	t-Test
Initial body weight (g)	197.33±13.13	197.66±14.86	ns
Final body weight (g)	417.96±39.02	415.46±43.61	ns
DIR	0.69±0.03	0.71±0.06	ns
SGR	0.57±0.07	0.56±0.07	ns
CI	1.75±0.10	1.81±0.20	ns

Mean values of samples±standard deviation.

***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$; ns: not significant.

DIR: Daily Intake Rate; SGR: Specific Growth Rate; CI: Conversion Index.

The differences observed in the prevalent polyunsaturated fatty acids were reflected by the total sums obtained for each series, with the *n-6* and *n-9*

totals being larger in the VO group. The *n*-3 total was larger in the FO group, although these differences were small and statistically insignificant. The *n*-3/*n*-6 ratio in the FO group was more than twice that observed for the VO.

With regard to the estimated fat quality indices, a higher Atherogenic Index value was observed in the FO

group ($p < 0.001$). This difference was due mainly to the larger amount of myristic acid (C14:0) found in the muscle of the animals fed the fish oil diet. The lower overall *n*-6 series fatty acid content in this group also contributed to increasing the atherogenic capacity. The Thrombogenic Index was similar in both experimental groups.

Table 4

Fatty acid profile of gilthead seabream muscle for fish fed the different experimental diets, expressed as mg·g⁻¹ of lipids (% of total fatty acids in brackets).

Fatty acid ^a	FO	VO	t-Test
C14:0	25.26±2.17 (6.40)	20.97±1.83 (4.31)	*
C15:0	1.70±0.10 (0.44)	1.52±0.07 (0.32)	*
C16:0	74.58±2.50 (19.06)	79.47±6.72 (16.49)	ns
C17:0	0.91±0.07 (0.23)	0.90±0.12 (0.19)	ns
C18:0	10.60±0.53 (2.67)	13.36±1.35 (2.73)	*
C20:0	0.46±0.05 (0.12)	0.56±0.02 (0.11)	*
Σ Saturated	113.52±5.29 (28.92)	116.77±9.60 (24.15)	ns
C16:1	38.83±2.70 (9.21)	33.16±2.76 (6.39)	*
C17:1	0.97±0.15 (0.25)	1.22±0.19 (0.26)	ns
C18:1 <i>n</i> -9	77.36±2.89 (20.12)	129.56±11.00 (27.36)	***
C20:1 <i>n</i> -9	5.70±0.80 (1.33)	4.58±1.94 (0.86)	ns
C22:1 <i>n</i> -9	3.41±0.70 (0.72)	4.40±1.26 (0.69)	ns
C24:1 <i>n</i> -9	1.28±0.93 (0.32)	0.94±0.35 (0.19)	ns
Σ Monounsaturated	127.55±5.07 (32.10)	173.85±13.34 (35.86)	**
C18:2 <i>n</i> -6	36.81±4.50 (9.79)	87.80±6.33 (19.04)	***
C18:3 <i>n</i> -6	1.57±0.84 (0.41)	1.60±0.34 (0.34)	ns
C18:3 <i>n</i> -3	6.18±0.82 (1.74)	15.68±1.55 (3.58)	***
C20:2	3.27±0.49 (0.79)	3.62±0.42 (0.71)	ns
C20:4 <i>n</i> -6	3.07±0.15 (1.03)	3.22±0.49 (0.61)	ns
C22:2	7.96±1.62 (1.97)	5.24±1.98 (1.03)	ns
C20:5 <i>n</i> -3	50.55±4.88 (14.12)	41.78±3.51 (9.55)	*
C22:6 <i>n</i> -3	42.00±2.61 (8.39)	35.74±2.42 (5.87)	*
Σ Polyunsaturated	150.39±2.94 (38.42)	190.75±14.22 (40.54)	**
Σ <i>n</i> -3	98.73±1.85 (24.24)	93.45±6.72 (19.03)	ns
Σ <i>n</i> -6	40.43±2.30 (11.42)	91.02±5.69 (19.96)	***
Σ <i>n</i> -9	87.75±3.27 (22.50)	139.47±10.93 (29.10)	***
<i>n</i> -3/ <i>n</i> -6	2.45±0.18 (2.15)	1.02±0.07 (0.94)	***
EPA/DHA	1.21±0.18 (1.69)	1.17±0.02 (1.63)	ns
AI	0.66±0.03	0.46±0.02	***
TI	0.29±0.01	0.27±0.02	ns
Lipid g·kg ⁻¹ d.w.	58.30±3.36	41.03±5.04	**

Mean values of four samples±standard deviation.

***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$; ns: not significant.

^aSome minor fatty acids (<0.1 % of fatty acids) are not shown.

AI: Atherogenic Index; TI: Thrombogenic Index.

No significant differences were found with respect to pH or WHC between the different groups, although the WHC values for the VO group were lower than for the FO group.

3.3. Flesh quality

The results obtained for the quality parameters indicated that the diet had some effects on the color and texture of the fillets (Table 5). The differences observed in the color measurements were significant for the chroma value (C^*_{ab}), which was higher in the VO group. This value indicates the saturation or amount of color, and depends on the values for the a^* and b^* chromatic parameters. A higher average a^* value and a more negative b^* value were observed for the VO *versus* the FO group, albeit these differences were not statistically significant.

The diet was also observed to have an influence on some of the parameters related to texture. Hardness, which represents the maximum force required to compress the sample, was greater in the fillets of animals fed the vegetable oil diet ($p<0.05$). Elasticity, which is related to the capacity of the sample to recover its shape after compression, also showed greater values for this group samples ($p<0.01$). Gumminess and chewiness are directly proportional to hardness, so the differences in these parameters were also significantly higher in the VO group.

Table 5
Quality parameter measurements for seabream fillets from fish fed different experimental diets.

	FO	VO	t-Test
<i>Color measurements</i>			
L^*	38.55±1.17	37.46±0.85	ns
a^*	0.32±0.34	0.64±0.29	ns
b^*	-1.92±0.10	-2.13±0.18	ns
C^*_{ab}	2.24±0.05	2.46±0.12	*
H°_{ab}	0.29±0.53	-0.21±0.18	ns
<i>Chemical analysis</i>			
WHC (%)	89.81±2.05	88.13±1.60	ns
pH	6.09±0.12	6.06±0.11	ns
<i>Texture measurements</i>			
Hardness (g)	2523.48±235.81	2776.19±312.78	*
Springiness	0.93±0.04	0.98±0.03	**
Cohesiveness	2.53±0.41	2.61±0.43	ns
Gumminess (g)	5730.26±1141.48	7145.01±1053.95	**
Chewiness (g)	5873.34±1393.00	6983.15±1389.69	*
Adhesiveness (g·s)	-23.62±6.61	-23.48 ±6.64	ns
Resilience	0.54±0.12	0.50±0.08	ns

Mean values of samples±standard deviation.

***: $p<0.001$; **: $p<0.01$; *: $p<0.05$; ns: not significant.

3.4. Sensory analysis

The sensory analysis revealed some differences in the sensory properties of the gilthead seabream fed the different diets, although these differences were not significant (Table 6). The characteristic odor was perceived with the greatest intensity in the samples of fish that had been fed the fish oil diet. The characteristic, marine and oily flavors, and the persistence of flavor

were perceived more intensely in the FO group. The samples corresponding to the VO group presented a more intense white color. With regard to the texture attributes, "juiciness" and "fatness" were perceived more intensely in the group of animals fed the FO diet, whereas "chewiness" was given a higher score in the VO group.

4. Discussion

The use of vegetable oils as part of the lipid source in diets for farmed fish would seem to be a viable alternative to regulate the consumption of fish oils. Some studies indicate that, like fish oils, vegetable oils may be easily catabolyzed by the fish as a source of energy for growth (Bell et al., 2001; Regost et al., 2004; Ng et al., 2007). However, due to the composition of fatty acids in vegetable oils, their use as an exclusive lipid source is currently limited. The results from the "Researching Alternatives to Fish Oils in Aquaculture" (RAFOA, 2005) Project for gilthead seabream indicate that replacement of up to 60% of fish oil with vegetable oil has no adverse effects on the fish growth or feed conversion. While a significant growth rate reduction was observed with an 80% replacement with linseed oil and a 100% replacement with a mixture of oils, this decrease was not observed in fish weighing more than 250-300g (RAFOA, 2005). In the present study, we used a diet was used in which 75% of the fish oil was replaced with a mixture of soy and rapeseed oils (50/50), and no effect on growth or feed utilization was observed, for fish with an initial weight of 200g until the fish reached a final weight of 400g.

Table 6
Seabream sensory evaluation for each experimental diet.

	FO	VO
Characteristic odor	5.62±1.32	5.44±1.24
Marine odor	4.84±1.46	4.82±1.44
Oily odor	4.80±1.54	4.83±1.54
Color	5.06±0.95	5.21±0.97
Shine	5.27±0.92	5.23±0.97
Characteristic flavor	5.62±1.31	5.48±1.25
Marine flavor	4.99±1.45	4.84±1.44
Oily flavor	5.06±1.46	4.80±1.40
Persistence	5.38±1.46	5.24±1.30
Firmness	5.27±1.22	5.27±1.40
Juiciness	4.88±1.11	4.80±1.13
Chewiness	4.82±1.01	4.92±1.10
Fat	4.86±1.23	4.65±1.20

Mean values of eight samples±standard deviation.
No differences between samples were detected (p>0.05).

Changes in the fatty acid composition of the fish flesh due to the use of dietary vegetable oils in the diets may compromise its nutritional properties and health benefits. Nutritionists all over the world recommend the consumption of fish and seafood products because of their high *n*-3 series HUFA content. Specifically, it is known that EPA and DHA fatty acids are important for the growth and development of newborns and infants,

and in the prevention of chronic cardiovascular diseases, diabetes, cancer and age-related degenerative diseases (Psota et al., 2005; Simopoulos, 2005; Kris-Etherton et al., 2009). According to the Internacional Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL, 1999), the recommended daily consumption of EPA and DHA is 0.22 g·day⁻¹ for adults and recommended consumption of DHA for nursing and pregnant women is 0.30 g·day⁻¹. In the present study, based on the amounts of these fatty acids measured in each of the experimental group, both products would meet these requirements, although the daily intake required would be higher in the case of the VO group (150 and 204.6 g·day⁻¹ for adults and pregnant women, respectively) versus the FO group (89.8 and 122.5 g·day⁻¹ for adults and pregnant women, respectively). These amounts correspond to the 3-4 servings of fish per week. Only in the case of pregnant and nursing women would 6 servings of gilthead seabream from the VO group be required (1432 g of fish per week) to reach the recommended amount of DHA.

Different studies reveal that the diets of our primitive ancestors contained similar amounts of *n*-6 and *n*-3 (in a 1-2:1 ratio), but due to greater consumption of foods with a high *n*-6 fatty acid content, this ratio has increased to levels as high as 15-16.7/1 in Western countries, resulting in serious health problems (Simopoulos, 2006). In light of this situation, the consumption of seafood products with a high *n*-3 content would help reduce the *n*-6/*n*-3 ratio in our diets, making them more balanced. However, fish from aquaculture production consuming feed rich in *n*-6 fatty acids produce products with a higher content of these fatty acids. This being the case, even though the *n*-3 amounts meet the requirements for a balanced diet, they do not foster a reduction in the *n*-6/*n*-3 ratio. In the present study, the differences between animals fed both diets were mainly due to the larger amount of oleic and linoleic fatty acids found in the VO group, which caused an increase in the overall *n*-9 and *n*-6 content, and a lower *n*-3/*n*-6 ratio.

On the other hand, high contents of linoleic and linolenic acids in the flesh have anti-atherogenic and anti-thrombogenic effects (Ulbricht and Southgate, 1991). These authors described atherogenic and thrombogenic indices as indicators of the nutritional quality of the fats found in food. These indices may indicate whether a food is apt for preventing cardiovascular diseases, as they are a measure of the potential capacity of the fats to provoke atheromae and thrombi, respectively, in particularly sensitive people (Gil, 2010); consequently, very low values of AI and TI are recommended for a healthy diet. The C14:0 and C16:0 fatty acids are known to be among the most atherogenic, while C18:0 is thought to be neutral with respect to atherogenicity, but it has thrombogenic properties (Salobir, 2000). The optimal values of these indices have been found in the fish-based diet eaten by the Inuit, which is rich in unsaturated PUFA *n*-3 and presents atherogenic and thrombogenic indices of 0.39 and 0.28,

respectively. These values are very low compared to the indices found in the Danish diet, rich in saturated fat, where the atherogenic and thrombogenic indices are 1.29 and 1.51, respectively (Ulbricht and Southgate, 1991).

In the present study, a higher atherogenic index was observed in the FO group (0.66) as compared to the VO group (0.46) ($p < 0.001$). These differences were mainly due to a greater amount of myristic acid and a smaller amount of *n*-6 series fatty acids in animals fed fish oil as their only lipid source. Similar results were obtained from the calculations made by Grigorakis (2007) based on data provided by other authors regarding the fatty acid profile in the flesh of gilthead seabream (Izquierdo et al., 2005) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Montero et al., 2005; Mourente et al., 2005) fed diets containing different lipid sources. According to these calculations, animals fed a diet in which fish oil was the sole source of lipids had atherogenic indices of 0.62-0.64, whereas animals that were fed diets with vegetable sources of lipids had values in the range of 0.34-0.53. These results indicate that the inclusion of vegetable oils in the diets may represent an advantage, since the lower concentration of atherogenic fatty acids and the higher concentration of *n*-6 PUFAs in animals fed these lipid sources results in a lower atherogenic index of the end product.

From a commercial point of view, the effect of the addition of dietary vegetable oils on product quality is almost as important as its nutritional value. In this sense, the color of both the skin and flesh is very important, as it is a sensory attribute that may influence the consumer's choice of products. In the case of Atlantic salmon (*Salmo salar*), higher redness a^* values have been observed in animals fed diets with fish oil than in those receiving diets with vegetable oils (Regost et al., 2004; Røra et al., 2005). These authors attributed the color differences between dietary groups to greater concentrations of astaxanthin and canthaxanthin observed in animals fed fish oils. Also in Atlantic salmon, a larger content of astaxanthin and higher a^* values were observed in animals fed a diet containing 39% fat as opposed to those fed a diet with 31% fat (Bjerkeng et al., 1997). In this same study, however, no significant differences were observed between the use of diets with fish meal as the only source of proteins and diets with 10% of the fish meal replaced with soy flour. According to Storebakken and No (1992), one possible explanation for this effect is that since carotenoids are soluble in lipids, they are more easily incorporated into lipidic micelles.

In the present study, the results of the fillet color measurements revealed greater color saturation in the flesh of animals fed the VO diet, due to a greater intensity of the red (higher a^* value) and blue (more negative b^* value) colors. Similar results were observed in gilthead seabream fed diets with 80% linseed vegetable oil (Izquierdo et al., 2005). In sea bass, a more intense yellow color was also observed in the group of

animals fed a diet with 60% rapeseed oil as compared to a diet with 100% fish oil (Montero et al., 2005). According to Christiansen et al. (1993), the different types and amounts of PUFA may have an influence on the deposition of carotenoids in the flesh.

Besides the effect on color, the dietary oil source may have an effect on the capacity of the muscle to retain water. The results observed by different authors with regard to this parameter are contradictory. For example, Regost et al. (2004) observed greater water loss in raw salmon fillets from fish fed diets based on capelin oil and low-erucic acid rapeseed oil than diets consisting of Peruvian fish oil and soybean oil. However, in cold-smoked fillets of this same species, Røra et al. (2005) observed greater liquid loss during storage at 4°C in a group of animals that had been fed a diet formulated with pure Peruvian fish oil than in a group fed a diet with pure soybean oil. In Atlantic cod (*Gadus morhua*), however, no differences were observed in terms of liquid loss between the groups fed fish oil and those fed soybean oil (Mørkøre et al., 2007). In the present study, although the differences were not statistically significant, a lower WHC was recorded for the VO group.

According to Lee and Toledo (1976) (in Jonsson et al., 2001), both the amount of water that may be released or mobilized in the muscle and its texture provide measurements of not only the water retention capacity, but also the sensory perception of the fillets juiciness. In our sensory analysis, the samples from the VO group were judged to be less juicy. This may have been due to the greater water loss in this group as the samples were cooked. One of the most important processes that take place during the cooking of fish is the denaturalization of the muscle myofibrillar proteins, which favors the loss of liquid, mainly water (Ofstad et al., 1995; Ofstad et al., 1996).

Besides juiciness, other muscle texture properties may be modified due to a lower WHC. Jonsson et al. (2001) observed a linear correlation between expressible moisture measurements, which are used to estimate the water-holding capacity, and the hardness of the fillet measured with a spherical probe. In the present study, the differences in WHC were very small, but nonetheless, significant differences were observed for some texture parameters. The texture of the fish flesh depended on numerous intrinsic biological factors related to the density of the muscle fibers, as well as the fat and collagen content (Olafsdottir et al., 2004). As a result, the differences observed for the texture parameters measured instrumentally may have been due primarily to the larger amount of fat in the muscle of the animals fed the FO diet (Table 4). Similar results have been observed by different authors, who attribute greater compression resistance (and therefore greater texture parameter values) to a lower fat content in the muscle (Orban et al., 1997; Andersen et al., 1997).

The effect of the use of vegetable lipid sources on the texture of the flesh has been studied by different authors.

Regost et al. (2003) failed to observe any effect of the dietary oil source on the instrumental texture measurements taken on turbot fillets (*Psetta maxima*), albeit the diets used in this study had a low fat content (9%). Røra et al. (2005) also failed to observe any differences in the texture of cold-smoked salmon fillets according to diet. However, in raw salmon fillets, greater firmness was observed in the group of animals fed Peruvian and soybean oil diets than in those fed capelin and rapeseed (Regost et al., 2004). Other studies, in spite of failing to demonstrate a significant effect of the dietary lipid source on the texture parameters, did show certain trends. For example, Montero et al. (2005) observed lower resistance to compression in sea bass fed a diet with 60% rapeseed oil as compared to diets that contained other vegetable oils and the diet with fish oil. In gilthead seabream, a reduction was also observed in the hardness of fillets with the inclusion of vegetable oils in the diet (Izquierdo et al., 2003).

While an instrumental texture analysis provides precise information about the possible effect of the diet on these parameters, it may be interesting to determine whether these differences are large enough to be perceived by the senses. Mørkøre and Einen (2003) observed a good correlation between hardness as scored by sensory analyses and the instrumental texture analysis. In this study, the instrumental texture analysis revealed greater hardness and chewiness for the fillets in the VO group, while these attributes were assessed by a panel of taste testers as having the same intensity in both dietary groups. However, it should be kept in mind that the instrumental texture measurements were taken on raw fillets, while the sensory analysis was performed on cooked samples. As mentioned earlier, during the cooking process, structural changes occur in the flesh as the result of heating, which influences the texture and other sensory parameters associated with its quality.

With regard to the other sensory attributes, the FO group demonstrated a tendency toward greater intensity in characteristic odor and flavors (characteristic, marine, oily and persistence). Similarly, in fresh salmon, the attributes of characteristic odor, marine oily odor and marine oil and rancid flavors were scored as being more intense for the group of animals fed the diet with fish oil as lipid source as compared to the group of animals fed the diet that contained only vegetable oil (Torstensen et al., 2005). These same authors observed significantly higher scores for the flavor intensity of vegetable oil in samples from the group fed the diet containing vegetable oil. For turbot, a greater intensity of characteristic odor was also observed for the group of animals fed the diet with fish oil as compared to those fed vegetable oil diets, although the intensity of the potato odor was assessed as being stronger in the group of animals fed the diet with soybean oil as compared to the diet with fish oil or linseed oil (Regost et al., 2003). In the present study, some taste testers perceived certain odors and flavors related to vegetable oils, but these were not detected

with enough intensity to be described and agreed upon by the entire panel. Certain volatile aldehyde odors derived from the *n*-6 PUFAs have been described as being associated with vegetable oils and products (Spurvey et al., 1998; Sérot et al., 2001). However, the odor thresholds for aldehydes are generally lower than those for other volatile compounds; nonetheless, these compounds may have an important effect on overall flavor (Turchini et al., 2007).

Different authors have observed off-flavors (including earthy and muddy flavors) in samples of animals fed diets containing soybean oil that have not been detected with the inclusion of other oils, such as rapeseed or linseed oils (Izquierdo et al., 2005; Turchini et al., 2007). Turchini et al. (2007) also observed high correlations between the values detected by the panelists for this attribute and the aldehyde measurements derived from the *n*-6 fatty acids and the *n*-6 fatty acid content of the diet. These authors observed larger amounts of volatile aldehydes formed by autoxidation of *n*-3 fatty acids in the flesh of fish fed diets containing larger quantities of these fatty acids, namely diets with 75% and 100% linseed oil, and larger amounts of volatile aldehydes derived from *n*-6 fatty acids with diets containing larger amounts of this type of acids (75% and 100% soybean oil). Based on these results, we can hypothesize that since half of the vegetable source of lipids came from rapeseed oil in the present study, this may have masked the effects on flavor caused by soybean oil.

5. Conclusion

The use of vegetable oils as part of the lipid source in the diet of gilthead seabream modified the fish flesh fatty acid profile, which has certain implications for the health properties of the fish. While the product obtained using the vegetable oil diet meets the requirements for *n*-3 HUFA with an intake level similar to that of the fish oil diet, the greater content of *n*-6 PUFAs in the flesh of the VO group fish did not lead to a decrease in the *n*-6/*n*-3 ratio of the diets. However, the greater contribution of *n*-6, and the smaller amount of saturated atherogenic FAs in the vegetable oil diet resulted in a healthier product in terms of atherogenicity.

With regard to the effect of the dietary lipid source on the quality parameters estimated in the present study, some differences were observed between the experimental groups. These differences, however, were not organoleptically perceived by the panel of taste testers to any significant degree, which leads us to believe that they would not be noticeable to the consumer.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the project "Characterization of quality in farmed fish"

- financed by the Planes Nacionales de Acuicultura of JACUMAR (Spain). The study was also partially sponsored by the IMIDA grant program.
- References**
- Andersen, U. B., Thomassen, M. S., Røra, A. M. B., 1997. Texture properties of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects of diet, muscle fat content and time of storage on ice. *J. Sci. Food Agric.* 74, 347-353.
- AOAC, 1997. Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- Bell, J. G., McEvoy, J., Tocher, D. R., McGhee, F., Campbell, P. J., Sargent, J. R., 2001. Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *J. Nutr.* 131, 1535-1543.
- Benedito-Palos, L., Bermejo-Nogales, A., Karampatos, A. I., Ballester-Lozano, G. F., Navarro, J. C., Diez, A., Bautista, J. M., Bell, J. G., Tocher, D. R., Obach, A., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2011. Modelling the predictable effects of dietary lipid sources on the fillet fatty acid composition of one-year-old gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Food Chem.* 124, 538-544.
- Bjerkeng, B., Refstie, S., Fjalestad, K. T., Storebakken, T., Rødbotten, M., Roem, A. J., 1997. Quality parameters of the flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as affected by dietary fat content and full-fat soybean meal as a partial substitute for fish meal in the diet. *Aquaculture* 157, 297-309.
- Christiansen, R., Waagbø, R., Torrissen, O. J., 1993. Effects of polyunsaturated fatty acids and vitamin E on flesh pigmentation in Atlantic salmon (*Salmo salar*), in: Kaushik, S. J., Luquet, P. (Eds.), *Fish nutrition in practice*. INRA Les Colloques, Paris, pp. 339-343.
- FAO, 2010. State of world fisheries and aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. Rome. 18 pp.
- Fountoulaki, E., Vasilaki, A., Hurtado, R., Grigorakis, K., Karacostas, I., Nengas, I., Rigos, G., Kotzamanis, Y., Venos, B., Alexis, M. N., 2009. Fish oil substitution by vegetable oils in commercial diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.); effects on growth performance, flesh quality and fillet fatty acid profile. Recovery of fatty acid profiles by a fish oil finishing diet under fluctuating water temperatures. *Aquaculture* 289, 317-326.
- Gil, A., 2010. Tratado de Nutrición, segunda ed. Tomo II: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos. Editorial Médica Panamericana, Spain, pp. 572-573.
- Grigorakis, K., 2007. Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture* 272, 55-75.
- International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL, 1999). <http://www.issfal.org/statements/pufa-recommendations>.
- ISO 8586-1 (1993). Sensory analysis. General guidance for the selection, training and monitoring of assessors. Part 1: Selected assessors. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland.
- ISO 4121 (2003). Sensory analysis. Guidelines for the use of quantitative response scales. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland.
- Izquierdo, M. S., Obach, A., Arantzamendi, L., Montero, D., Robaina, L., Rosenlund, G., 2003. Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquacult. Nutr.* 9, 397-407.
- Izquierdo, M. S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M. J., Rosenlund, G., Ginés, R., 2005. Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture* 250, 431-444.
- Jonsson, A., Sigurgisladottir, S., Hafsteinsson, H., Kristbergsson, K., 2001. Textural properties of raw Atlantic salmon (*Salmo salar*) filets measured by different methods in comparison to expressible moisture. *Aquacult. Nutr.* 7, 81-89.
- Kris-Etherton, P. M., Grieger, J. A., Etherton, T. D., 2009. Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 81, 99-104.
- Lee, C.M., Toledo, R.T., 1976. Factors affecting textural characteristics of cooked comminuted fish muscle. *J. Food Sci.* 41, 391-397.
- Menoyo, D., Izquierdo, M. S., Robaina, L., Ginés, R., Lopez-Bote, C. J., Bautista, J. M., 2004. Adaptation of lipid metabolism, tissue composition and flesh quality in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to the replacement of dietary fish oil by linseed and soyabean oils. *Br. J. Nutr.* 92, 41-52.
- Montero, D., Robaina, L., Caballero, M. J., Ginés, R., Izquierdo, M. S., 2005. Growth, feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils: A time-course study on the effect of a re-feeding period with a 100% fish oil diet. *Aquaculture* 248, 121-134.
- Mørkøre, T., Einen, O., 2003. Relating sensory and instrumental texture analyses of Atlantic salmon. *J. Food Sci.* 68, 1492-1497.
- Mørkøre, T., Netteberg, C., Johnsson, L., Pickova, J., 2007. Impact of dietary oil source on product quality of farmed Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture* 267, 236-247.
- Mourente, G., Good, J.E., Bell, J.G., 2005. Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oil in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects on flesh fatty acid

- composition, plasma prostaglandins E₂ and F_{2a}, immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquacult. Nutr.* 11, 25-40.
- Ng, W. K., Tocher, D. R., Bell, J. G., 2007. The use of palm oil in aquaculture feeds for salmonid species. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109, 394-399.
- O'Fallon, J. V., Busboom, J. R., Nelson, M. L., Gaskins, C. T., 2007. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. *J. Anim. Sci.* 85, 1511-1521.
- Ofstad, R., Kidman, S., Myklebust, R., Olsen, R. L., Hermansson, A. M., 1995. Liquid-holding capacity and structural changes in comminuted salmon (*Salmo salar*) muscle as influenced by pH, salt and temperature. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28, 329-339.
- Ofstad, R., Kidman, S., Myklebust, R., Olsen, R. L., Hermansson, A. M., 1996. Factors influencing liquid-holding capacity and structural changes during heating of comminuted cod (*Gadus morhua* L.) muscle. *Lebensm. Wiss. Technol.* 29, 173-183.
- Olafsdottir, G., Nesvadba, P., Di Natale, C., Careche, M., Oehlenschläger, J., Tryggvadottir, S. V., 2004. Multisensors for fish quality determination. *Trends Food Sci. Tech.* 15, 86-93.
- Orban, E., Sinesio, F., Paoletti, F., 1997. The functional properties of the proteins, texture and the sensory characteristics of frozen sea bream fillets (*Sparus aurata*) from different farming systems. *Lebensm. Wiss. Technol.* 30, 214-217.
- Psota, T. L., Gebauer, S. K., Kris-Etherton, P., 2005. Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. Doi:10.1016/j.amjcard.2005.12.022.
- RAFOA, 2005. Researching Alternatives to Fish Oils in Aquaculture (RAFOA). The Fifth EU Framework Programme-DG Research, Quality of Life and Management of Living Resources.
- Regost, C., Arzel, J., Cardinal, M., Rosenlund, G., Kaushik, S. J., 2003. Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in Turbot (*Psetta maxima*). 2. Flesh quality properties. *Aquaculture* 220, 737-747.
- Regost, C., Jakobsen, J. V., Røra, A. M. B., 2004. Flesh quality of raw and smoked fillets of Atlantic salmon as influenced by dietary oil sources and frozen storage. *Food Res. Int.* 37, 259-271.
- Røra, A. M. B., Birkeland, S., Hultmann, L., Rustad, T., Skåra, T., Bjerkeng, B., 2005. Quality characteristics of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets high in soybean or fish oil as affected by cold-smoking temperature. *LWT* 38, 201-211.
- Salobir, K. 2000. Nutritional role of meat, in: Proceedings of the second conference on the importance of meat in nutrition and health (pp. 171-185). Portorož: Biotechnical Faculty.
- Sérot, T., Regost, C., Prost, C., Robin, J., Arzel, J., 2001. Effect of dietary lipid sources on odour-active compounds in muscle of turbot (*Psetta maxima*). *J. Sci. Food Agric.* 81, 1339-1346.
- Simopoulos, A. P., 2005. Omega-3 polyunsaturated fatty acids, in: Caballero, B., Allen, L., Prentice, A. (Eds.), *Encyclopedia of Human Nutrition*, second ed. Elsevier, Oxford, pp.205-219.
- Simopoulos, A. P., 2006. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed. Pharmacother.* 60, 502-507.
- Spurvey, S., Pan, B. S., Shahidi, F., 1998. Flavour of shellfish, in: Shahidi, F. (Ed.), *Flavor of meat, meat products and seafoods*. Blackie Academic and Professional, London, pp. 159-196.
- Storebakken, T., No, H. K., 1992. Pigmentation of rainbow trout. *Aquaculture* 100, 209-229.
- Tacon, A. G. J., Metian, M., 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. *Aquaculture* 285, 146-158.
- Tejada, M., Huidobro, A., 2002. Quality of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage related to the slaughter method and gutting. *Eur. Food Res. Tech.* 215, 1-7.
- Torstensen, B. E., Bell, J. G., Rosenlund, G., Henderson, R. J., Graff, I. E., Tocher, D. R., Lie, O., Sargent, J. R., 2005. Tailoring of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) flesh lipid composition and sensory quality by replacing fish oil with a vegetable oil blend. *J. Agric. Food Chem.* 53, 10166-10178.
- Turchini, G. M., Moretti, V. M., Mentasti, T., Orban, E., Valfrè, F., 2007. Effects of dietary lipid source on fillet chemical composition, flavour volatile compounds and sensory characteristics in the freshwater fish tench (*Tinca tinca* L.). *Food Chem.* 102, 1144-1155.
- Turchini, G. M., Torstensen, B. E., Ng, W. K., 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture* 1, 10-57.
- Turchini, G. M., Francis, D. S., Keast, R. S. J., Sinclair, A. J., 2011. Transforming salmonid aquaculture from a consumer to a producer of long chain omega-3 fatty acids. *Food Chem.* 124, 609-614.
- Ulbricht, T. L. V., Southgate, D. A. T., 1991. Coronary heart disease: seven dietary factors. Review article. *The Lancet* 338, 985-992.

PUBLICACIÓN IV:
Impact of dietary oil source on the shelf-life of gilthead
seabream (*Sparus aurata*)

Impact of dietary oil source on the shelf-life of gilthead seabream (*Sparus aurata*)

A. Álvarez^a, B. García-García^a, R. Fontanillas^b, M.D. Hernández^{a*}

^aIMIDA-Acuicultura. Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia. Apdo. 65. 30740. San Pedro del Pinatar. Murcia. Spain.

^bSkretting Aquaculture Research Center, ARC, Stavanger, Norway.

*e-mail: mdolores.hernandez6@carm.es. Tel/Fax: +34 968184518

Abstract

Gilthead seabream were fed one of two diets containing either 100% fish oil (FO) or a 75% vegetable oil blend (VO) (50/50 soybean and rapeseed oil) in order to study their effect on shelf-life. The whole fish were stored in refrigeration for 0, 7, 14 and 21 days. Physical-chemical analyses (Fatty Acids (FAs); flesh color; Water-Holding Capacity (WHC); pH; and 2-Thiobarbituric Acid-Reactive Substances (TBARS)), microbiology analyses and sensory evaluation were performed. Smaller amounts of EPA and DHA were observed in the muscle of fish that had been fed the VO diet ($p < 0.001$). An increase in SFA was observed in both groups with time in storage ($p < 0.05$), however, this occurred later in the VO group. Both groups demonstrated deterioration over time with regard to the a^* parameter ($p < 0.01$), with the redness values from the VO group being higher throughout the entire storage period ($p < 0.05$). WHC was higher for the VO group during the storage period ($p < 0.001$). TBARS values were lower for the VO group throughout the entire storage period ($p < 0.001$). No significant differences were found in the quality index or in the mesophilic count. Therefore, vegetable oil replacing fish oil not significantly affect to the shelf-life of seabream in refrigerated.

Keywords: *Sparus aurata*, ice-storage, shelf-life, fish oil, vegetable oil.

1. Introduction

Stimulated by the well-known problem of achieving a sustainable supply of the fish meals and oils needed to maintain the growing aquaculture production of carnivorous species, research on the use of diets based on alternative raw materials have become increasingly important in recent years. In the case of gilthead seabream, it has been observed that a 60% replacement of fish oil by soy, rapeseed and linseed oils does not compromise either their growth or their feed utilization (Izquierdo, Obach, Arantzamendi, Montero, Robaina & Rosenlund, 2003; Menoyo, Izquierdo, Robaina, Ginés, López-Bote & Bautista, 2004; Izquierdo, Montero, Robaina, Caballero, Rosenlund & Ginés, 2005). More recent data showed that even total substitution (100%) of fish oil with vegetable oils (rapeseed, linseed and palm oil) in plant protein-rich diets of gilthead seabream exhibited excellent growth rates (Benedito-Palos, Navarro, Sitjà-Bobadilla, Bell, Kaushik & Pérez-Sánchez, 2008). After Fountoulaki et al. (2009) also failed to observe any detrimental effects on growth or feed utilization with a 69% replacement of fish oil by soy and rapeseed oils, although they did observe this with palm oil.

Another extremely important aspect to bear in mind when evaluating the use of vegetable sources is their effect on the quality of the final product, as well as the implications that these may have for human health. In this sense, the composition of fatty acids that give fish its beneficial properties, such as long-chain $n-3$ series PUFA (for example, EPA and DHA), may be adversely affected by the high ratio of $n-6/n-3$ characteristic of vegetable oils (Turchini, Torstensen & Ng, 2009). Numerous studies have shown how replacing part or all of the fish oil with vegetable oils can modify the fatty acid profile of the flesh both in gilthead seabream (Izquierdo et al., 2003; Izquierdo et al., 2005; Benedito-Palos et al., 2008; Fountoulaki et al., 2009; see Nasopoulou & Zabetakis, 2012) as in other species (Izquierdo et al., 2003; Røra, Regost & Lampe, 2003; Regost, Arzel, Robin, Rosenlund & Kaushik, 2003; Regost, Jakobsen & Røra, 2004; Montero, Robaina, Caballero, Ginés & Izquierdo, 2005; Torstensen et al., 2005; Turchini, Francis, Keast & Sinclair, 2011; see Nasopoulou & Zabetakis, 2012).

These variations in the fatty acid profiles may in turn alter other quality parameters associated with the sensory characteristics of fish. Some studies show the effect of different dietary oil sources in texture, color,

flavour volatile compounds and sensory perception in sea bream (Izquierdo et al., 2003; Izquierdo et al., 2005; Fountoulaki et al., 2009) and other species (Izquierdo et al., 2003; Montero et al., 2005; Turchini et al., 2003; Turchini, Moretti, Mentasti, Orban & Valfrè, 2007; Bjerkeng, Refstie, Fjalestad, Storebakken, Rødbotten & Roem, 1997; Regost et al., 2003). In addition, the stability of these properties over time in storage is almost as important as the quality of the end product. Variations in the fatty acid profiles caused by both the dietary composition and storage, and the combined effect of both factors, may in turn alter the quality parameters. Several authors have studied modifications that may occur, by the use of different dietary oil sources, on the quality of raw and smoked fillets of Atlantic salmon (Røra et al., 2003; Regost et al., 2004; Røra, Birkeland, Hultmann, Rustad, Skåra & Bjerkeng, 2005), Atlantic cod (Mørkøre, Netteberg, Johnsson & Pickova, 2007) and red hybrid tilapia (*Oreochromis sp*) (Ng & Bahurmiz, 2009) in fresh or frozen.

In the Mediterranean countries, the gilthead seabream is primarily sold fresh, whole and not drawn, and is stored under refrigeration with ice until the time of sale. While, quality changes and deterioration in these conditions have been described by many authors (Alasalvar, Taylor, Öksüz, Garthwaite, Alexis & Grigorakis, 2001; Tejada & Huidobro, 2002; Grigorakis, Taylor & Alexis, 2003; Lougovois, Kyranas & Kyrana, 2003; Kilinc, Cakli, Cadum, Dincer & Tolasa, 2007), to our knowledge, the effect of source of dietary lipids has not been studied. Castro, Caballero, Millán, Ginés, Montero & Izquierdo (2010) studied the effect of linseed oil inclusion in diets on fatty acid composition during ice storage of sea bream, but these authors did not analyze changes in other quality parameters. For these reasons, the objective of the present study was to evaluate the effect of including a mixture of vegetable oils in the diet on the quality and safety parameters (physical-chemical, microbiological and sensory) of commercial-sized gilthead seabream during storage on ice.

2. Materials and methods

2.1. Experimental diets

Fish were fed two different diets: a fish oil diet (FO), with fish oil as the only lipid source; and a vegetable oil diet (VO), in which 75% of the fish oil was replaced by oils of a vegetable origin (50% soybean oil and 50% rapeseed oil). The isonitrogenous and isoenergetic diets were manufactured by Skretting ARC, and had a lipid content of about 20%. Samples of all diets were subjected to proximate composition (AOAC, 1997) and gross energy (IKA Adiabatic Calorimeter) analyses, and their fatty acid profiles were determined. Both the results of these analyses as the ingredients of the diets are presented in Álvarez et al. (data not published to date).

2.2. Animals and housing

Gilthead seabream were obtained from a fish farm located in southern Spain and transported to the IMIDA aquaculture facilities (San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain). Fish were allowed to acclimate in circular 850-l tanks, feeding with a commercially-available feed intended for gilthead seabream. The animals needed a period of two weeks to adapt to the conditions found at the installations. After this period they began to eat regularly, reaching an adequate ingestion rate for their body weight. Afterwards, the fish were distributed among 450-l cylindrical tanks supplied with running seawater (salinity: 37 g·l⁻¹; NO⁻²: <0.1 mg·l⁻¹; NO⁻³: <0.1 mg·l⁻¹; NH₃: <0.5 mg·l⁻¹; and pH: 7.7). The tanks were part of a recirculating system equipped with biological filtration, an ultraviolet lamp and a heat pump that controlled the experimental temperature. Dissolved oxygen was measured twice a day and the water flowing through each tank was regulated to maintain values above 70-80% saturation, meaning that this parameter was not limiting. Animals were subjected to a controlled photoperiod (12 h light/12 h dark) and constant temperature (24.1±1.0°C).

Testing conditions included a total of 84 fish (with an initial average weight of 197.2±14.1 g), randomly distributed in 6 tanks (14 fish per tank), with each diet being experimentally tested in triplicate (three tanks per treatment). Animals were fed the experimental diets twice a day to apparent satiation, and feed consumption was recorded on a daily basis. The experiment lasted 19 weeks (from May to September), when the animals reached commercial size (425.7±42.0 g).

At the end of the experiment, all fish were individually weighed and 16 fish per diet were slaughtered by hypothermia, using a mixture of water and ice (1:3). These were chosen from among the three tanks belonging to each experimental group (five fish from two of the tanks and six from the other).

2.3. Experimental design and sampling procedures

The whole ungutted fish were stored in refrigeration at 4±1°C for 0, 7, 14 and 21 days. They were placed in polystyrene boxes provided with outlets for water drainage and covered with flaked ice inside a plastic bag, maintaining the ice/fish ratio (1:1) constant throughout the storage period. At each point during the sampling, four fish from each group were used for the analyses. First, the sensory evaluation was performed. Then the fish were filleted. The whole right fillets were used for the microbiology analysis. The color of the left side fillets was measured and a piece of this fillet was taken for Water-Holding Capacity (WHC) measurements (Figure 1). Then the rest of the left fillet was homogenized in order to conduct the remaining analyses (fatty acids, pH, and TBARS).

2.4. Analytical determinations

2.4.1. Fatty acid profile

Fatty acid methyl esters were obtained directly from feeds and muscle according to O'Fallon, Busboom, Nelson and Gaskins (2007). Samples were hydrolyzed for 1.5 h at 55°C in 1 N KOH in MeOH. The KOH was neutralized, and the FFA were methylated by H₂SO₄ catalysis for 1.5 h at 55°C. Hexane was then added to the reaction tube, which was vortex-mixed and centrifuged. The hexane was pipetted into a gas chromatography vial for subsequent gas chromatography. The fatty acid profile was determined after methanolysis in a gas chromatograph (Varian 3900) equipped with a FID detector, and using a 100-m/0.25mm ID SPTM 2560 column with helium as the carrier gas. The injector and detector temperatures were both kept at 260°C. The column temperature was set at an initial temperature of 140°C for 5 min and a final temperature of 240°C at 4°C/min. Fatty acid methyl esters were identified by comparison to external standards (SIGMA-ALDRICH).

2.4.2. Color measurements

A Minolta Chroma Meter CR400 (Minolta, Osaka, Japan) was used for color measurements. Colors were expressed as CIE Lab coordinates. In this system, *L** denotes lightness on a 0-100 scale of black to white; *a** (+) red or (-) green; *b** (+) yellow or (-) blue. Color intensity is expressed by chroma value (*C**_{ab}), while hue (*H*^o_{ab}) describes a color as it is found in its pure state on the spectrum. Both features were calculated using the formulae: $C^*_{ab} = (a^2 + b^2)^{1/2}$ and $H^o_{ab} = \arctan(b^*/a^*)$, respectively. Three color measurements of the left side fillets were performed per individual; two on the dorsal fillet area (D1 and D2), and one on the ventral fillet area (V1) (Figure 1), and the average of the three fillet measurements was calculated.

2.4.3. Physical-chemical analyses

Two portions (1x1cm) of the anterior part of the fillets located next to the head of the animal (Figure 1) were collected to determine Water-Holding Capacity (WHC). This was measured by centrifuging 3g of raw sample for 10 minutes at 3000g at 25 °C and collecting the water in Whatman filter (n° 540). WHC was expressed as percentage of retained water/total water in the sample before centrifuging (Tejada & Huidobro, 2002).

Five grams of each fish were blended with 15 ml distilled water, and the pH value of the fish homogenate was measured using a digital pH-meter (ORION, Beverly, MA, USA), standardized at pH 4.01 and 7.00.

2-Thiobarbituric Acid-Reactive Substances (TBARS, mg malonaldehyde·kg⁻¹ fish flesh) were determined according to the method used by Botsoglou, Fletouris,

Papageorgiou, Vassilopoulos, Mantis and Trakatellis (1994).

All analyses were performed in duplicate.

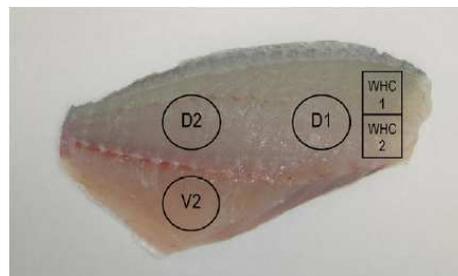


Fig.1. Representation of the areas on seabream fillets where color was measured (D1, D2, and V1) and the portions which were collected for Water-Holding Capacity (WHC 1 and 2) tests.

2.4.4. Microbiological analysis

For microbiological counts, 10 g of sample were transferred in 90 ml of 0.1% peptone-water (Oxoid code CM 9), and homogenized with a stomacher (IUL-Instruments, Barcelona, Spain). From this dilution, other decimal dilutions were prepared and plated on the appropriate media. Total aerobic viable bacterial counts were determined by the pour plate method, using plate count agar (PCA, Oxoid code CM 325). The inoculated plates were incubated at 30°C for 72 hours for total viable mesophilic counts, and at 15°C for 5 days for psychrophilic counts. For *Enterobacteriaceae*, the sample was inoculated into 10 ml of molten (45°C) violet red bile glucose agar (VRBGA, Oxoid code CM 485). After setting, a 10 ml overlay of molten medium was added. In the case of the former sample, incubation was carried out at 37°C for 24 hours. Large colonies with purple haloes were counted. A chromogenic medium (Oxoid code CM 956) was used for culturing coliform/*E.coli* bacteria, with incubation at 37°C for 24 hours. In the case of *Pseudomonas*, cetrimide fusidin cephaloridine agar (CFC, Oxoid code CM 559, supplemented with SR 102) was used and incubated at 20°C for 2 days.

Microbiological data were transformed into logarithms of the number of colony-forming units (cfu·g⁻¹). All plates were visually examined for typical colony types and morphology characteristics associated with each growth medium. All counts were performed in duplicate.

2.4.5. Sensory assessment

A sensory analysis was performed using the Quality Index Method (QIM) developed for raw gilthead seabream by Huidobro, Pastor and Tejada (2000) as a reference, and the procedure for this species followed by González-Cortés, Penedo, Millán, Sanjuán and

Estupiñán (2000) in accordance with current legislation (96/2406/EC). Six experienced panelists evaluated the external appearance (shine and color of the skin, slime, and surface roughness), the muscular condition (springiness and firmness), body odor and the appearance of the eyes (shape and clarity) and gills (color and odor) for four animals from each group. A total of eleven parameters were evaluated in such a way that each sensory characteristic that was modified during storage was scored on a continuous scale of 1 to 5 demerit points (Table 1). This method gives scores of one for very fresh fish, with increasingly higher scores as the fish deteriorate. The sum of the scores given for each parameter is the final Quality index.

2.5. Statistical analysis

Values throughout this text are expressed as mean±standard deviation. The data were analyzed using a factorial ANOVA in order to determine the significance of the effects of storage time, diet and the interaction. A Tukey's test at $p<0.05$ was used to compare the means. A regression analysis was used to determine the shelf-life of seabream; the data were fitted using a linear model, $Y=a+bX$, where Y represents the Quality Index, and X is the storage time. The significance of the linear regression was analyzed using a Chow test (Chow, 1960).

Table 1
Attribute scale for seabream (*Sparus aurata*) sensory evaluation during ice storage.

Parameter	Defined characteristic	Demerit points
<i>Appearance</i>		
Skin shine	Very shiny	1
	Waxy shine	3
	Matte	5
Skin color	Bright, iridescent pigmentation, white-silver	1
	Pigmentation in process of discoloration	3
	Dull pigmentation	5
Slime	Clear-transparent	1
	Cloudy	3
	Milky-yellowish	5
Surface	Smooth	1
	Noticeable roughness on the tail, sunken bellies	3
	Very rough, very sunken bellies	5
<i>Flesh</i>		
Springiness	Very elastic, not mark left when poked	1
	None, mark left when poked	5
Firmness	Very hard	1
	Very soft	5
<i>Body odor</i>	Like fresh fish	1
	Neutral	3
	Like spoiled fish	5
<i>Eyes</i>		
Clarity	Clear-translucent, black and shiny pupil	1
	Opaque	3
	Bloodshot opaque	5
Shape	Convex	1
	Flat	3
	Concave	5
<i>Gills</i>		
Color	Red-pink	1
	Dark red	2
	Discoloration, shades of ochre	3
	Brown	4
	Brown-greenish	5
Odor	Fresh	1
	Neutral	3
	Like spoiled fish	5

3. Results

3.1. Fatty acids

The fatty acid composition of the flesh of animals fed each of the experimental diets is shown in Table 2. The group of animals fed the FO diet showed higher levels of saturated fatty acids (SFAs) than the VO group ($p < 0.001$). Variations were also observed over storage time for almost all the SFAs, as well as for their sum overall total ($p < 0.05$). Of the most predominant saturated fatty acids, myristic acid (C14:0) showed an increase during the second week ($p < 0.01$), and stearic acid (C18:0) increased during the first week ($p < 0.05$) in both groups. In the FO group, an increase in SFAs was noted during the first week, from an average value of 28.9 on day 0 to 30.9 on day 7, with the values subsequently remaining within the range of 30.7-31.0 until the end of storage. In the VO group, the increase in SFAs occurred during the last week, increasing from values of 24.2-24.5 during the first two weeks to an average value of 24.9 on day 21.

With regard to unsaturated fatty acids, significantly higher percentages of monounsaturated (MUFAs) and polyunsaturated (PUFAs) fatty acids, as well as *n*-6 and *n*-9 series fatty acids, were observed in the VO animal group ($p < 0.001$); mainly the content of linoleic (C18:2n6) and oleic (C18:1n9) fatty acids. The reduction of C18:1n9 fatty acids in the VO group and C24:1n9 fatty acids in the FO group during the second week of storage led to changes over time from the total amount of *n*-9 fatty acids ($p < 0.001$).

The total levels of *n*-3 fatty acids and eicosapentaenoic (20:5n3, EPA) and docosahexaenoic (22:6n3, DHA) acids were higher in the FO group ($p < 0.001$). DHA levels and the EPA/DHA ratio significantly varied over time in both groups ($p < 0.05$). In the FO group, lower percentages of DHA were observed on day 0 compared to the rest of the days, whereas in the VO group, these values increased during the first week and then decreased. The changes in DHA were accompanied by variations in the percentages of EPA ($p > 0.05$), in such a way that as one increased, the other decreased and vice versa.

3.2. Color

The color measurements taken from the gilthead seabream fillets (Table 3) showed significant variations over storage time for all parameters, and with diet for chromatic parameters ($p < 0.01$). In both groups, the L^* values were lower on day 0 compared to the rest of the days. For this parameter, a significant interaction was also observed ($p < 0.001$). L^* increased during the first week of storage in the FO group; starting at values of 37.09 on day 0, it reached 43.72 on day 7, decreased during the second week and then remained constant until the end of storage. In the VO group, the initial values for

which were comparable to those of the FO group, the increase in L^* occurred during the first two weeks, reaching its maximum value on day 14 (42.69). L^* subsequently displayed a tendency to decrease until reaching values similar to those of the FO group at the end of the storage period.

The a^* parameter values tended to be close to 0 over time ($p < 0.01$) in both groups, with the values from the VO group being higher than those from the FO group throughout the entire storage period ($p < 0.05$). With regard to b^* , in addition to the significant changes over time ($p < 0.001$) and diet ($p < 0.05$), an interaction was observed between both variables ($p < 0.01$). The b^* value initial was less negative for the VO group than for the FO group. After, the b^* value of the VO group showed a tendency towards more negative values during the first week in storage and then remaining unchanged until the end of storage, with values similar to those of the FO group.

3.3. Chemical analyses

Table 3 shows the values for the chemical parameters analyzed during the storage period for gilthead seabream fed the different diets. In both groups, a lower Water-Holding Capacity (WHC) was observed on day 0 of storage compared to the following days ($p < 0.001$). During the later weeks, this parameter remained unchanged, with higher values for the VO group than for the FO group ($p < 0.001$).

pH increased in both groups over the first week in storage ($p < 0.001$). During the following two weeks, the values remained between 6.28 and 6.38 for the FO group and between 6.26 and 6.39 for the VO group, with no significant variations over time.

With regard to the TBA test results, the animals fed the FO diet demonstrated higher malonaldehyde (MDA) values (0.24-0.45 mg MDA·kg⁻¹) than the VO group (0.15-0.28 mg MDA·kg⁻¹) throughout the storage period ($p < 0.001$), but there was no clear trend to increase over time in any of the experimental groups.

3.4. Microbiological analysis

Microbial growth (Table 3) was significant over time in both dietary groups for all counts ($p < 0.001$), except for coliforms, the counts for which were < 1 throughout the storage period. Aerobic mesophile growth occurred during the first week without differences between groups. The growth of aerobic psychrophiles and *Pseudomonas* happened during the second week, whose counts were significantly lower in the FO group than those of the VO group on day 14. *Enterobacteriaceae* were not detected until day 21 of storage, with counts of 3.36 and 3.30 log cfu·g⁻¹.

Table 2
Fatty acid profile of gill-head seabream muscle during ice storage for fish fed the different experimental diets expressed as % of total fatty acids.

Storage Diet	D0		D7		D14		D21		Storage Diet	Storage x Diet
	FO	VO	FO	VO	FO	VO	FO	VO		
C14:0	6.22±0.45	4.31±0.11	6.31±0.39	3.80±0.49	7.16±0.66	4.74±0.29	6.63±0.41	4.39±0.19	**	***
C15:0	0.42±0.03	0.32±0.01	0.49±0.03	0.28±0.03	0.50±0.04	0.42±0.02	0.47±0.02	0.37±0.02	***	***
C16:0	19.10±0.11	16.49±0.71	19.90±0.54	16.78±0.86	20.04±1.16	16.22±0.46	19.98±0.41	16.81±0.40	ns	***
C17:0	0.23±0.01	0.19±0.02	0.25±0.02	0.19±0.01	0.25±0.04	0.18±0.01	0.25±0.01	0.19±0.01	ns	***
C18:0	2.83±0.32	2.73±0.15	3.46±0.41	3.27±0.66	2.93±0.54	2.59±0.29	3.22±0.40	3.08±0.05	*	ns
C20:0	0.12±0.01	0.11±0.01	0.14±0.02	0.15±0.03	0.10±0.01	0.10±0.01	0.12±0.01	0.11±0.01	***	ns
∑ SFA	28.92±0.25	24.15±0.76	30.90±0.51	24.48±1.17	30.97±1.74	24.25±0.68	30.67±0.63	24.94±0.61	*	ns
C16:1n-7	9.18±0.45	6.39±0.28	9.02±0.25	5.64±0.70	9.71±0.62	6.90±0.17	9.50±0.44	6.24±0.07	**	***
C17:1n-7	0.24±0.03	0.26±0.03	0.21±0.06	0.25±0.02	0.29±0.01	0.16±0.01	0.25±0.03	0.26±0.01	ns	ns
C18:1n-9	20.53±0.81	27.36±0.83	20.59±0.62	27.47±0.90	20.23±1.26	24.96±0.87	21.06±1.02	26.53±1.04	*	***
C20:1n-9	1.37±0.16	0.86±0.34	0.92±0.61	1.05±0.14	1.10±0.11	0.88±0.06	1.20±0.08	1.05±0.03	ns	ns
C22:1n-9	0.69±0.12	0.69±0.35	0.99±0.13	0.46±0.36	0.96±0.41	0.61±0.08	0.92±0.16	0.64±0.12	ns	ns
C24:1n-9	0.28±0.22	0.19±0.07	0.47±0.23	0.20±0.12	0.10±0.05	0.15±0.05	0.18±0.03	0.15±0.03	*	ns
∑ MUFA	32.42±0.70	35.86±0.86	32.88±0.52	35.18±1.11	32.58±1.64	33.79±0.99	33.26±1.15	34.97±1.14	ns	***
C18:2n-6	9.59±0.80	19.04±1.26	9.58±0.88	18.90±0.97	9.59±0.62	18.60±0.66	9.55±0.20	18.68±0.52	ns	***
C18:3n-6	0.37±0.21	0.34±0.05	0.23±0.01	0.32±0.05	0.24±0.02	0.30±0.05	0.25±0.04	0.33±0.11	ns	ns
C18:3n-3	1.72±0.15	3.58±0.24	1.59±0.10	3.35±0.19	1.56±0.09	3.57±0.17	1.57±0.08	3.39±0.14	ns	***
C20:2n-6	0.79±0.10	0.71±0.05	0.69±0.10	0.69±0.06	0.78±0.07	0.66±0.06	0.80±0.21	0.78±0.05	ns	ns
C20:4n-6	1.09±0.42	0.30±0.35	0.90±0.04	0.62±0.42	0.85±0.06	0.58±0.14	0.95±0.05	0.76±0.34	ns	**
C22:2n-6	2.00±0.30	0.51±0.64	1.02±0.25	1.20±0.70	1.05±0.23	1.58±0.65	1.56±0.33	1.15±0.39	ns	ns
C20:5n-3	13.94±1.55	8.63±1.90	12.50±1.47	6.77±0.92	12.13±2.76	9.77±1.32	11.81±1.51	7.71±2.52	ns	***
C22:6n-3	8.36±0.17	6.60±1.48	10.29±0.83	8.29±2.04	9.94±1.25	6.76±0.10	9.84±0.89	7.07±0.47	*	ns
∑ PUFA	38.04±0.88	39.99±1.27	36.22±0.82	40.34±2.24	36.43±3.27	41.96±1.41	36.07±1.62	40.09±1.26	ns	***
∑ n-3	24.02±1.34	18.80±0.79	24.01±0.87	18.42±1.43	23.64±3.21	20.09±1.20	23.23±1.43	18.17±1.93	ns	***
∑ n-6	14.03±1.02	21.18±0.86	12.26±0.40	21.92±0.71	12.78±0.47	21.87±0.53	12.44±0.75	21.92±0.78	ns	***
∑ n-9	22.87±0.76	29.10±0.85	23.65±0.55	29.19±1.36	22.38±1.79	26.59±0.93	23.35±1.19	28.37±1.08	*	***
n-3/n-6	2.15±0.28	0.94±0.05	2.28±0.15	0.92±0.06	2.16±0.34	1.02±0.07	2.22±0.21	0.91±0.13	ns	***
EPAD/DHA	1.67±0.21	1.39±0.48	1.25±0.21	0.87±0.31	1.23±0.27	1.45±0.21	1.21±0.24	1.11±0.45	*	ns

Mean values of four samples±standard deviation.

***, $p<0.001$; **, $p<0.01$; *, $p<0.05$; ns: not significant

SFA: saturated fatty acid; MUFA: monounsaturated fatty acid; PUFA: polyunsaturated fatty acid; EPA: acid eicosapentaenoic; DHA: acid docosahexaenoic.

Table 3
Color measurements, chemical parameter and microbiological counts performed during ice storage of seabream for fish fed the different experimental diets.

Storage	D0			D7			D14			D21			Storage x Diet
	FO	VO	VO	FO	VO	VO	FO	VO	VO	FO	VO	VO	
Color													
<i>L</i> *	37.09±0.62	36.84±1.16	43.72±0.70	40.50±0.84	41.29±0.53	42.69±0.78	41.84±0.70	42.07±0.18	***	ns	***	***	***
<i>a</i> *	0.38±0.29	1.00±0.15	0.34±0.50	0.51±0.44	-0.22±0.20	0.29±0.25	0.04±0.29	0.13±0.53	**	*	**	**	ns
<i>b</i> *	-3.52±0.46	-1.75±0.56	-3.46±0.60	-4.28±0.68	-4.66±0.36	-4.10±0.54	-4.05±0.31	-3.50±1.04	***	*	***	***	**
<i>C</i> _{ab}	3.78±0.36	2.48±0.57	3.54±0.54	4.41±0.55	4.69±0.37	4.17±0.51	4.09±0.30	3.73±0.85	***	ns	***	***	**
<i>H</i> _{ab}	-0.32±0.12	-0.25±0.47	-0.67±0.86	-0.63±0.37	0.75±0.49	-0.41±0.08	0.18±0.54	0.30±0.59	**	ns	**	**	ns
Chemical parameters													
WHC	89.86±0.21	89.36±0.74	91.67±1.31	92.47±0.54	90.61±0.92	94.03±0.63	91.89±0.39	93.51±0.61	***	***	***	***	**
pH	6.04±0.16	6.13±0.10	6.28±0.05	6.26±0.13	6.38±0.09	6.35±0.05	6.32±0.03	6.39±0.04	***	ns	***	***	ns
TBARS	0.45±0.07	0.28±0.07	0.30±0.06	0.15±0.01	0.24±0.10	0.20±0.03	0.48±0.04	0.16±0.07	***	***	***	***	***
Microbiological counts (cfu g⁻¹)													
Mesophilic	<1	<1	1.23±0.83	1.31±0.90	2.45±0.32	3.39±0.28	5.77±0.20	5.52±0.47	***	ns	***	***	ns
Psychrophilic	<1	<1	<1	<1	2.06±0.40	3.40±0.35	5.22±0.33	5.18±0.32	***	**	***	***	***
<i>Pseudomonas</i>	<1	<1	<1	<1	1.27±1.00	2.97±0.12	5.33±0.06	5.14±0.34	***	*	***	***	***
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	3.36±0.26	3.30±0.04	***	ns	***	***	ns

Mean values of four samples±standard deviation.

*L**: lightness (0 black-100 white); *a**: (+) red or (-) green; *b**: (+) yellow or (-) blue; *C*_{ab}: chroma; *H*_{ab}: hue.

WHC, water-holding capacity (%); TBARS, 2-thiobarbituric acid-reactive substances (mg MDA kg⁻¹).

***, *p*<0.001; **, *p*<0.01; *, *p*<0.05; ns: not significant.

Table 4
Seabream sensory evaluation during ice storage for each experimental diet.

Storage Diet	D0		D7		D14		D21		Storage	Diet	Storage x Diet
	FO	VO	FO	VO	FO	VO	FO	VO			
Appearance											
Skin shine	1.0±0.0	1.0±0.0	1.8±0.2	1.8±0.2	3.1±0.4	3.1±0.5	4.1±0.3	3.7±0.4	***	ns	**
Skin color	1.0±0.0	1.0±0.0	1.3±0.1	1.4±0.1	2.2±0.6	2.2±0.6	3.3±0.4	3.9±0.4	***	**	***
Slime	1.0±0.0	1.0±0.0	2.4±0.2	2.4±0.2	3.0±0.6	2.9±0.7	4.3±0.2	4.1±0.9	***	ns	ns
Surface	1.0±0.0	1.0±0.0	1.4±0.2	1.3±0.2	1.9±0.4	1.9±0.3	2.7±0.4	2.6±0.4	***	ns	ns
Flesh											
Springiness	1.0±0.0	1.0±0.0	2.1±0.3	1.5±0.2	3.0±0.6	2.4±0.5	3.5±0.6	3.9±0.4	***	**	***
Firmness	1.0±0.0	1.0±0.0	1.9±0.3	1.6±0.3	2.9±0.6	2.8±0.6	3.4±0.5	4.0±0.3	***	ns	***
Body odor	1.0±0.0	1.0±0.0	3.2±0.1	3.7±0.2	3.6±0.3	3.6±0.2	4.6±0.2	4.3±0.3	***	ns	***
Eyes											
Clarity	1.0±0.0	1.0±0.0	2.8±0.5	2.6±0.7	3.0±0.6	3.3±0.6	3.3±0.5	3.4±0.5	***	ns	ns
Shape	1.0±0.0	1.0±0.0	3.2±0.6	3.2±0.5	3.8±0.4	3.2±0.7	4.6±0.3	4.5±0.3	***	**	**
Gills											
Color	1.0±0.0	1.0±0.0	2.5±0.7	2.2±0.4	3.7±0.5	3.5±0.2	4.3±0.5	4.0±0.4	***	***	ns
Odor	1.0±0.0	1.0±0.0	3.0±0.7	3.2±0.8	3.8±0.3	3.7±0.3	4.6±0.4	4.6±0.2	***	ns	ns
Quality Index	11.0±0.0	11.0±0.0	25.6±1.7	24.9±1.3	34.0±2.1	32.5±2.2	42.1±2.2	42.8±1.2	***	ns	*

Mean values of four samples±standard deviation.

***; p<0.001; **, p<0.01; *, p<0.05; ns: not significant.

3.5. Sensory assessment

The results of the sensory analysis (Table 4) show significant changes in all parameters considered over storage time in gilthead seabream fed either diet ($p < 0.001$). On day 0, all parameters had values around 1.0, indicating the maximum degree of freshness for the fish. During the first week, the attributes "body odor," "eye shape" and "gill odor" evidenced rapid deterioration, reaching values ≥ 3 on day 7. These attributes were also given scores close to 5 at the end of storage, demonstrating more advanced deterioration than the remaining attributes.

Concerning dietary effects, significant differences were observed between the two groups for some attributes (skin color, springiness, eye shape, and gills color). The group of animals fed the FO diet showed poorer springiness and greater color deterioration of the gills and eye shape on almost all sampling days ($p < 0.05$). Greater discoloration of the skin was observed for the VO group at the end of the storage period ($p < 0.01$). For the parameters "skin shine," "firmness" and "body odor," while no significant differences were seen according to the diet, there was an interaction between time and diet ($p < 0.01$).

The Quality index increased over storage time ($p < 0.001$), with higher values for the FO group during the first two weeks ($p > 0.05$), as evidence of earlier deterioration. Furthermore, a significant interaction was detected ($p < 0.05$), as the result of a greater increase in this index in the VO group during the last week in storage.

4. Discussion

Increasingly widespread knowledge of the beneficial properties of fish for human health makes its consumption more and more advisable. These properties (health-promoting factors) are directly related to the long-chain PUFA $n-3$ found in seafood. Eating fish with a high EPA and DHA content and a high $n-3/n-6$ ratio is highly recommended as part of our diet (Turchini et al., 2009). The fatty acid composition of fish muscle reflected the fatty acid profile of the dietary lipids. Our results revealed that replacing 75% of the fish oil with vegetable oils (soy and rapeseed) resulted in fish with a lower long-chain $n-3$ fatty acid (EPA and DHA) content and a greater amount of oleic (C18:1n9) and linoleic (C18:2n6) fatty acids. The $n-3/n-6$ ratio was more than two times higher in the FO group ($p < 0.001$), due to both the greater amount of long-chain $n-3$ fatty acids (EPA and DHA) in this group and the greater amount of linoleic acid in the VO group. These changes have been described in gilthead seabream for other authors with 60% substitution (Izquierdo et al., 2003, 2005; Mourente & Bell, 2006; Montero et al., 2005; Mourente, Good & Bell, 2005).

Because of its high content of highly unsaturated fatty acids (HUFA), fish is a food that is susceptible to oxidative rancidity (Harris & Tall, 1994). Several authors have observed a reduction in EPA and DHA fatty acids in the flesh during fish storage. This decrease in polyunsaturated fatty acids has been associated with oxidation processes,

and on occasion it has been accompanied by an increase in SFAs (Özden, 2005; Chaijan, Benjakul, Visessanguan & Faustman, 2006; Ng & Bahurmiz, 2009; Hosseini, Abedian-Kenari, Rezaei, Nazari, Feás & Rabbani, 2010; Tironi, Tomás & Añón, 2010). The hydrolysis of triglycerides and phospholipids results in free unsaturated fatty acids that can be oxidized and produce SFAs (Chaijan et al., 2006). Other authors, however, have failed to observe significant changes in the fatty acid composition over time in storage (Pirini, Gatta, Testi, Trigari & Monetti, 2000; Røra et al., 2003). In the present study, an increase in saturated fatty acids was observed, which occurred during the first week in storage in the FO group and during the last week in storage in the VO group. Nonetheless, our results failed to show a clear trend in the variations of EPA and DHA fatty acids.

Modifications in the fatty acid composition of fish fillets may affect the sensory characteristics of the product. However, have reported the possible effect of different dietary lipid sources on sensory quality, texture, volatile flavor compounds, pigmentation and stability during storage, the results are often contradictory and are not yet to be completely understood (Turchini et al., 2009).

In the present study, the values for the a^* parameter displayed a tendency to closer to 0 over time, showing a loss of redness in both groups, although these values were higher in the VO group throughout the entire storage period ($p < 0.05$). These color changes may have been associated with the loss of liquid. Carotenoid pigments present in the flesh are bound to muscular proteins (Henmi, Hata & Hata, 1989; in Bjerkeng, Peisker, von Schwarzenberg, Ytrestøyl & Åsgård, 2007). The increase in the loss of liquid from halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fillets during ice storage was accompanied by the loss of free proteins from muscle tissue (Olsson, Olsen, Carlehög, & Ofstad, 2003). In the present study, redness difference observed with diet was maintained over time, indicating that the color deterioration occurred at the same intensity in both groups.

In addition to the changes observed in the chromatic parameters, a lower L^* was observed for both groups on day 0 of storage compared to the rest of the days ($p < 0.001$). Earlier studies have attributed higher L^* values in flesh to the decrease in pH (Robb, 2001). In fact, it is believed that protein conformational changes alter the reflection of incident light. In the case of Atlantic cod (*Gadus morhua*), Mørkøre (2006) observed higher L^* values 16 hours *post mortem* as compared to the initial value, with lower values for the group of animals fed a diet with soy oil as source of lipids (S-group) versus a feed with fish oil (M-group). During this time, these authors observed a decrease in pH from values around 7.0 to values of 6.3-6.6, with lower values for the S-group than for the M-group. In the present study, the different L^* values between days 0 and 7 may be attributed to the L^* increase that occurred a few hours after sacrifice as the result of the decrease in pH, although in our case, no differences were observed between diets for either of the two parameters. Izquierdo et al. (2005) and Montero et al. (2005) also failed to observe

any significant differences in pH according to the dietary oil source.

In gilthead seabream, a reduction in pH from initial values of 6.5-7.2 to values of 6.2-6.8 is attained five hours *post mortem*, when *rigor mortis* set in. Afterwards, a slight decrease was observed until after 60h *post mortem* and then an increase during almost 30 days in storage (Tejada & Huidobro, 2002). In the present study, the samples on day 0 were analyzed 5-6 hours after sacrifice, with pH values of 6.04 and 6.13 resulting lower than those observed one week later. The *post mortem* reduction in fish muscle pH affects its physical properties in such a way that as the pH decreases, it also decreases the net surface charge of the muscle proteins, causing its partial denaturation and reducing its water-binding capacity (Huss, 1995). Ofstad, Egelandsdal, Kidman, Myklebust, Olsen & Hermansson (1996) showed that there is a relationship between liquid-holding capacity during the first hours postmortem and structural changes in rigor muscle. According our results, the WHC values were lower on day 0 of storage than on the rest of the days. This greater release of water may have been caused by low pH in combination with structural changes in postmortem muscle. Thereafter, WHC of fish samples generally decreases over time, however, some studies show a decrease of liquid loss after several days of cold storage (Olsson et al., 2003; Olsson, Seppola & Olsen, 2007). In the present study, after the first week, no significantly changes of WHC were observed over time. Other authors also have not observed variations with storage of fish (Poli et al., 2001; Tejada & Huidobro, 2002).

Regarding the effect of diet, higher WHC values were observed in the VO group on days 7, 14 and 21. In cold-smoked Atlantic salmon fillets refrigerated at 4°C, a greater liquid loss was observed in a group of animals fed a diet in which the sole source of lipids was pure soybean oil than in those fed a diet with pure peruvian fish oil (Røra et al., 2005). In raw fillets from the same species, it was found that there was a greater water loss with diets with 100% Peruvian fish oil and soybean oil than diets with capelin oil and rapeseed oil (Regost et al., 2004). In the case of cod, however, no differences were observed in the loss of liquid between FO (fish oil) and SO (soybean oil) groups (Mørkøre et al., 2007).

Besides the changes in physical properties that occur in fish flesh after sacrifice, this is especially susceptible to lipidic deterioration during storage due to the large amount of HUFA it contains. In this sense, the lower muscle content of these fatty acids may increase the oxidative stability of the fish flesh. In the present study, significant differences were observed according to diet, with lower TBARS values in the VO group than in the FO group throughout the storage time. Similar results have been reported by other authors (Ng, Wang, Ketchimenin, & Yuen, 2004; Regost et al., 2004; Ng & Bahurmiz, 2009). According to Ng et al. (2004), the lower lipidic oxidation in the muscle of African catfish (*Clarias gariepinus*) fed increasing dietary levels of palm fatty acid distillate (PFAD) may have been caused by both a lower unsaturation of

lipids in the muscle and high concentrations of vitamin E. Regost et al. (2004) observed that the concentrations of γ -tocopherol in the fillets of animals fed vegetable oils were far higher than those for animals fed fish oil. Soy and rapeseed oils contain large amounts of tocopherols (Kamal-Eldin, 2006). In our study, the VO diet could have favored the muscle tissue oxidative stability by the transfer of anti-oxidants from the diet to the muscle.

In fresh fish refrigerated aerobically, the main microorganisms responsible for deterioration are Gram-negative psychrotrophic bacteria (Leisner & Gram, 2000). In the present study, after a week in storage, only the growth of mesophilic microorganisms was detected, while the growth of psychrophiles and *Pseudomonas* occurred during the second week. Different psychrophile and *Pseudomonas* counts were also observed between the dietary groups. These differences may have been due to different microorganisms from the gastrointestinal microbiota found in both groups as the result of the diet. Clear differences in bacterial colonization of the enterocyte surface in the hindgut were also observed when Arctic charr were fed dietary soybean oil or linseed oil (Ringø et al., 2002). Likewise, the inclusion of soy meal in the diet causes some changes in the intestinal microflora (Refstie et al., 2006; Heikkinen et al., 2006). However, the intestinal microbiota of fish is still fairly poorly understood, and the knowledge of the dietary effects on the composition of microbiota is limited (Heikkinen et al., 2006).

It has been well established that, even though autolytic and chemical processes lead to deterioration, in spoiled fish products, microbial growth and activity are the main reason that *off odors* and *off flavors* develop (Leisner & Gram, 2000). In our study, the attributes "body odor," "eye shape" and "gill odor" rapidly deteriorated during the first week, with greater deterioration being observed at the end of storage. The group of animals fed the FO diet showed greater deterioration of gill color and eye shape on almost all sampling days, as well as a more intense *off body odor* at the end of the storage period ($p < 0.05$). This may have been due precisely to the microbial growth on the outer and inner surfaces (gills, skin and digestive tract), areas in which a live fish carry a substantial load of microorganisms (Leisner & Gram, 2000).

Significant differences were observed between both dietary groups during storage for some sensory attributes, but no significant differences were observed in the Quality index. The sensory evaluation of fish using a demerit score system makes it possible to establish a linear relationship between the Quality Index and time in storage. According to the method used in the present study, the threshold for the Quality index corresponding to an acceptable sensory level is 38 (Álvarez et al., 2008). We can use this value to estimate the shelf-life in sensory terms, by means of the linear regression equations obtained for the different dietary groups (Table 5). So, this Quality Index value would be reached on day 17 for both groups. Similar results were reported by several authors, who has been estimated the shelf-life of gilthead seabream refrigerated on ice to be around 13-18 days (Alasalvar et al., 2001; Álvarez et al. 2008; Álvarez, García-García, Jordán,

Martínez-Conesa & Hernández, 2012; Cakli et al., 2007; Kilinc et al., 2007; Tejada & Huidobro, 2002).

Table 5

Regression analyses used to determine the shelf-life of gillthead seabream of each diet.

Diet	a	b	R ²	p	Chow test
FO	13.60***	1.43***	0,961	<0.001	ns
VO	12.92***	1.44***	0,972	<0.001	ns

$Y = a + bX$. Y: Quality Index; X: storage time.

a, b: coefficients calculated by the regression analysis

***: $p < 0.001$; ns: not significant.

5. Conclusions

As was to be expected, the partial replacement of fish oil with vegetable oils in the diet modified the fatty acid profile in the flesh of the final product. The lower *n-3* HUFA content in the VO group favored the oxidative stability of the muscle. In the present study, even though the results failed to show intense oxidation in either group, there were indications of lesser oxidation in the VO group, as it presented lower TBARS values and a later increase in SFAs.

On the other hand, in fish stored on ice, the deterioration of the external areas, due mainly to microbial growth on the surface, is of great significance. In this study, in spite of observing differences between the dietary groups for some of the sensory attributes considered and in the count for some microorganisms, no significant differences were observed in the Quality index or in the mesophile count, which are the two factors that ultimately determine the acceptability of the product. Therefore, the partial replacing of fish oil by mixing vegetable oil tested in this study it would be feasible regarding that not significantly affect to the preservation of fish in cooling.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the project "Characterization of quality in farmed fish" financed by Planes Nacionales de Acuicultura de JACUMAR (Spain). The study was also partially sponsored by the IMIDA grant program.

References

- Alasalvar, C., Taylor, K. D. A., Öksüz, A., Garthwaite, T., Alexis, M. N., & Grigorakis, K. (2001). Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods. *Food Chemistry*, 72, 33-40.
- Álvarez, A., García-García, B., Garrido, M. D., & Hernández, M. D. (2008). The influence of starvation time prior to slaughter on the quality of commercial-sized gillthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture*, 284, 106-114.
- Álvarez, A., García-García, B., Jordán, M. J., Martínez-Conesa, C., & Hernández, M. D. (2012). The effect of

diets supplemented with thyme oils and rosemary extract on the deterioration of farmed gillthead seabream (*Sparus aurata*) during storage on ice. *Food Chemistry*, 132, 1395-1405.

- AOAC (1997). Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- Benedito-Palos, L., Navarro, J. C., Sitjà-Bobadilla, A., Bell, J. G., Kaushik, S., & Pérez-Sánchez, J. (2008). High levels of vegetable oils in plant protein-rich diets fed to gillthead sea bream (*Sparus aurata* L.): growth performance, muscle fatty acid profiles and histological alterations of target tissues. *British Journal of Nutrition*, 100(5), 992-1003.
- Bjerkeng, B., Refstie, S., Fjalestad, K. T., Storebakken, T., Rødbotten, M., & Roem, A. J. (1997). Quality parameters of the flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as affected by dietary fat content and full-fat soybean meal as a partial substitute for fish meal in the diet. *Aquaculture*, 157, 297-309.
- Bjerkeng, B., Peisker, M., von Schwanzenberg, K., Ytrestøyl, T., & Åsgård, T. (2007). Digestibility and muscle retention of astaxanthin in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with the red yeast *Phaffia rhodozyma* in comparison with synthetic formulated astaxanthin. *Aquaculture*, 269, 476-489.
- Botsoglou, N.A., Fletouris, D. J., Papageorgiou, G. E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A. J., & Trakatellis, A. G. (1994). Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1931-1937.
- 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.
- Castro, P. L., Caballero, M. J., Millán, R., Ginés, R., Montero, D., & Izquierdo, M. (2010). Linseed oil inclusion in sea bream diets: Effect on fatty acid composition during ice storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 985-993.
- Chajjan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Faustman, C. (2006). Changes of pigments and color in sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) muscle during iced storage. *Food Chemistry*, 93, 607-617.
- EC Regulation, 1996. Council Regulation (EC) N 2406/96 of 26 November 1996 Laying Down Common Marketing Standards for Certain Fishery Products. OJ L 334, 23.12.1996, pp. 1-15.
- Fountoulaki, E., Vasilaki, A., Hurtado, R., Grigorakis, K., Karacostas, I., Nengas, I., Rigos, G., Kotzamanis, Y., Venos, B., & Alexis, M. N. (2009). Fish oil substitution by vegetable oils in commercial diets for gillthead sea bream (*Sparus aurata* L.); effects on growth performance, flesh quality and fillet fatty acid profile. Recovery of fatty acid profiles by a fish oil finishing diet under fluctuating water temperatures. *Aquaculture* 289, 317-326.

- González-Cortés, M. A., Penedo, J.C., Millán, R., Sanjuán, E., Estupiñán, S., (2000). Cambios en la vida útil de la dorada acuacultivada en Canarias (*Sparus aurata*) conservada en hielo. *Alimentaria*, marzo, 61-64.
- Grigorakis, K., Taylor, K.D.A., & Alexis, M.N. (2003). Seasonal patterns of spoilage of ice-stored cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chemistry*, 81, 263-268.
- Harris, P., & Tall, J. (1994). Rancidity in fish. In J. Allen, & R. Hamilton (Eds.), *Rancidity in foods* (pp. 256-272). London, UK: Chapman & Hall.
- Heikkinen, J., Vielma, J., Kemiläinen, O., Tirola, M., Eskelinen, P., Kiuru, T., Navia-Paldanius, D., & Wright, A. (2006). Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 261, 259-265.
- Henmi, H., Hata, M., Hata, M., 1989. Studies on the carotenoids in the muscle of salmon: 2. Astaxanthin and or canthaxanthin-actomyosin complex in salmon muscle. *Nippon Suisan Gakk*, 55, 1583-1589.
- Hosseini, S. V., Abedian-Kenari, A., Rezaei, M., Nazari, R. M., Feás, X., & Rabbani, M. (2010). Influence of the in vivo addition of alpha-tocopheryl acetate with three lipid sources on the lipid oxidation and fatty acid composition of Beluga sturgeon, *Huso huso*, during frozen storage. *Food Chemistry*, 118, 341-348.
- Huidobro, A., Pastor, A., & Tejada, M. (2000). Quality Index Method developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Food Science*, 65, 1202-1205.
- Huss, H. H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. FAO Fisheries Technical Paper, vol. 348. FAO, Rome.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1986). Sampling plans for fish and shellfish. In: ICMSF, Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications, 2nd Edition, Vol. 2. University of Toronto Press, Toronto, Canada, pp. 181-196.
- Izquierdo, M. S., Obach, A., Arantzamendi, L., Montero, D., Robaina, L., & Rosenlund, G. (2003). Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquaculture Nutrition*, 9, 397-407.
- Izquierdo, M. S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M. J., Rosenlund, G., & Ginés, R. (2005). Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture* 250, 431-444.
- Kamal-Eldin, A. (2006). Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 58, 1051-1061.
- Kilinc, B., Cakli, S., Cadum, A., Dincer, T., & Tolasa, S. (2007). Comparison of effects of slurry ice and flake ice pretreatments on the quality of aquacultured sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored at 4 °C. *Food Chemistry*, 104, 1611-1617.
- Leisner, J. J., & Gram, L. (2000). Spoilage of fish products. In R.K. Robinson, C.A. Batt, & P.D. Patel (Eds.), *Encyclopedia of food microbiology* (pp. 813-820). San Diego: Academic Press.
- Lougovois, V. P., Kyranas, E. R., & Kyranas, V. R. (2003). Comparison of selected methods of assessing freshness quality and remaining storage life of iced gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Research International*, 36, 551-560.
- Menoyo, D., Izquierdo, M. S., Robaina, L., Ginés, R., López-Bote, C. J., & Bautista, J. M. (2004). Adaptation of lipid metabolism, tissue composition and flesh quality in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to the replacement of dietary fish oil by linseed and soybean oils. *British Journal of Nutrition*, 92, 41-52.
- Montero, D., Robaina, L., Caballero, M. J., Ginés, R., & Izquierdo, M. S. (2005). Growth, feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils: A time-course study on the effect of a re-feeding period with a 100% fish oil diet. *Aquaculture*, 248, 121-134.
- Mørkøre, T. (2006). Relevance of dietary oil source for contraction and quality of pre-rigor filleted Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture*, 251, 56-65.
- Mørkøre, T., Netteberg, C., Johnsson, L., & Pickova, J. (2007). Impact of dietary oil source on product quality of farmed Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture*, 267, 236-247.
- Mourente, G., Good, J., & Bell, J. G. (2005). Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E2 and E2a immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquaculture Nutrition*, 11, 25-40.
- Mourente, G., & Bell, J. G. (2006). Partial replacement of dietary fish oil with blends of vegetable oils (rapeseed, linseed and palm oils) in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) over a long term growth study: Effects on muscle and liver fatty acid composition and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 145, 389-399.
- Nasopoulou, C., & Zabetakis, I. (2012). Benefits of fish oil replacement by plant originated oils in compounded fish feeds. A review. *LWT-Food Science and Technology*. Doi: 10.1016/j.lwt.2012.01.018.
- Ng, W. K., Wang, Y., Ketchimenin, P., & Yuen, K. H. (2004). Replacement of dietary fish oil with palm fatty acid distillate elevates tocopherol and tocotrienol concentrations and increases oxidative stability in the muscle of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*, 233, 423-437.
- Ng, W. K., & Bahurmiz, O. M. (2009). The impact of dietary oil source and frozen storage on the physical, chemical and sensorial quality of filets from market-

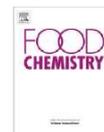
- size red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp. *Food Chemistry*, 113, 1041-1048.
- O'Fallon, J. V., Busboom, J. R., Nelson, M. L., & Gaskins, C. T. (2007). A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. *Journal of Animal Science*, 85, 1511-1521.
- Ofstad, R., Egeland, B., Kidman, S., Myklebust, R., Olsen, R. L., & Hermansson, A. M. (1996). Liquid loss as effected by post mortem ultrastructural changes in fish muscle: cod (*Gadus morhua* L) and salmon (*Salmo salar*). *Journal of the Science of Food Agriculture*, 71, 301-312.
- Olsson, G. B., Olsen, R. L., Carlehög, M., & Ofstad, R. (2003). Seasonal variations in chemical and sensory characteristics of farmed and wild Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 217, 191-205.
- Olsson, G. B., Seppola, M. A., & Olsen, R. L. (2007). Water-holding capacity of wild and farmed cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) muscle during ice storage. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 793-799.
- Özden, Ö. (2005). Changes in amino acid and fatty acid composition during shelf-life of marinated fish. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2015-2020.
- Pirini, M., Gatta, P. P., Testi, S., Trigari, G., & Monetti, P. G. (2000). Effect of refrigerated storage on muscle lipid quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed by diets containing different levels of vitamin E. *Food Chemistry*, 68, 289-293.
- Poli, B. M., Parisi, G., Zampacavallo, G., Mecatti, M., Lupi, P., Gualtieri, M., & Franci, O. (2001). Quality outline of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared in Italy: shelf life, edible yield, nutritional and dietetic traits. *Aquaculture*, 202, 303-315.
- Refstie, S., Landsverk, T., Bakke-McKellep, A. M., Ringø, E., Sundby, A., Shearer, K. D., & Kroghdahl, Å. (2006). Digestive capacity, intestinal morphology, and microflora of 1-year and 2-year old Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed standard or bioprocessed soybean meal. *Aquaculture*, 261, 269-284.
- Regost, C., Arzel, J., Robin, J., Rosenlund, G., & Kaushik, S. J. (2003). Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*) 1. Growth performance, flesh fatty acid profile, and lipid metabolism. *Aquaculture*, 217, 465-482.
- Regost, C., Jakobsen, J. V., & Røra, A. M. B. (2004). Flesh quality of raw and smoked fillets of Atlantic salmon as influenced by dietary oil sources and frozen storage. *Food Research International*, 37, 259-271.
- Ringø, E., Lødemel, J. B., Myklebust, R., Jensen, L., Lund, V., Mayhew, T. M., & Olsen, R. E. (2002). The effects of soybean, linseed and marine oils on aerobic gut microbiota of Arctic charr *Salvelinus alpinus* L. before and after challenge with *Aeromonas salmonicida* ssp. *Salmonicida*. *Aquaculture Research*, 33, 591-606.
- Robb, D.H.F. (2001). The relationship between killing methods and quality. In S.C. Kestin, & P.D. Warris (Eds.), *Farmed Fish Quality* (pp. 220- 233). London: Fishing News Books.
- Røra, A. M. B., Regost, C., & Lampe, J. (2003). Liquid holding capacity, texture and fatty acid profile of smoked fillets of Atlantic salmon fed diets containing fish oil or soybean oil. *Food Research International*, 36, 231-239.
- Røra, A. M. B., Birkeland, S., Hultmann, L., Rustad, T., Skåra, T., & Bjerkeng, B. (2005). Quality characteristics of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets high in soybean or fish oil as affected by cold-smoking temperature. *LWT*, 38, 201-211.
- Tejada, M., & Huidobro, A. (2002). Quality of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage related to the slaughter method and gutting. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 215, 1-7.
- Tironi, V. A., Tomás, M. C., & Añón, M. C. (2010). Quality loss during the frozen storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). Effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 263-272.
- Torstensen, B. E., Bell, J. G., Rosenlund, G., Henderson, R. J., Graff, I. E., Tocher, D. R., Lie, Ø, & Sargent, J. R. (2005). Tailoring of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) flesh lipid composition and sensory quality by replacing fish oil with a vegetable oil blend. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 10166-10178.
- Turchini, G. M., Mentasti, T., Frøyland, L., Orban, E., Caprino, F., Moretti, V. M., & Valfrè, F. (2003). Effects of alternative dietary lipid sources on performance, tissue chemical composition, mitochondrial fatty acid oxidation capabilities and sensory characteristics in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture*, 225, 251-267.
- Turchini, G. M., Moretti, V. M., Mentasti, T., Orban, E., & Valfrè, F. (2007). Effects of dietary lipid source on fillet chemical composition, flavour volatile compounds and sensory characteristics in the freshwater fish tench (*Tinca tinca* L.). *Food Chemistry*, 102, 1144-1155.
- Turchini, G. M., Torstensen, B. E., & Ng, W. K. (2009). Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 1, 10-57.
- Turchini, G. M., Francis, D. S., Keast, R. S. J., & Sinclair, A. J. (2011). Transforming salmonid aquaculture from a consumer to a producer of long chain omega-3 fatty acids. *Food Chemistry*, 124, 609-614.

PUBLICACIÓN V:
The effect of diets supplemented with thyme Essentials oils
and Rosemary extract on the deterioration of farmed gilthead
seabream (*Sparus aurata*) during storage on ice



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

The effect of diets supplemented with thyme essential oils and rosemary extract on the deterioration of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during storage on ice

A. Álvarez^a, B. García García^a, M.J. Jordán^b, C. Martínez-Conesa^b, M.D. Hernández^{a,*}

^aIMIDA – Acuicultura. Carretera del puerto s/n, 30740, P.O. Box 65, San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain
^bIMIDA – Recursos Naturales y Desarrollo Rural, C/Mayor s/n, 30150 La Alherca, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 June 2011
 Received in revised form 9 November 2011
 Accepted 30 November 2011
 Available online 8 December 2011

Keywords:

Sparus aurata
 Quality
 Shelf-life
 Thyme essential oils
 Rosemary extract

ABSTRACT

The effect on quality were assessed for gilthead seabream fed five different diets: control (basal diet); BHT (basal diet with 200 mg kg⁻¹ of butylated hydroxytoluene); rosemary (basal diet with 600 mg kg⁻¹ of rosemary extract – *Rosmarinus officinalis*); carvacrol (basal diet with 500 mg kg⁻¹ of essential oil of *Thymus capitata*, carvacrol chemotype); and thymol (basal diet with 500 mg kg⁻¹ of essential oil of *Thymus zygis*, subspecies *gracilis*, thymol chemotype). After 18 weeks of experimentation, the animals were stored on ice at 4 °C for 0, 7, 14, and 21 days. Physical–chemical, microbiological and sensory analyses were carried out at each sampling point to determine the degree of deterioration in the gilthead seabream. Lower indices of oxidation were observed in animals who were administered feeds supplemented with BHT, carvacrol and (to a lesser degree) rosemary. Lower bacteria counts were observed for the BHT and thymol groups, in addition to a slower deterioration in terms of sensory perception. Accordingly, the addition of natural antioxidants to the diet may have an added effect on fish quality, delaying *post mortem* deterioration.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The lipid oxidation processes that occur during food storage cause important changes in their sensory properties, such as rancidification, which is related to the development of off-flavours and colour deterioration. In this sense, the use of synthetic antioxidants, such as butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) and tertiary butyl hydroquinone (TBHQ) is quite common in the field of food technology to minimise and delay oxidation, thereby maintaining nutritional quality and prolonging the shelf-life of food. However, in response to the suspected negative effects of these compounds on human health (Barlow, 1990), there is currently growing interest in replacing these compounds with natural products that are potential antioxidants (vitamins and phenolic compounds). In recent years special attention has been directed towards spices and aromatic plants, which have traditionally been used for centuries to preserve food, not only for their antioxidant power, but also for their antimicrobial properties (Alçiçek, 2011).

Essential oils (EOs) of thyme and oregano and rosemary extracts are some of the products that are increasingly in demand. The use of diets supplemented with these compounds has been studied for

meat products, such as chicken (Botsoglou, Christaki, Fletouris, Florou-Paneri, & Spais, 2002), beef (O'Grady, Maher, Troy, Moloney, & Kerry, 2006), lamb (Nieto, Díaz, Bañón, & Garrido, 2010a, 2010b; Simitzis et al., 2008), pork (Simitzis, Symeon, Charismiadou, Bizelis, & Deligeorgis, 2010), and turkey (Botsoglou, Grigoropoulou, Botsoglou, Govaris, & Papageorgiou, 2003).

In the case of seafood, an elevated polyunsaturated fatty acid content makes it very susceptible to lipid oxidation during storage (Fraser & Sumar, 1998). In fish kept refrigerated, both the appearance of off-flavours and changes in colour and texture reduce the sensory perception quality of the product in a matter of a few short days, shortening its shelf-life (Huss, 1995). The effectiveness of essential oils of oregano and thyme and rosemary extract as fish preservatives has been studied for both fillets and whole animals, in combination with different packaging and storage methods (Altieri, Speranza, Del Nobile, & Sinigaglia, 2005; Attouchi & Sadok, 2010; Goulas & Kontominas, 2007; Harpaz, Glatman, Drabkin, & Gelman, 2003; Kostaki, Giatrakou, Savvaidis, & Kontominas, 2009; Mahmoud, Yamazaki, Miyashita, Shin, & Suzuki, 2006; Tironi, Tomás, & Añón, 2010). Other studies also examine the effect of exogenous treatments on fish homogenates that use natural extracts (Sánchez-Alonso & Borderías, 2008; Serdaroğlu & Felekoğlu, 2005).

According to Lauridsen, Buckley, and Morrisey (1997), supplementing the diet with antioxidants enables these substances

* Corresponding author. Tel./fax: +34 968 184518.

E-mail address: mdolores.hernandez6@car.mes (M.D. Hernández).

to be uniformly incorporated into the membrane phospholipids, where they can effectively inhibit oxidation reactions. Several studies have shown the effectiveness of fish diets supplemented with vitamins (Akhtar, Gray, Booren, & Garling, 1998; Ortiz, Larrain, Vivanco, & Aubourg, 2009; Ruff, Fitzgerald, Cross, Hamre, & Kerry, 2003; Ruff, Fitzgerald, Cross, Teurtrie, & Kerry, 2002; Scalfi, Onibi, Murray, Fletcher, & Houlihan, 2000). However, to our knowledge, only Akhtar et al. (1998) have described the effect of the dietary inclusion of oleoresin rosemary on lipid stability in fish, specifically in rainbow trout. It should be noted, however, that this product was added to the diet along with α -tocopherol, and therefore the results were due to the combined effect of both compounds.

The gilthead seabream is one of the most commonly farmed species of fish in the Mediterranean. It is primarily sold fresh, whole and uncut (Luna, 2007). Generally speaking, the shelf-life of fish in this format and refrigerated on ice is relatively short, compared to other packaged or frozen products. The shelf-life of this product has been estimated by several authors to be around 13–16 days (Álvarez, García-García, Garrido, & Hernández, 2008; Cakli, Kilinc, Cadun, Dincer, & Tolasa, 2007; Kilinc, Cakli, Cadun, Dincer, & Tolasa, 2007; Tejada & Huidobro, 2002). In this sense, any methodology aimed at prolonging its shelf-life would be of great interest to the sector. The intent of the present study was to evaluate the effect of diets supplemented with thyme essential oils (*Thymbra capitata* and *Thymus zygis*, subspecies *gracilis*) and rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*) on the deterioration of farmed gilthead seabream during storage on ice.

2. Materials and methods

2.1. Animals and housing

Gilthead seabream were kept at the IMIDA aquaculture facilities (San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain). The fish were distributed among 450-l cylindrical tanks supplied with running seawater (salinity: 37 g/l; NO^-_2 : <0.1 mg/l; NO^-_3 : <0.1 mg/l; NH_3 : <0.5 mg/l; pH: 7.7). The tanks formed part of a recirculating system equipped with biological filtration, an ultraviolet lamp and a heat pump that controlled the experimental temperature. The water flow was constantly regulated to maintain the dissolved oxygen at above 70% of the saturation level at the tank output. Animals were subjected to natural photoperiod (37°50'N, 0°46'W) conditions at a constant temperature (24.1 ± 1.6 °C).

2.2. Experimental diets

The fish were fed five different diets: control, basal diet; BHT, containing 200 mg kg⁻¹ of butylated hydroxytoluene (Sigma-Aldrich Inc.); rosemary, with 600 mg kg⁻¹ of rosemary (*R. officinalis*) extract (30% of purity in diterpenes content, Nutrafur-Furfural, Spain, SA); carvacrol, with 500 mg kg⁻¹ of thyme essential oil (*T. capitata*, with 52% of carvacrol concentration) (Blas Lorente González, S.L.); and thymol, with 500 mg kg⁻¹ of thyme essential oil (*T. zygis* subspecies *gracilis*, 55% thymol content) (Blas Lorente González, S.L.). The isonitrogenous and isoenergetic diets were formulated with a lipid content of approximately 20% (Table 1). The ingredients were mixed and the diets were prepared by cooking-extrusion, using a semi-industrial extruder (E 19/25 D BRABENDER). The selected processing conditions were: 50 rpm screw speed, temperatures of 50/60/68 °C, and 4-mm diameter pellets. Butylated hydroxytoluene (BHT), rosemary extract and thyme essential oils were added to the basal diet before the extrusion. Since these products are liposoluble, they were dissolved in fish oil before this was mixed with the rest of the feed ingredients. Samples of all

Table 1
Composition of the experimental diets (g kg⁻¹ diet).

Fish meal	515
Wheat gluten	80
Wheat meal	235
Fish oil	160
Vitamin–mineral premix ^a	10

^a Vitamin and mineral premix, according to NRC (1993) recommendations for fish.

diets were subjected to proximate composition analysis (AOAC, 1997), the results of which are presented in Table 2.

2.3. Experimental design

Testing conditions included a total of 150 fish (with an initial average weight of 198.6 ± 3.8 g), randomly distributed among 15 tanks (10 fish per tank), with each diet being experimentally tested in triplicate (three tanks per treatment). The animals were fed the experimental diets twice a day to apparent satiation. The daily feed consumption was recorded and Daily Intake Rate was calculated (DIR = ((feed intake/mean body weight)/no. of experimental days)). The experiment lasted 18 weeks (from July to November), when the animals reached the commercial size (425.9 ± 53.2 g). At the end of the experiment, all fish were individually weighed, and 16 fish per diet were slaughtered. These were chosen from among the three tanks belonging to each experimental group (five fish from two of the tanks and six from the other) and they were killed by means of hypothermia, using a mix of water and ice (1:3). The whole, uncut fish were then stored in refrigeration at 4 ± 1 °C for 0, 7, 14 and 21 days. They were placed in polystyrene boxes provided with outlets for water drainage and covered with flaked ice inside a plastic bag. Ten boxes were used, two for each experimental group, with eight animals kept in each box. The ice/fish ratio (1:1) was kept constant throughout the storage period.

At each point during the sampling (0, 7, 14 and 21 days), four fish from each group were taken from the respective boxes. These were subjected to physical, chemical analyses and sensory evaluation. The sensory and skin colour evaluations were the first to be performed. The fish were then filleted and the colour on the left side fillet was measured. A piece of both the right and left side fillets was used to determine the water-holding capacity (WHC). The lipid oxidation determination was always performed on left side fillets and microbiological analysis on right side fillets.

2.4. Analytical determinations

2.4.1. Colour measurements

A Minolta Chroma Meter CR400 (Minolta, Osaka, Japan) was used for colour measurements. Colours were expressed in terms of CIE Lab coordinates. According to this system, *L** denotes

Table 2
Proximate composition analysis of experimental diets (as% of dry matter).

Components	Control	BHT	Rosemary	Carvacrol	Thymol
Dry matter	93.4	91.5	90.8	93.0	93.0
Crude protein	45.7	46.2	45.8	46.0	45.5
Crude fat	21.8	21.6	21.7	21.4	21.4
Ash	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8
NFE ^a	17.0	14.7	14.2	16.5	17.0
Fibre	0.2	0.2	0.3	0.4	0.3
Gross energy (MJ/kg of feed)	20.9	20.1	20.1	21.2	21.0

^a Nitrogen free extract.

lightness on a 0–100 scale of black to white; a^* , (+) red or (–) green; b^* , (+) yellow or (–) blue. Colour intensity is expressed by a chroma value, and hue is a colour as it is found in its pure state on the spectrum. These were calculated using the formulae: $C_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ and $H_{ab} = \arctan(b^*/a^*)$, respectively.

Four colour measurements were performed per individual on the left side of the body, as described by Pavlidis, Papanroulakis, and Divanach (2006). Two of them were on the dorsal skin area: (i) at the positions where the vertical line to the longitudinal axis of the body passes through the anterior margin of the dorsal fin (D1) and (ii) at the anus (D2). The other two measurements were on the ventral skin area: (i) below the pelvic fin (V1) and (ii) at the position where the vertical line to the longitudinal axis of the body passes through the anus, crossing the parallel line to the longitudinal axis of the body passing through the ventral margin of the caudal peduncle (V2) (Fig. 1). Three measurements were taken per individual on the fillets; two on the dorsal fillet area at the positions equivalent to positions D1 and D2 of the dorsal skin area (D1 and D2), and one on the ventral fillet area, at the position equivalent to position V2 of the ventral skin area (V2) (Fig. 2). The two measurements on the dorsal section, the two measurements on the ventral section and the three measurements from the fillet were then averaged.

2.4.2. Water-holding capacity (WHC) measurements

Two portions (1×1 cm) of the fillet corresponding to the anterior part of fillets located next to the head of the animal (Fig. 2) were collected to determine their water-holding capacity. Samples were frozen at -80 °C for 18 h, then allowed to thaw at room temperature for 2 h. The WHC was then measured by centrifuging 3 g of raw sample at 3000g and 25 °C for 10 min, collecting the water in a Whatman filter (No. 540). WHC was expressed as percentage

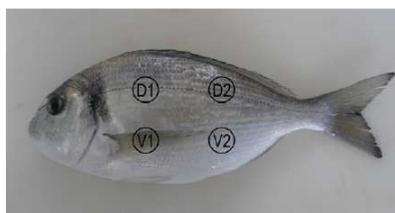


Fig. 1. Representation of the areas of seabream skin where colour was measured.

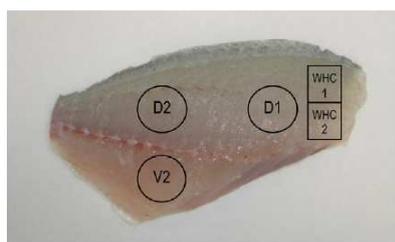


Fig. 2. Representation of the areas of seabream fillets where colour was measured (D1, D2, and V2) and the portions which were collected for water-holding capacity (WHC 1 and 2) tests.

of retained water/total water in the sample before centrifuging (Tejada & Huidobro, 2002).

2.4.3. Lipid oxidation determination

2-Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS, mg malonaldehyde kg^{-1} of sample) were determined according to the method used by Botsoglou et al. (1994). All analyses were performed in duplicate.

2.4.4. Microbiological analysis

In order to perform the microbiological counts, 10 g of sample were added to 90 ml of 0.1% peptone-water (Oxoid code CM 9) and homogenised with a stomacher (IUL-Instruments, Barcelona, Spain). From this homogenate, other decimal dilutions were prepared and plated on the appropriate media. Total aerobic viable bacterial counts were determined by the pour plate method, using plate count agar (PCA, Oxoid code CM 325). The inoculated plates were incubated at 30 °C for 72 h to determine the total viable mesophilic counts, and at 15 °C for 5 days for the psychrophilic counts. For *Enterobacteriaceae*, the sample was inoculated into 10 ml of molten (45 °C) violet red bile glucose agar (VRBGA, Oxoid code CM 485). After setting, a 10 ml overlay of molten medium was added. Incubation was carried out at 37 °C for 24 h. Large colonies with purple haloes were counted. A chromogenic medium (Oxoid code CM 956) was used for culturing coliform/*Escherichia coli* bacteria, incubated at 37 °C for 24 h. In the case of *Pseudomonas*, cefrimide fusidin cephaloridine agar (CFC, Oxoid code CM 559, supplemented with SR 102) was used and incubated at 20 °C for 2 days. Microbiological data were transformed into logarithms of the number of colony-forming units (cfu g^{-1}). All plates were visually examined for typical colony types and morphological characteristics associated with each growth medium. All counts were performed in duplicate.

2.4.5. Sensory assessment

A sensory analysis was performed using the Quality Index Method (QIM) developed for raw gilthead seabream by Huidobro, Pastor, and Tejada (2000) as a reference, as well as the procedure for this species followed by González et al. (2000), in accordance with current legislation (EEC, 1996). Six experienced panelists evaluated the external appearance (skin shine and colour, slime, and surface roughness), the muscular condition (springiness and firmness), body odour and the appearance of the eyes (shape and clarity) and gills (colour and odour) for four animals from each group. A total of 11 parameters were evaluated in such a way that each sensory characteristic modified during storage was assigned a score on a continuous scale of 1–5 demerit points (Table 3). Accordingly, each of the four animals evaluated was assigned a score for each attribute. According to this method, scores of one are assigned for very fresh fish, with increasingly higher scores as the fish deteriorate. The sum of the scores for each parameter determines the final Quality Index.

2.5. Statistical analysis

Values throughout this text are expressed as mean \pm standard deviation. The data were analysed using a one-way ANOVA in order to determine the significance of the effects of storage time and diet. The least significant difference (LSD) was used to compare the means. A regression analysis was used to determine the shelf-life of seabream; the data were fitted using a linear model, $Y = a + bX$, where Y represents the Quality Index, and X is the storage time. The significance of the linear regression differences observed for the control diet and those of the individual diets was analysed using a Chow test (Chow, 1960).

Table 3
Attribute scale for seabream (*Sparus aurata*) sensory evaluation during ice storage.

Parameter being assessed	Defined characteristic	Demerit points
<i>Appearance</i>		
Skin shine	Very shiny	1
	Waxy shine	3
Skin colour	Matte	5
	Bright, iridescent pigmentation, white-silver	1
	Pigmentation in process of discolouration	3
Slime	Dull pigmentation	5
	Clear-transparent	1
	Cloudy	3
Surface	Milky-yellowish	5
	Smooth	1
	Noticeable roughness on the tail, sunken bellies	3
Flesh	Very rough, very sunken bellies	5
Springiness	Very elastic, not mark left when poked	1
Firmness	None, mark left when poked	5
	Very hard	1
Body odour	Very soft	5
	Like fresh fish	1
	Neutral	3
Eyes	Like spoiled fish	5
<i>Eyes</i>		
Clarity	Clear-translucent, black and shiny pupil	1
	Opaque	3
	Bloodshot opaque	5
Shape	Convex	1
	Flat	3
	Concave	5
<i>Gills</i>		
Colour	Red-pink	1
	Dark red	2
	Discolouration, shades of ochre	3
	Brown	4
	Brown-greenish	5
Odour	Fresh	1
	Neutral	3
	Like spoiled fish	5

3. Results

No mortality was observed and all experimental diets were well accepted by the animals. Feed intake was not significantly different from that of the other diets. The overall daily intake rate (DIR) averaged 1.08 throughout the experimental period, which is quite good. Different diets did not significantly affect growth, and the final body weights of different groups were very similar (ranging from 420.2 to 432.2 g).

3.1. Colour

The skin colour measurements on the dorsal section of the gilt-head seabream demonstrated significant variations over time in storage, along with some differences according to the different diets (Table 4). Lightness (L^*) increased over time for all groups, indicating a lightening of the skin. The parameter a^* showed more negative values out of all the groups after the first week ($p < 0.05$). The parameter b^* demonstrated a tendency to decrease over time for all groups except the carvacrol group, in which no changes were observed. The control and thymol groups also demonstrated an increase in b^* at the end of the storage period. Furthermore, differences were observed for parameter b^* according to diet on practically all experimental days ($p < 0.01$), with the rosemary

group presenting the highest values and the BHT group the lowest values of all the groups.

On the ventral section (Table 5), the decrease in L^* over time reflected a darkening of the skin. The variations in the chromatic parameters (a^* and b^*), while demonstrating the same tendency in all groups, were not always significant. The first parameter (a^*) tended towards more negative values, and b^* demonstrated an initial decrease, followed by an increase at the end of the storage period.

In the section of the CIELab diagram where the chromatic parameters are found for both the dorsal and ventral sections, as a^* moves towards more negative values and b^* decreases, the colour tends towards more greenish shades. A linear relationship was further observed on both parts of the body between b^* and C_{ab} ($C_{ab} = 0.8994b^* + 0.6949$; $R^2 = 0.9632$), in such a way that over time in storage, C_{ab} increased or decreased as b^* did the same.

Table 6 shows the values for the colour parameters measured during storage on the fillets of gilthead seabream fed the different diets. L^* increased over time for all groups, indicating a lightening of colour of the fillets ($p < 0.05$). Although no changes occurred over time for parameter a^* , differences were observed for the carvacrol and thymol groups ($p < 0.05$), on days 0 and 14. Parameter b^* demonstrated a trend towards less negative values over time in all groups ($p < 0.05$), except the control group. Differences also were observed for according to diet on practically all experimental days ($p < 0.01$). An inverse proportional relationship between b^* and C_{ab} ($C_{ab} = -0.9248b^* + 0.3681$; $R^2 = 0.9812$) was observed, in such a way that C_{ab} decreased as b^* approached values close to zero. The values for b^* (-4.32 to -1.50) are found in the middle part of the diagram, in the area closest to blue, indicating that the changes which occurred over time resulted in a loss of intensity in the bluish flesh colour and a trend towards a more yellow colour.

3.2. Water-holding capacity (WHC)

The results of WHC (Fig. 4) demonstrated significant differences over storage time for all groups. In the control, rosemary and carvacrol groups, the WHC was lower on days 14 and 21 (92.35–94.31%) as compared to days 0 and 7 (95.99–97.07%) ($p < 0.05$). In the case of thymol, a decrease ($p < 0.05$) was observed as early as day 7 of storage, maintaining the same WHC values over the following days. For the BHT group, WHC values varied between 94.71 and 97.04 during the first 2 weeks of storage, but no significant changes were observed until the last day of sampling ($p < 0.001$).

3.3. Lipid oxidation

The malonaldehyde (MDA) values obtained by the TBA test varied between 0.05 and 0.46 mg kg⁻¹ (Fig. 3). There were significant differences over storage time for the control and BHT groups, with an initial increase followed by a decrease ($p < 0.001$). Higher values were observed for the control and thymol groups than for the rest of the groups on day 14 ($p < 0.05$). High standard deviations were observed for the thymol group at the end of the storage period.

3.4. Microbiological analysis

Microbial growth (Table 7) during storage on ice was significant for all dietary groups and for all counts ($p < 0.001$). This increase occurred mainly during the second week of storage. For the thymol group, the mesophilic count on days 0 and 7 was below 1 log cfu g⁻¹. For the rest of the groups, however, the mesophilic counts during the first week yielded values of approximately 2–3 log cfu g⁻¹. On day 14, these counts reached values very near or above 7 log cfu g⁻¹, with the BHT group showing a lower count than the

Table 4
Colour measurements performed during ice storage on the dorsal skin area of seabream fed the different experimental diets.

	Day	Control	BHT	Rosemary	Carvacrol	Thymol	Significance of diet
<i>L*</i>	d ₀	68.79 ± 1.31 ^{Abc}	73.22 ± 3.06 ^{Aa}	68.11 ± 3.54 ^{Abc}	66.72 ± 2.30 ^{Ac}	71.96 ± 3.41 ^{ab}	*
	d ₇	73.95 ± 1.59 ^B	65.25 ± 2.07 ^B	70.88 ± 2.05 ^{AB}	69.87 ± 3.39 ^{AB}	71.52 ± 3.31	ns
	d ₁₄	72.51 ± 3.26 ^B	74.85 ± 1.81 ^A	73.75 ± 2.02 ^{BC}	75.35 ± 2.33 ^C	77.84 ± 2.91	ns
	d ₂₁	72.72 ± 2.57 ^B	74.70 ± 2.02 ^A	76.74 ± 1.45 ^C	72.79 ± 1.65 ^{BC}	75.35 ± 4.99	ns
Significance of storage <i>a*</i>	d ₀	0.00 ± 0.81 ^A	-0.28 ± 0.60 ^A	-0.26 ± 0.86 ^A	-0.59 ± 0.57 ^A	-0.26 ± 0.69 ^A	ns
	d ₇	-0.77 ± 0.70 ^{AB}	-0.43 ± 0.43 ^A	0.15 ± 0.47 ^A	-0.02 ± 0.54 ^A	-0.15 ± 0.73 ^A	ns
	d ₁₄	-1.51 ± 0.32 ^{BC}	-2.02 ± 0.49 ^B	-1.93 ± 0.47 ^B	-1.76 ± 0.55 ^B	-2.15 ± 0.29 ^B	ns
	d ₂₁	-1.94 ± 0.21 ^C	-2.07 ± 0.24 ^B	-2.28 ± 0.50 ^B	-2.31 ± 0.16 ^B	-2.23 ± 0.42 ^B	ns
Significance of storage <i>b*</i>	d ₀	6.99 ± 0.88 ^{Aa}	4.95 ± 0.57 ^{Abc}	7.09 ± 1.22 ^{Aa}	4.10 ± 0.53 ^C	5.92 ± 0.77 ^{Ab}	**
	d ₇	3.87 ± 0.94 ^{Bbc}	2.52 ± 1.16 ^{Bc}	6.52 ± 0.90 ^{Aa}	5.73 ± 1.59 ^{ab}	3.44 ± 0.67 ^{Bc}	**
	d ₁₄	2.25 ± 0.66 ^C	2.40 ± 1.24 ^B	4.35 ± 1.03 ^B	4.16 ± 1.86	3.18 ± 0.56 ^C	ns
	d ₂₁	4.72 ± 0.53 ^{Bb}	2.27 ± 0.92 ^{Bc}	4.73 ± 0.96 ^{Bb}	5.81 ± 1.19 ^a	4.64 ± 0.82 ^{ABb}	**
Significance of storage <i>C_{ab}</i>	d ₀	7.06 ± 0.89 ^{Aa}	5.02 ± 0.56 ^{Abc}	7.21 ± 1.29 ^{Aa}	4.21 ± 0.50 ^C	6.00 ± 0.74 ^{Ab}	**
	d ₇	4.12 ± 0.71 ^{Bcb}	2.70 ± 0.94 ^{Bc}	6.56 ± 0.88 ^{Ab}	5.76 ± 1.58 ^{ab}	3.53 ± 0.66 ^{Bc}	**
	d ₁₄	2.89 ± 0.67 ^C	3.55 ± 0.58 ^B	4.68 ± 1.04 ^C	4.64 ± 1.44	3.89 ± 0.59 ^B	ns
	d ₂₁	5.10 ± 0.36 ^{Bb}	3.30 ± 0.40 ^{Bc}	5.31 ± 0.69 ^{Bcb}	6.30 ± 1.08 ^a	5.28 ± 0.58 ^{Ab}	**
Significance of storage <i>H^{ab}</i>	d ₀	0.00 ± 1.18	-0.99 ± 0.77	0.43 ± 0.88	-1.01 ± 0.66	-0.49 ± 0.84	ns
	d ₇	-1.22 ± 0.23	-0.73 ± 0.87	-0.02 ± 1.22	0.03 ± 1.72	-0.49 ± 1.54	ns
	d ₁₄	-0.86 ± 0.08	-0.70 ± 0.37	-1.19 ± 0.04	-1.11 ± 0.31	-0.95 ± 0.05	ns
	d ₂₁	-1.18 ± 0.10	-0.73 ± 0.32	-1.10 ± 0.16	-1.16 ± 0.07	-1.07 ± 0.13	ns
Significance of storage	ns	ns	ns	ns	ns	ns	

Mean values of four samples ± standard deviation.
*L**, lightness (0 black-100 white); *a**, (+) red or (-) green; *b**, (+) yellow or (-) blue; *C_{ab}*, chroma; *H^{ab}*, hue.
 Different capital letters (A-C) within the same column (different storage day) indicate significant differences (*p* < 0.05).
 Different lower case letters (a-c) within the same row (different diets) indicate significant differences (*p* < 0.05).
 ns, not significant.
 * *p* < 0.05.
 ** *p* < 0.01.
 *** *p* < 0.001.

Table 5
Colour measurements performed during ice storage on the ventral skin area of seabream fed the different experimental diets.

	Day	Control	BHT	Rosemary	Carvacrol	Thymol	Significance of diet
<i>L*</i>	d ₀	90.20 ± 1.31 ^A	90.56 ± 0.16 ^A	90.94 ± 1.28 ^A	90.84 ± 0.55 ^A	90.63 ± 1.39 ^A	ns
	d ₇	90.38 ± 0.42 ^A	89.81 ± 0.27 ^A	91.20 ± 1.17 ^A	89.92 ± 1.79 ^A	89.37 ± 1.99 ^A	ns
	d ₁₄	88.50 ± 0.39 ^B	89.76 ± 0.76 ^A	88.82 ± 1.75 ^{AB}	89.42 ± 1.06 ^A	89.68 ± 1.80 ^A	ns
	d ₂₁	85.48 ± 1.48 ^C	88.01 ± 1.50 ^B	86.59 ± 2.09 ^B	87.16 ± 1.00 ^B	86.38 ± 2.15 ^B	ns
Significance of storage <i>a*</i>	d ₀	-0.77 ± 0.31	-0.61 ± 0.12 ^A	-0.50 ± 0.22 ^A	-0.54 ± 0.21 ^A	-0.70 ± 0.30 ^A	ns
	d ₇	-0.95 ± 0.23	-1.21 ± 0.24 ^B	-1.10 ± 0.44 ^B	-1.08 ± 0.15 ^B	-1.35 ± 0.25 ^B	ns
	d ₁₄	-1.18 ± 0.31	-1.44 ± 0.25 ^B	-1.28 ± 0.06 ^B	-1.39 ± 0.08 ^C	-1.32 ± 0.14 ^B	ns
	d ₂₁	-1.14 ± 0.23	-1.37 ± 0.23 ^B	-1.27 ± 0.13 ^B	-1.48 ± 0.24 ^C	-1.62 ± 0.40 ^B	ns
Significance of storage <i>b*</i>	d ₀	4.33 ± 0.43	3.70 ± 0.35	4.26 ± 0.85 ^{AB}	4.06 ± 0.60 ^{AB}	3.27 ± 0.57 ^A	ns
	d ₇	3.71 ± 0.78	3.10 ± 0.72	2.92 ± 1.04 ^C	3.36 ± 0.90 ^{BC}	3.52 ± 0.84 ^A	ns
	d ₁₄	3.11 ± 0.94	3.19 ± 0.40	3.02 ± 0.98 ^{BC}	2.27 ± 0.97 ^C	2.46 ± 1.01 ^A	ns
	d ₂₁	3.91 ± 0.40	4.37 ± 0.93	4.46 ± 0.38 ^A	5.16 ± 0.55 ^A	5.38 ± 0.70 ^B	ns
Significance of storage <i>C_{ab}</i>	d ₀	4.43 ± 0.38	3.76 ± 0.33 ^A	4.31 ± 0.80 ^{AB}	4.11 ± 0.58 ^A	3.37 ± 0.51 ^A	ns
	d ₇	3.85 ± 0.73	3.38 ± 0.57 ^A	3.29 ± 0.73 ^B	3.56 ± 0.84 ^{AB}	3.81 ± 0.73 ^A	ns
	d ₁₄	3.35 ± 0.95	3.51 ± 0.43 ^A	3.31 ± 0.92 ^B	2.72 ± 0.79 ^B	2.85 ± 0.92 ^A	ns
	d ₂₁	4.10 ± 0.42 ^C	4.63 ± 0.79 ^{Bbc}	4.65 ± 0.40 ^{Abc}	5.42 ± 0.47 ^{Cab}	5.60 ± 0.75 ^{Ba}	*
Significance of storage <i>H^{ab}</i>	d ₀	-1.37 ± 0.08	-1.40 ± 0.04 ^A	-1.43 ± 0.09	-1.43 ± 0.06 ^A	-0.96 ± 0.74	ns
	d ₇	-1.31 ± 0.09	-1.15 ± 0.17 ^B	-1.07 ± 0.35	-1.21 ± 0.12 ^B	-1.17 ± 0.12	ns
	d ₁₄	-1.19 ± 0.09	-1.14 ± 0.05 ^B	-1.12 ± 0.12	-0.95 ± 0.23 ^C	-1.02 ± 0.16	ns
	d ₂₁	-1.27 ± 0.07	-1.23 ± 0.14 ^{AB}	-1.28 ± 0.02	-1.27 ± 0.07 ^{AB}	-1.29 ± 0.08	ns
Significance of storage	ns	ns	ns	ns	ns	ns	

Mean values of four samples ± standard deviation.
*L**, lightness (0 black-100 white); *a**, (+) red or (-) green; *b**, (+) yellow or (-) blue; *C_{ab}*, chroma; *H^{ab}*, hue.
 Different capital letters (A-C) within the same column (different storage day) indicate significant differences (*p* < 0.05).
 Different lower case letters (a-c) within the same row (different diets) indicate significant differences (*p* < 0.05).
 ns, not significant.
 * *p* < 0.05.
 ** *p* < 0.01.
 *** *p* < 0.001.

Table 6
Colour measurements performed during ice storage of seabream fillets for fish fed the different experimental diets.

	Day	Control	BHT	Rosemary	Carvacrol	Thymol	Significance of diet
L^*	d ₀	40.95 ± 2.01 ^A	40.28 ± 1.29 ^A	39.14 ± 0.65 ^A	39.28 ± 1.37 ^A	39.93 ± 0.23 ^A	ns
	d ₇	42.13 ± 0.37 ^A	41.04 ± 1.27 ^{AB}	42.06 ± 1.42 ^{BC}	42.63 ± 1.16 ^B	40.97 ± 1.09 ^A	ns
	d ₁₄	42.05 ± 0.56 ^A	41.99 ± 0.81 ^B	41.68 ± 1.26 ^B	41.95 ± 0.77 ^B	40.87 ± 1.10 ^A	ns
	d ₂₁	44.09 ± 1.57 ^B	44.91 ± 0.79 ^C	43.42 ± 0.60 ^C	43.17 ± 0.87 ^B	43.57 ± 0.78 ^B	ns
Significance of storage a^*	d ₀	-0.52 ± 0.21 ^b	-0.63 ± 0.24 ^b	-0.47 ± 0.51 ^b	0.38 ± 0.20 ^a	-0.20 ± 0.24 ^b	**
	d ₇	-0.43 ± 0.44	0.00 ± 0.50	-0.35 ± 0.34	-0.33 ± 0.40	-0.38 ± 0.51	ns
	d ₁₄	-0.10 ± 0.39 ^{ab}	-0.47 ± 0.17 ^b	-0.57 ± 0.31 ^b	-0.16 ± 0.29 ^{ab}	0.32 ± 0.28 ^a	*
	d ₂₁	-0.52 ± 0.18	-0.34 ± 0.28	-0.33 ± 0.43	0.15 ± 0.42	-0.42 ± 0.48	ns
Significance of storage b^*	d ₀	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	d ₇	-3.30 ± 0.33 ^{ab}	-3.13 ± 0.39 ^{ABa}	-3.93 ± 0.12 ^{Abc}	-2.87 ± 0.77 ^{Aa}	-3.98 ± 0.25 ^{Ac}	**
	d ₁₄	-3.80 ± 0.30	-4.00 ± 0.34 ^C	-4.32 ± 0.34 ^A	-4.10 ± 0.67 ^B	-3.78 ± 0.38 ^{AB}	ns
	d ₂₁	-3.68 ± 0.41 ^b	-3.26 ± 0.78 ^{BCb}	-2.94 ± 0.73 ^{Bb}	-3.03 ± 0.49 ^{Ab}	-1.50 ± 0.74 ^{Ca}	**
Significance of storage C_{ab}	d ₀	3.41 ± 0.34 ^{bc}	3.27 ± 0.42 ^{ABc}	4.02 ± 0.09 ^{ABab}	3.09 ± 0.69 ^{Ac}	4.04 ± 0.25 ^{Aa}	*
	d ₇	3.97 ± 0.31	4.06 ± 0.33 ^C	4.38 ± 0.34 ^A	4.19 ± 0.65 ^B	3.88 ± 0.39 ^A	ns
	d ₁₄	3.71 ± 0.42 ^a	3.32 ± 0.77 ^{BCa}	3.37 ± 0.36 ^{Ba}	3.07 ± 0.50 ^{Aa}	1.86 ± 0.54 ^{Bb}	*
	d ₂₁	3.54 ± 0.42 ^a	2.48 ± 0.10 ^{Ab}	2.02 ± 0.82 ^{Cb}	1.97 ± 0.32 ^{Cb}	2.87 ± 1.01 ^{Bab}	*
Significance of storage H_{ab}^*	d ₀	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	d ₇	0.65 ± 0.48	0.64 ± 0.51	0.69 ± 0.40	-0.09 ± 0.55	-0.04 ± 0.57	ns
	d ₁₄	0.41 ± 0.94	0.53 ± 0.74	0.72 ± 0.46	0.82 ± 0.51	0.76 ± 0.52	ns
	d ₂₁	0.50 ± 0.78	1.17 ± 0.51	1.09 ± 0.50	0.77 ± 0.44	0.51 ± 0.63	ns
Significance of storage	d ₀	0.92 ± 0.54	0.79 ± 0.48	0.35 ± 0.84	0.42 ± 0.80	0.79 ± 1.02	ns
	d ₇	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	d ₁₄	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	d ₂₁	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Mean values of four samples ± standard deviation.

L^* , lightness (0 black–100 white); a^* , (+) red or (-) blue; b^* , (+) yellow or (-) blue; C_{ab} , chroma; H_{ab}^* , hue.

Different capital letters (A–C) within the same column (different storage day) indicate significant differences ($p < 0.05$).

Different lower case letters (a–c) within the same row (different diets) indicate significant differences ($p < 0.05$).

ns, not significant.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

*** $p < 0.001$.

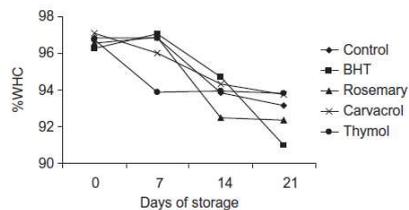


Fig. 3. Seabream flesh WHC (%) values during ice storage for each experimental diet.

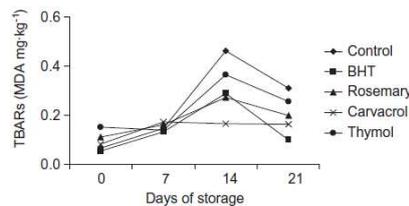


Fig. 4. Seabream flesh TBARs (mg MDA kg⁻¹ sample) values during ice storage for each experimental diet.

rest of the groups, and the rosemary group having the highest count ($p < 0.001$). The growth of psychrophiles was similar to that of the mesophiles. In this case, growth was detected in the thymol

group on all days of storage, although counts were lower than the rest of the groups on days 7 ($p > 0.05$) and 14 ($p < 0.001$).

Except for in the control and carvacrol groups, no *Pseudomonas* were detected until day 14 of storage. On the remaining days, values similar to those for the mesophilic and psychrophilic counts were obtained, with lower counts for the BHT and thymol groups on day 14 ($p < 0.001$). None of the other microorganisms were detected before day 14 of storage for any of the experimental groups. For the *Enterobacteriaceae* count, differences among the diets were only observed on the last day of storage, with the values for the rosemary and carvacrol groups being higher than the rest ($p < 0.001$). In the case of coliforms, differences among the different diets were observed on day 14 and 21, with higher counts for the control and rosemary diets.

3.5. Sensory assessment

Table 8 shows the average values for the scores assigned to each parameter assessed by the sensory analysis. The variations for all parameters considered were significant over storage time on ice ($p < 0.001$). On day 0, all parameters had values of nearly 1.0, indicating the maximum degree of fish freshness. After one week, on day 7, the "body odour," "slime," "gill colour," "gill odour" and "eye shape" each scored around 3.00. On day 21, the scores varied between 4.0 and 5.0 for practically all attributes. The eye shape score at the end of the storage period was lower for the BHT and thymol groups, indicating that it was not as sunken for these groups ($p < 0.001$).

The Quality Index values varied between 11.5–11.9 on day 0, and 42.0–47.6 on day 21 (Table 8). The differences were significant over days in storage on ice for all groups ($p < 0.001$) and all treatments on day 21 ($p < 0.01$). As the number of days in refrigeration

Table 7
Seabream flesh microbiological counts (log cfu g⁻¹) during ice storage for each experimental diet.

	Day	Control	BHT	Rosemary	Carvacrol	Thymol	Significance of diet
Total aerobic mesophilic	d ₀	2.94 ± 0.14 ^{Ab}	3.07 ± 0.24 ^{Ab}	3.09 ± 0.19 ^{Ab}	2.39 ± 0.41 ^{Ab}	<1.00 ^{Ab}	***
	d ₇	2.67 ± 0.17 ^{Ac}	3.08 ± 0.20 ^{Ab}	2.97 ± 0.09 ^{Ab}	3.31 ± 0.21 ^{Ba}	<1.00 ^{Ad}	***
	d ₁₄	7.01 ± 0.26 ^{Bb}	6.41 ± 0.27 ^{Bc}	7.53 ± 0.20 ^{Ba}	7.14 ± 0.15 ^{Cb}	6.79 ± 0.26 ^{Bb}	***
	d ₂₁	7.74 ± 0.37 ^B	7.49 ± 0.08 ^C	7.90 ± 0.15 ^C	7.78 ± 0.33 ^D	7.67 ± 0.03 ^C	***
	ns
Significance of storage							
Total aerobic psychrophilic	d ₀	2.01 ± 0.34 ^{Ab}	2.90 ± 0.20 ^{Aa}	3.08 ± 0.11 ^{Aa}	2.47 ± 0.24 ^{Aa}	2.66 ± 0.28 ^{Aa}	**
	d ₇	3.43 ± 0.64 ^B	3.44 ± 0.18 ^B	3.71 ± 0.22 ^B	3.25 ± 0.38 ^B	2.89 ± 0.24 ^A	ns
	d ₁₄	7.03 ± 0.14 ^{Cb}	6.97 ± 0.06 ^{Cb}	7.48 ± 0.24 ^{Ca}	7.12 ± 0.14 ^{Cb}	6.52 ± 0.10	***
	d ₂₁	7.71 ± 0.21 ^{Cb}	7.55 ± 0.12 ^{Bc}	8.13 ± 0.09 ^{Ba}	7.79 ± 0.24 ^{Db}	7.61 ± 0.05 ^{Cb}	**
	ns
Significance of storage							
<i>Pseudomonas</i>	d ₀	<1.00 ^A	<1.00 ^A	<1.00 ^A	<1.00 ^A	<1.00 ^A	ns
	d ₇	2.22 ± 0.34 ^{Bb}	<1.00 ^{Ac}	<1.00 ^{Ac}	2.82 ± 0.25 ^{Ba}	<1.00 ^{Ac}	***
	d ₁₄	6.90 ± 0.19 ^{Cb}	6.02 ± 0.07 ^{Bd}	7.05 ± 0.08 ^{Bab}	7.14 ± 0.15 ^{Ca}	6.30 ± 0.21 ^{Bc}	***
	d ₂₁	7.45 ± 0.32 ^C	7.27 ± 0.22 ^C	7.75 ± 0.11 ^C	7.63 ± 0.26 ^D	7.56 ± 0.37 ^C	ns
	ns
Significance of storage							
Enterobacteriaceae	d ₀	<1.00 ^A	<1.00 ^A	<1.00 ^A	<1.00 ^A	<1.00 ^A	ns
	d ₇	<1.00 ^A	<1.00 ^A	<1.00 ^A	<1.00 ^A	<1.00 ^A	ns
	d ₁₄	3.98 ± 0.43 ^B	4.26 ± 0.26 ^B	4.50 ± 0.05 ^B	4.47 ± 0.08 ^B	4.32 ± 0.21 ^B	ns
	d ₂₁	4.52 ± 0.09 ^{Cb}	4.48 ± 0.10 ^{Cb}	4.79 ± 0.03 ^{Ca}	4.71 ± 0.03 ^{Ba}	4.52 ± 0.04 ^{Cb}	***
	ns
Significance of storage							
Coliforms	d ₀	<1.00 ^A	<1.00 ^A	<1.00 ^A	<1.00 ^A	<1.00 ^A	ns
	d ₇	<1.00 ^A	<1.00 ^A	<1.00 ^A	<1.00 ^A	<1.00 ^A	ns
	d ₁₄	2.86 ± 0.04 ^{Ba}	1.74 ± 0.20 ^{Bb}	3.10 ± 0.11 ^{Ba}	1.64 ± 0.15 ^{Bb}	1.54 ± 0.49 ^{Bb}	***
	d ₂₁	3.47 ± 0.13 ^{Ca}	2.66 ± 0.44 ^{Cb}	3.24 ± 0.23 ^{Ba}	2.62 ± 0.21 ^{Cb}	2.39 ± 0.27 ^{Cb}	***
	ns
Significance of storage							
<i>E. coli</i> <1.00							

Mean values of four samples ± standard deviation.

Different capital letters (A–D) within the same column (different storage day) indicate significant differences ($p < 0.05$).

Different lower case letters (a–d) within the same row (different diets) indicate significant differences ($p < 0.05$).

ns, not significant.

<1.00 negative counts.

** $p < 0.01$.

*** $p < 0.001$.

increased, so did the index, with the lowest values associated with the BHT and thymol diets.

4. Discussion

The antioxidant effect of diets supplemented with tocopherols on fish during storage has already been demonstrated in some species (Ruff et al., 2002, 2003; Scaife et al., 2000). However, to our knowledge, few studies have considered the effect of adding polyphenolic compounds to fish diets. The high content of phenolic compounds present in essential oils (EOs) of thyme and oregano and rosemary extracts gives them antioxidant and antibacterial properties. Thymol and carvacrol, along with monoterpene hydrocarbons, *p*-cymene and γ -terpinene, constitute the phenolic compounds that are the most active and abundant in oregano and thyme (Burt, 2004). In the case of rosemary, the antioxidant effect is due to the phenolic diterpenes carnosol and carnosic acid, as well as rosmanol, epirosmanol, isorosmanol, methylcamosate and rosmarinic acid (Zheng & Wang, 2001).

Ortiz et al. (2009) reported acceptable oxidised taste scores up until the final period of storage for coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) specimens that had been fed diets supplemented with antioxidants. These authors observed greater oxidative stability in animals that had been fed a diet containing BHT and ethoxyquin (EQ) as compared to those receiving a diet containing tocopherol isomers; nonetheless, the effect of combining tocopherol isomers and rosemary extract provided results similar to the diet containing synthetic antioxidants. Akhtar et al. (1998) also demonstrated an antioxidant effect for diets with α -tocopheryl acetate, canthaxanthin and oleoresin rosemary in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In the case of turkey meat, diets with essential oil of

oregano have proven to be just as effective as those containing α -tocopheryl acetate (Botsoglou et al., 2003). However, in pork, oregano oil showed no significant effects (Simitzis et al., 2010). Likewise, O'Grady et al. (2006) failed to observe any significant effects on steaks in storage when tea catechins and rosemary extract were added to the diets of cattle used for beef production.

In meat products, oxidative processes are associated with meat discoloration, as lipidic oxidation leads to the formation of pro-oxidants that can react with oxymyoglobin, resulting in the formation of methemoglobin (Frankel, 1998). Some researchers have described a reduction in the colour deterioration of red meat with the use of antioxidants in the animals' diets (Nieto et al., 2010a, 2010b; Simitzis et al., 2008).

The present study analysed the colour changes that occurred on both the skin and flesh of gilthead seabream. On the skin, the variations in the chromatic parameters (a^* and b^*) and the value of C_{ab} indicated a change in colour from a yellowish shade to a more intense green. On the dorsal section, these changes occurred most intensely in the control group. Pavlidis et al. (2006) postulate that the *post mortem* changes in the chromaticity of fish skin may be related to changes in light reflection as the result of cellular autolysis, denaturation of muscle proteins (which decreases the water retention of the flesh) and/or changes in the intensity of pigments within the chromatophores.

In the flesh, the main factor involved in the change in chromaticity was associated with the b^* parameter, indicating a tendency towards a more yellowish shade over time. Similar results have been obtained by other studies for turbot (*Scophthalmus maximus*), where a relationship was also observed between the yellowing of the flesh and lipid oxidation (Ruff et al., 2002; Ruff et al., 2003). In both studies, animals fed diets supplemented with 500 y 1000 mg kg⁻¹ of α -tocopheryl acetate demonstrated less colour

Table 8
Seabream sensory evaluation during ice storage for each experimental diet.

	Day	Control	BHT	Rosemary	Carvacrol	Thymol	Significance of diet
Skin shine	d ₀	1.0 ± 0.0 ^A	1.0 ± 0.0 ^A	1.0 ± 0.0 ^A	1.0 ± 0.1 ^A	1.1 ± 0.1 ^A	ns
	d ₇	2.3 ± 0.5 ^B	2.3 ± 0.6 ^B	2.4 ± 0.4 ^B	2.4 ± 0.5 ^B	2.3 ± 0.5 ^B	ns
	d ₁₄	2.8 ± 0.8 ^B	3.0 ± 0.8 ^{BC}	3.2 ± 1.1 ^B	3.0 ± 0.9 ^{BC}	3.0 ± 0.9 ^B	ns
	d ₂₁	3.8 ± 0.6 ^C	3.6 ± 0.6 ^C	3.6 ± 0.6 ^C	3.8 ± 0.6 ^C	3.6 ± 0.7 ^C	ns
Significance of storage	
Skin colour	d ₀	1.1 ± 0.2 ^A	ns				
	d ₇	2.2 ± 0.3 ^B	2.1 ± 0.3 ^B	2.6 ± 0.5 ^B	2.7 ± 0.5 ^B	2.3 ± 0.5 ^B	ns
	d ₁₄	3.3 ± 0.5 ^C	3.6 ± 0.5 ^C	3.6 ± 0.5 ^C	3.6 ± 0.5 ^C	3.5 ± 0.5 ^C	ns
	d ₂₁	4.9 ± 0.0 ^D	4.6 ± 0.5 ^D	4.8 ± 0.2 ^D	4.8 ± 0.2 ^D	4.6 ± 0.5 ^D	ns
Significance of storage	
Slime	d ₀	1.0 ± 0.0 ^A	ns				
	d ₇	2.9 ± 0.4 ^B	2.8 ± 0.5 ^B	2.8 ± 0.5 ^B	2.9 ± 0.4 ^B	2.9 ± 0.5 ^B	ns
	d ₁₄	3.5 ± 0.6 ^C	3.8 ± 0.4 ^C	3.5 ± 0.5 ^C	3.7 ± 0.5 ^C	3.8 ± 0.4 ^B	ns
	d ₂₁	4.9 ± 0.1 ^D	4.7 ± 0.3 ^D	4.7 ± 0.5 ^A	5.0 ± 0.0 ^D	4.6 ± 0.5 ^C	ns
Significance of storage	
Surface	d ₀	1.0 ± 0.0 ^A	1.0 ± 0.1 ^A	ns			
	d ₇	1.5 ± 0.3 ^A	1.5 ± 0.2 ^A	1.5 ± 0.1 ^A	1.4 ± 0.3 ^A	1.5 ± 0.1 ^A	ns
	d ₁₄	2.2 ± 0.4 ^B	2.3 ± 0.6 ^B	2.3 ± 0.6 ^B	2.2 ± 0.4 ^B	2.2 ± 0.4 ^B	ns
	d ₂₁	3.5 ± 0.8 ^C	3.5 ± 0.8 ^C	3.6 ± 0.8 ^C	3.5 ± 0.8 ^C	3.5 ± 0.7 ^C	ns
Significance of storage	
Flesh springiness	d ₀	1.1 ± 0.2 ^A	ns				
	d ₇	2.1 ± 0.8 ^B	1.5 ± 0.4 ^B	2.0 ± 0.4 ^B	1.8 ± 0.1 ^B	1.7 ± 0.5 ^{AB}	ns
	d ₁₄	3.4 ± 0.4 ^C	3.1 ± 0.2 ^C	3.0 ± 0.1 ^C	3.4 ± 0.4 ^C	2.6 ± 1.1 ^B	ns
	d ₂₁	4.5 ± 0.5 ^D	4.5 ± 0.4 ^D	4.8 ± 0.3 ^D	4.7 ± 0.4 ^D	4.5 ± 0.6 ^C	ns
Significance of storage	
Flesh firmness	d ₀	1.0 ± 0.0 ^A	1.0 ± 0.0 ^A	1.0 ± 0.0 ^A	1.1 ± 0.1 ^A	1.0 ± 0.0 ^A	ns
	d ₇	1.8 ± 0.3 ^B	1.8 ± 0.5 ^B	2.0 ± 0.4 ^B	2.1 ± 0.4 ^B	2.2 ± 0.1 ^B	ns
	d ₁₄	3.4 ± 0.2 ^C	3.4 ± 0.3 ^C	3.3 ± 0.4 ^C	3.5 ± 0.3 ^C	3.4 ± 0.3 ^C	ns
	d ₂₁	4.3 ± 0.2 ^D	4.5 ± 0.3 ^D	4.5 ± 0.3 ^D	4.2 ± 0.2 ^D	4.1 ± 0.3 ^D	ns
Significance of storage	
Body odour	d ₀	1.2 ± 0.2 ^A	1.2 ± 0.2 ^A	1.1 ± 0.1 ^A	1.1 ± 0.1 ^A	1.1 ± 0.1 ^A	ns
	d ₇	3.2 ± 0.3 ^B	3.0 ± 0.5 ^B	2.9 ± 0.2 ^B	3.3 ± 0.4 ^B	3.3 ± 0.4 ^B	ns
	d ₁₄	3.9 ± 0.5 ^C	3.4 ± 0.3 ^B	3.7 ± 0.4 ^C	3.3 ± 0.4 ^B	3.4 ± 0.7 ^B	ns
	d ₂₁	4.8 ± 0.2 ^D	4.6 ± 0.4 ^C	4.7 ± 0.2 ^D	4.7 ± 0.2 ^C	4.5 ± 0.4 ^C	ns
Significance of storage	
Eye Clarity	d ₀	1.0 ± 0.0 ^A	ns				
	d ₇	2.4 ± 0.5 ^B	2.2 ± 0.2 ^B	2.1 ± 0.4 ^B	2.2 ± 0.6 ^B	2.0 ± 0.3 ^B	ns
	d ₁₄	2.7 ± 0.3 ^B	2.7 ± 0.3 ^B	2.7 ± 0.3 ^B	2.8 ± 0.7 ^B	2.8 ± 0.7 ^C	ns
	d ₂₁	3.5 ± 0.6 ^C	2.8 ± 0.9 ^B	4.0 ± 0.9 ^C	4.1 ± 0.5 ^C	3.5 ± 0.4 ^D	ns
Significance of storage	
Eye Shape	d ₀	1.0 ± 0.0 ^A	ns				
	d ₇	3.4 ± 0.4 ^B	2.1 ± 0.4 ^B	2.7 ± 0.6 ^B	2.8 ± 0.6 ^B	2.6 ± 0.6 ^B	ns
	d ₁₄	4.3 ± 0.7 ^C	3.8 ± 0.3 ^C	3.7 ± 0.3 ^C	4.1 ± 0.6 ^C	4.1 ± 0.6 ^C	ns
	d ₂₁	4.9 ± 0.1 ^{Da}	2.3 ± 0.5 ^{Bc}	4.9 ± 0.1 ^{Da}	5.0 ± 0.0 ^{Da}	3.4 ± 0.6 ^{Bcb}	...
Significance of storage	
Gill colour	d ₀	1.1 ± 0.2 ^A	1.2 ± 0.1 ^A	1.3 ± 0.3 ^A	1.4 ± 0.4 ^A	1.1 ± 0.1 ^A	ns
	d ₇	3.0 ± 0.4 ^B	2.7 ± 0.8 ^B	2.9 ± 0.7 ^B	2.8 ± 0.7 ^B	2.8 ± 0.4 ^B	ns
	d ₁₄	4.0 ± 0.2 ^C	4.2 ± 0.3 ^C	3.8 ± 0.6 ^C	3.8 ± 0.6 ^C	3.8 ± 0.6 ^C	ns
	d ₂₁	4.5 ± 0.4 ^D	3.3 ± 0.8 ^D	4.4 ± 0.7 ^D	4.2 ± 0.6 ^D	4.1 ± 0.4 ^D	ns
Significance of storage	
Gill odour	d ₀	1.0 ± 0.0 ^A	ns				
	d ₇	3.6 ± 0.4 ^B	3.4 ± 0.3 ^B	3.4 ± 0.3 ^B	3.4 ± 0.4 ^B	3.3 ± 0.6 ^B	ns
	d ₁₄	4.3 ± 0.5 ^C	3.9 ± 0.1 ^C	3.8 ± 0.4 ^C	3.6 ± 0.3 ^B	3.8 ± 0.7 ^B	ns
	d ₂₁	5.0 ± 0.0 ^D	4.8 ± 0.2 ^D	4.8 ± 0.2 ^D	4.8 ± 0.2 ^C	4.8 ± 0.2 ^C	ns
Significance of storage	
Quality Index	d ₀	11.5 ± 0.6 ^A	11.6 ± 0.6 ^A	11.6 ± 0.5 ^A	11.9 ± 0.5 ^A	11.6 ± 0.4 ^A	ns
	d ₇	28.4 ± 1.8 ^B	25.3 ± 1.4 ^B	27.5 ± 1.2 ^B	27.8 ± 0.6 ^B	26.7 ± 1.9 ^B	ns
	d ₁₄	37.9 ± 1.2 ^C	37.1 ± 1.8 ^C	36.0 ± 1.3 ^C	36.3 ± 1.4 ^C	35.7 ± 3.1 ^C	ns
	d ₂₁	47.4 ± 2.7 ^{Da}	42.0 ± 3.2 ^{Db}	47.6 ± 3.8 ^{Da}	47.5 ± 2.0 ^{Da}	43.0 ± 3.5 ^{Dab}	*
Significance of storage	

Mean values of four samples ± standard deviation.

Different capital letters (A–C) within the same column (different storage day) indicate significant differences ($p < 0.05$).

Different lower case letters (a–c) within a same row (different diets) indicate significant differences ($p < 0.05$).

ns, not significant.

* $p < 0.05$.

*** $p < 0.001$.

deterioration than those fed diets containing 100 mg kg⁻¹ of antioxidant. Scaife et al. (2000) also observed less colour deterioration in samples of Atlantic salmon (*Salmo salar*) that were fed diets containing medium (573 mg kg⁻¹) and high (865 mg kg⁻¹) levels of α -

tocopheryl acetate, as compared to those fed diets with lesser amounts (184 mg kg⁻¹). These authors observed a correlation between colour changes and carotenoid content, and attributed these changes to a higher oxidation rate for the carotenoids present in

the flesh. Tironi et al. (2010) also observed a lesser decrease in the parameter a^* over time in sea salmon minced fillets (*Pseudoperca semifasciata*) preserved with rosemary extract (200 and 500 mg kg⁻¹). In the present study, the colour changes occurring in the flesh were more noticeable in the groups fed diets supplemented with rosemary extract and carvacrol. No colour changes occurred in the control group, however, which suggests that other factors may be related to this change.

The ability of the flesh to retain water is considered to be a basic quality parameter and one of great importance to both the industry and the consumer. In our study, a reduction in WHC was observed over time in storage on ice ($p < 0.05$) for all groups. This is in line with the gradual decrease that has been observed in samples stored in frozen form (Attouchi & Sadok, 2010). These authors also obtained less liquid loss over time for gilthead seabream fillets treated with thymol. The lower rate of liquid loss in fillets preserved with thymol (1% w/w) was attributed to its antibacterial effect. In the present study, no significant differences in WHC were obtained among the groups fed different diets. This would seem to agree with another recent study in which the drip loss in pork also remained unaffected by diets supplemented with different amounts (0.25, 0.5 and 1 ml kg⁻¹ of fed diet) of essential oil of oregano (Simitzis et al., 2010).

Another interesting parameter to consider is the TBARS value. This represents a lipid oxidation index that measures the malondialdehyde (MDA) content formed from hydroperoxides, which are products of the initial reaction between polyunsaturated fatty acids and oxygen (Fernández, Pérez-Álvarez, & Fernández-López, 1997). Due to the high content of polyunsaturated fatty acids in marine fish, lipid oxidation is one of the main causes of deterioration during storage. In the present study, the control and thymol groups exhibited higher values at the end of the storage period. However, due to the high variability of the TBARS values among the specimens in the thymol group, the differences observed on day 21 remained insignificant. The number of molecules produced by secondary oxidation that can be measured with thiobarbituric acid (TBA) is the result of a balance between their formation and breakdown as the primary oxidation occurs (Kim & Labella, 1987; in Ortiz et al., 2009). Our results would seem to indicate that oxidation in the control and thymol groups must have occurred early on and to a greater extent than in the rest of the groups. Likewise, the dispersion in the TBARS values suggests that the lipid oxidation process did not occur in the same way in all samples (Tironi et al., 2010).

The TBARS values obtained in the present study were lower than those reported by other authors (Cakli et al., 2007; Goulas & Kontominas, 2007; Kilinc et al., 2007; Kostaki et al., 2009). According to Cakli et al. (2007), the values of 0.36–0.96 mg MDA kg⁻¹ obtained for gilthead seabream stored for 18 days under similar conditions might indicate that no oxidation spoilage occurred. Connell (1995) establishes a value of 1–2 mg of MDA kg⁻¹ as what is normally considered as the limit above which fish develops an unacceptable odour and flavour. In spite of the fact that our TBARS values failed to reflect obvious oxidative deterioration, lower values were observed for the BHT, carvacrol and, to a lesser extent, rosemary groups ($p < 0.05$).

The antioxidant activity of phenolic compounds is due to their ability to scavenge free radicals, donate hydrogen atoms or electron, or chelate metal cations (Amarowicz, Pegg, Rahimi-Moghadam, Barl, & Weil, 2004). According to Descalzo and Sancho (2008), polyphenolic compounds are incorporated into the cell membranes protecting the tissues from oxidation by reactive oxygen species. This effect has been observed to be even greater when these compounds are added *post mortem* as preservatives (Kerry, Buckley, Morrissey, O'Sullivan, & Lynch, 1999). In fish, the antioxidant effect of this type of compounds used as preservatives during

storage has been described for both fillets and minced muscle (Attouchi & Sadok, 2010; Goulas & Kontominas, 2007; Mahmoud et al., 2006; Serdaroğlu & Felekoğlu, 2005; Sánchez-Alonso & Borderías, 2008; Tironi et al., 2010).

In addition to their antioxidant effect, the antibacterial activity of essential oils has been described in various foods (Burt, 2004). An important characteristic of EOs and their components is their hydrophobicity, which enables them to partition in the lipids of the bacterial cell membranes and mitochondria, disturbing the structures and rendering them more permeable (Sikkema, De Bont, & Poolman, 1994). Afterwards, the leakage of ions and other cell contents can occur (Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001). Although a certain amount of leakage from bacterial cells may be tolerated without loss of viability, extensive loss of cell contents or the exit of critical molecules and ions will lead to death (Denyer & Hugo, 1991).

In the present study, the addition of thyme essential oils in the diet of gilthead seabream resulted in lower aerobic microorganism counts for the thymol group and lower coliform counts for the carvacrol and thymol groups. According to Rota, Herrera, Martínez, Sotomayor, and Jordán (2008), most of the antimicrobial activity of essential oils from the *Thymus* genus seems to be related to the phenolic compounds thymol and carvacrol. In our study, the essential oils used were taken from two species of thyme, *T. capitata* and *T. zygis*, whose primary active compounds are carvacrol and thymol, respectively. Specifically, the antibacterial effect of the essential oil of *T. zygis* (thymol chemotype) has been demonstrated both *in vitro* (Rota et al., 2008) and in meat from ewes fed diets substituting 3.7% (0.54% essential oil) and 7.5% (1.08% essential oil) of basal diet by the leaves of this plant (Nieto et al., 2010b).

In the case of fish kept aerobically in cold storage, the main group of microorganisms responsible for deterioration are Gram-negative psychrotrophic bacteria (Gram & Huss, 1996). Carvacrol and thymol are capable of disintegrating the outer membrane of Gram-negative bacteria, releasing lipopolysaccharides and increasing the permeability of the cytoplasmic membrane to ATP (Lambert et al., 2001). Harpaz et al. (2003) observed that the use of essential oils of both thyme and oregano added at 0.05% (vol vol⁻¹) as preservatives during the storage of whole animals clearly inhibited aerobic bacterial growth on both the skin and the flesh. Other authors have described a similar effect on fillets stored with thymol under similar conditions (Kostaki et al., 2009), and for those stored with a combination of thymol and carvacrol (Mahmoud et al., 2006). However, it should be noted that these authors introduced the essential oils in the samples by means of exogenous treatments, adding them during packaging.

Microbial spoilage of foods may manifest itself as changes in the sensory characteristics as production of off-odours and off-flavours, slime formation, visible growth colonies and discolouration (Gram & Huss, 1996). Kilinc et al. (2007) observed that the main negative aspect with respect to the loss of quality in gilthead seabream and sea bass corresponds to the appearance of the eyes and gills. If we also consider that these attributes are the very ones most used by the consumer to evaluate the freshness of fish, we can consider them to be good indicators of the deterioration of gilthead seabream during storage on ice. It was specifically the eye shape in the present study that was the only attribute for which significant differences were observed according to diet, with the BHT and thymol groups demonstrating less deterioration at the end of the storage period ($p < 0.001$).

The final Quality Index obtained from the sum of the average scores for each attribute, reflected significant differences over time in storage for all groups ($p < 0.001$). This index also demonstrated differences among the different groups at the end of the storage period, with lower values ($p < 0.05$) of 42.0 and 43.0 for the BHT and thymol diets, respectively, as compared to values above 47.0

Table 9
Regression analyses used to determine the shelf-life of gilthead seabream of each diet.

Diet	Coefficient a	Coefficient b	R ²	p	Chow test
Control	13.4244 ***	1.6965 ***	0.9665	<0.001	
BHT	13.2922 ***	1.5016 ***	0.9445	<0.001	*
Rosemary	12.9580 ***	1.6754 ***	0.9691	<0.001	ns
Carvacrol	13.2897 ***	1.6635 ***	0.9781	<0.001	ns
Thymol	13.4688 ***	1.4987 ***	0.9403	<0.001	*

$Y = a + bX$. Y, Quality index. X, storage time.

ns, not significant.

* $p < 0.05$.

*** $p < 0.001$.

for the rest of the groups. Harpaz et al. (2003) failed to observe any differences between the control group and the two groups of animals preserved with essential oils of thyme and oregano until after 12 days in storage, after which point the control group demonstrated a faster deterioration of all attributes than the rest of the groups. However, it should be noted that these authors use essential oils as preservatives added to the polyethylene bags used to package the samples. Similar results were found by Goulas and Kontomina (2007) for fillets preserved with 0.4% ($v w^{-1}$) and 0.8% ($v w^{-1}$) of essential oil of oregano. Altieri et al. (2005), however, observed no differences in the overall appearance of fillets receiving different treatments, in spite of reporting less deterioration in the odour of fillets preserved with a thymol concentration of 400 ppm.

The sensory evaluation of fish using a demerit score system makes it possible to establish a linear relationship between the Quality Index and time in storage. In a previous work concerning the shelf-life of gilthead seabream specimens subjected to different fasting periods (Álvarez et al., 2008), based on the correlation of the results obtained from the sensory and microbiological analyses, it was possible to calculate the shelf-life according to current regulations for mesophilic aerobic counts in fish ($7 \log \text{cfu g}^{-1}$; ICMSF, 1986). Accordingly, the relationship between the quality index and storage time indicated an approximate quality index score of 38 at the end of the shelf-life, based on the microbiological count for seabream stored under the same conditions. We can use this value to establish the fish shelf-life in sensory terms in the present work. According to the linear regression equations obtained for the different dietary groups (Table 9), this Quality Index value would be reached on day 14 for the control group, day 15 for the rosemary and carvacrol groups and day 16 for the BHT and thymol groups. However, on day 14 of storage, the mesophilic counts had already reached values very near or above the established limit (ICMSF, 1986). This is in line with the findings of Kilinc et al. (2007), who found that gilthead seabream stored on ice, which reached the threshold value for mesophiles on day 13 of storage, were still acceptable in terms of the sensory analysis. Other authors, however, have obtained the same results from both the sensory and microbiological analyses (Cakli et al., 2007; Tejada & Huidobro, 2002).

5. Conclusion

In spite of the fact that no intense lipid oxidation occurred in any of the experimental groups, lower indices of oxidation were observed in animals administered feeds supplemented with carvacrol and BHT, and to a lesser extent, rosemary. While no antioxidant effect was seen in the animals fed feeds with thymol, the antibacterial effect was greater than that observed for the rest of the groups. The sensory shelf-life of gilthead seabream stored on ice was extended by 2 days for animals that had been fed diets

supplemented with BHT and thymol, and one day for those supplemented with rosemary and carvacrol, as compared to the diet with no additives.

In our study, the amount of BHT added to the feed was that normally used in commercial feeds in order to protect them from oxidation during storage. We know that compounds added to the feed may accumulate to varying extents in the flesh of the fish. Accordingly, the addition of natural antioxidants to the diet may have an added effect on fish quality, delaying *post mortem* deterioration. Given the antioxidant effect of the essential oil of *T. capitata* (carvacrol chemotype) and the antibacterial effect of the essential oil of *T. zygis* (thymol chemotype), the inclusion of a mixture of both in the feed may have a combined effect on fish preservation. However, in order to achieve a greater effect, similar to that obtained by means of exogenous treatments, additional studies are needed to determine the optimal concentration of the products used to supplement the diets tested in the present study.

Acknowledgements

This research was supported by Grants from the project (RTA2009-00145) of the "Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). The study was also partially sponsored by the IMIDA grant programme. The authors wish to thank the companies Nutrafur-Furfural S.A. (Murcia, Spain) and Blas Lorente González S.L. (Murcia, Spain) for donating the rosemary extract and the essential oils, respectively.

References

- Akhtar, P., Gray, J. I., Booren, A. M., & Garling, D. L. (1998). Effect of dietary components and surface application of oleoresin rosemary on lipid stability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle during refrigerated and frozen storage. *Journal of Food Lipids*, 5, 43–58.
- Altieri, C., Speranza, M. A., Nobile, Del., & Sinigaglia, M. (2005). Suitability of bifidobacteria and thymol as biopreservatives in extending the shelf life of fresh packed plaice fillets. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1294–1302.
- Álvarez, A., García-García, B., Garrido, M. D., & Hernández, M. D. (2008). The influence of starvation time prior to slaughter on the quality of commercial-sized gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture*, 284, 106–114.
- Alçiçek, Z. (2011). The effects of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil concentration on liquid-smoked vacuum-packed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) fillets during chilled storage. *Food Chemistry*, 128(3), 683–688.
- Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J. A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551–562.
- AOAC (1997). Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- Attouchi, M., & Sadok, S. (2010). The effect of powdered thyme sprinkling on quality changes of wild and farmed gilthead sea bream fillets stored in ice. *Food Chemistry*, 119, 1527–1534.
- Barlow, S. M. (1990). Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. In B. J. F. Hudson (Ed.), *Food antioxidants* (pp. 253–307). London: Elsevier.
- Botsoglou, N. A., Christaki, E., Fletouris, D. J., Florou-Paneri, P., & Spais, A. B. (2002). The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. *Meat Science*, 62, 259–265.
- Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J., Papageorgiou, G. E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A. J., & Trakatellis, A. G. (1994). Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1931–1937.
- Botsoglou, N. A., Grigoropoulou, S. H., Botsoglou, E., Govaris, A., & Papageorgiou, G. (2003). The effects of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. *Meat Science*, 65, 1193–1200.
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
- Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., Dincer, T., & Tolasa, S. (2007). Quality differences of whole gutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control*, 18, 391–397.
- Chow, G. C. (1960). Tests of equality between sets of coefficients in two linear regressions. *Econometrica*, 28(3), 591–605.
- Connell, J. J. (1995). *Control of fish quality* (4th ed.). London: Fishing News Books Limited.
- Denyer, S. P., & Hugo, W. B. (1991). Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In S. P. Denyer & W. B. Hugo (Eds.), *Mechanisms of*

- action of chemical biocides. *The Society for Applied Bacteriology, Technical Series No. 27* (pp. 171–188). Oxford: Oxford Blackwell Scientific Publication.
- Descalzo, A. M., & Sancho, A. M. (2008). A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. *Meat Science*, 79(3), 423–436.
- EEC (1996). Laying Down Common Marketing Standards for Certain Fishery Products. Council Regulation (EC) No 2406/96 of 26 November 1996 Official Journal of European Communities, L 334, pp. 1–15.
- Fernández, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Fernández-López, J. A. (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, 59, 345–353.
- Frankel, E. N. (1998). *Lipid oxidation*. Dundee, Scotland: The Oily Press Ltd.
- Fraser, O., & Sumar, S. (1998). Compositional changes and spoilage in fish-an introduction. *Nutrition and Food Science*, 5, 275–279.
- González Cortés, M. A., Penedo, J. C., Millán, R., Sanjuán, E., & Estupiñán, S. (2000). Cambios en la vida útil de la dorada acucultivada en Canarias (*Sparus aurata*) conservada en hielo. *Alimentaria marzo*, 61, 64.
- Goulas, A. E., & Kontomina, M. G. (2007). Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, 100, 287–296.
- Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 121–137.
- Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V., & Gelman, A. (2003). Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *Journal of Food Protection*, 66, 410–417.
- Huidobro, A., Pastor, A., & Tejada, M. (2000). Quality Index Method developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Food Science*, 65, 1202–1205.
- Huss, H. H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. FAO Fisheries Technical Paper, vol. 348. FAO, Rome.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1986). Sampling plans for fish and shellfish. In: *ICMSF, Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications* (2nd ed., Vol. 2.), University of Toronto Press, Toronto, Canada, pp. 181–196.
- Kerry, J. P., Buckley, D. J., Morrissey, P. A., O'Sullivan, K., & Lynch, P. B. (1999). Endogenous and exogenous α -tocopherol supplementation: Effects on lipid stability (TBARS) and warmed-over flavour (WOF) in porcine M Longissimus dorsi roasts held in aerobic and vacuum packs. *Food Research International*, 31(3), 211–216.
- Kilinc, B., Cakli, S., Cadun, A., Dincer, T., & Tolasa, S. (2007). Comparación effects of slurry ice and flake ice pretreatments on the quality of aquacultured sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored at 4°C. *Food Chemistry*, 104, 1611–1617.
- Kim, R., & Labella, F. (1987). Comparison of analytical methods for monitoring autooxidation profiles of authentic lipids. *Journal of Lipid Research*, 28, 1110–1117.
- Kostaki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, N. I., & Kontomina, M. G. (2009). Combined effect of MAF and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) filets. *Food Microbiology*, 26, 475–482.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P., & Nychas, G.-J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453–462.
- Lauridsen, C., Buckley, D. J., & Morrissey, P. A. (1997). Influence of dietary fat and vitamin E supplementation on α -tocopherol levels and fatty acid profiles in chicken muscle membrane fractions and on susceptibility to lipid peroxidation. *Meat Science*, 46, 9–22.
- Luna, L. (2007). *El mercado de la dorada y la lubina en la UE en el periodo 2006–2009*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: Madrid, Spain.
- Mahmoud, B. S. M., Yamazaki, K., Miyashita, K., Shin, I. I., & Suzuki, T. (2006). A new technology for fish preservation by combined treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds. *Food Chemistry*, 99, 656–662.
- National Research Council (1993). *Nutrient Requirements of Fish*. Washington and Oxford: National Academy Press.
- Nieto, G., Díaz, P., Bañón, S., & Garrido, M. D. (2010a). Dietary administration of ewe diets with a distillate from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.): Influence on lamb meat quality. *Meat Science*, 84, 23–29.
- Nieto, G., Díaz, P., Bañón, S., & Garrido, M. D. (2010b). Effect on lamb meat quality of including thyme (*Thymus zygis* ssp. *Gracilis*) leaves in ewes' diet. *Meat Science*, 85, 82–88.
- O'Grady, M. N., Maher, M., Troy, D. J., Moloney, A. P., & Kerry, J. P. (2006). An assessment of dietary supplementation with tea catechins and rosemary extract on the quality of fresh beef. *Meat Science*, 73, 132–143.
- Ortiz, J., Larraín, A., Vivanco, J. P., & Aubourg, S. P. (2009). Rancidity development during the frozen storage of farmed coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): Effect of antioxidant composition supplied in the diet. *Food Chemistry*, 115, 143–148.
- Pavlidis, M., Papandroulakis, N., & Divanach, P. (2006). A method for the comparison of chromaticity parameters in fish skin: Preliminary results for colouration pattern of red skin Sparidae. *Aquaculture*, 258, 211–219.
- Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19, 681–687.
- Ruff, N., Fitzgerald, R. D., Cross, T. F., Hamre, K., & Kerry, J. P. (2003). The effect of dietary vitamin E and C level on market-size turbot (*Scophthalmus maximus*) fillet quality. *Aquaculture Nutrition*, 9, 91–103.
- Ruff, N., Fitzgerald, R. D., Cross, T. F., Teurtrie, G., & Kerry, J. P. (2002). Slaughtering method and dietary α -tocopherol acetate supplementation affect rigor mortis and fillet shelf-life of turbot *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture Research*, 33, 703–714.
- Sánchez-Alonso, I., & Borderías, A. J. (2008). Technological effect of red grade antioxidant dietary fibre added to minced fish muscle. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(6), 1009–1018.
- Scalfe, J. R., Onibi, G. E., Murray, I., Fletcher, T. C., & Houlihan, D. F. (2000). Influence of α -tocopherol acetate on the short- and long-term storage properties of filets from Atlantic salmon *Salmo salar* fed a high lipid diet. *Aquaculture Nutrition*, 6, 65–71.
- Serdaroğlu, M., & Felekoğlu, E. (2005). Effects of using rosemary extract and onion juice on oxidative stability of sardine (*Sardina pilchardus*) mince. *Journal of Food Quality*, 28, 109–120.
- Sikkema, J., De Bont, J. A. M., & Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(11), 8022–8028.
- Simitzis, P. E., Deligeorgis, S. G., Bizelis, J. A., Dardamani, A., Theodosiou, I., & Fegeros, K. (2008). Effect of dietary oregano oil supplementation on lamb meat characteristics. *Meat Science*, 79, 217–223.
- Simitzis, P. E., Symeon, G. K., Charismiadou, M. A., Bizelis, J. A., & Deligeorgis, S. G. (2010). The effects of dietary oregano oil supplementation on pig meat characteristics. *Meat Science*, 84, 670–676.
- Tejada, M., & Huidobro, A. (2002). Quality of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage related to the slaughter method and gutting. *European Food Research and Technology*, 215, 1–7.
- Tironi, V. A., Tomás, M. C., & Añón, M. C. (2010). Quality loss during the frozen storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. *IWT – Food Science and Technology*, 43, 263–272.
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5165–5170.

DISCUSIÓN

5.1. Calidad del pescado

5.1.1. Calidad nutricional

La calidad nutricional de los alimentos está relacionada con su contenido de nutrientes y su biodisponibilidad (Lie, 2001). La influencia de la dieta en la salud humana ha incrementado el interés de la población por el consumo de alimentos saludables y por la calidad nutricional de éstos. El pescado es una excelente fuente de proteínas y lípidos, y ha recibido especial atención por su contenido de HUFA *n*-3. Numerosos estudios demuestran la relación entre el perfil de ácidos grasos de la dieta del pez y la composición de ácidos grasos del pescado (Waagbø y col., 1993; Brodtkorb y col., 1997; Dosanjh y col., 1998; Bjerkeng y col., 1999; Bell y col., 2001, 2002; Regost y col., 2004; Torstensen y col., 2004a,b). En el caso del pescado de crianza el perfil de ácidos grasos del músculo debe ser por tanto controlado mediante la formulación de los piensos.

En los últimos años, la disminución de la disponibilidad mundial de aceites y harinas de pescado para la fabricación de los piensos de acuicultura ha obligado al sector a la búsqueda de fuentes alternativas. Según los resultados aportados para dorada, es posible sustituir hasta un 69% del aceite de pescado por aceites vegetales como los aceites de soja y colza sin que afecte al crecimiento o al índice de conversión (Fountoulaki y col., 2009). En el presente estudio, con un porcentaje de sustitución del 75% tampoco se observó un efecto sobre estos parámetros. Sin embargo, la sustitución del aceite de pescado por aceites vegetales modifica la composición de ácidos grasos del pescado, comprometiendo las propiedades saludables asociadas con su consumo.

De estos cambios, el mayor contenido de linoléico debe ser considerado uno de los más negativos, debido a que éste es responsable de las modificaciones más perjudiciales de la composición de ácidos grasos del músculo de los peces de cultivo (Turchini y col., 2009). Como se observa en la Tabla 1, según los resultados del presente estudio y los aportados por diversos autores, los ácidos grasos EPA y DHA disminuyen considerablemente en el músculo de pescados alimentados con dietas elaboradas con aceites vegetales como fuente de lípidos. Ahora bien, el incremento del linoléico es aún mayor que la diferencia en los HUFA *n*-3, sobretodo cuando se utiliza aceite de soja como única fuente vegetal de lípidos.

Tabla 1: Porcentaje de los PUFA de cadena larga de la serie *n*-3 característicos del pescado (EPA y DHA) y del ácido graso linoléico (LA), característico de aceites vegetales.

	Dieta	EPA	DHA	LA
Presente tesis	FO	14,2	8,39	9,79
Dorada, 19 semanas de alimentación (VO: 50RO/50SO)	75VO	9,55	5,87	19,04
	FO	5,8	14,8	2,5
Bell y col. (2001)	10RO	4,2	11,6	4,8
Salmón Atlántico, 17 semanas de alimentación	25RO	4,6	11,6	6,2
	50RO	4,3	11,2	8,1
	100RO	2,8	7,2	12,3
	FO	5,7	16,3	3,4
Bell y col. (2002)	25PO	4,9	15,1	4,9
Salmón Atlántico, 30 semanas de alimentación	50PO	4,2	14,6	6,0
	100PO	1,9	7,7	10,6
	FO	11,02	12,96	6,15
Izquierdo y col. (2003)	60SO	6,07	7,91	24,21
Dorada, 101 días de alimentación	60RO	5,62	7,44	14,96
	60LO	6,03	8,22	11,96
	60Mix	5,70	7,39	13,09
	FO	10,61	11,41	4,73
Izquierdo y col. (2003)	60SO	7,37	7,33	16,91
Lubina, 89 días de alimentación	60RO	6,60	7,93	12,05
	60LO	5,62	5,84	9,98
	60Mix	5,94	6,52	10,64
	FO	9,07	7,31	5,53
Izquierdo y col. (2005)	60SO	4,07	4,99	23,68
Dorada, 204 días de alimentación	60RO	3,57	4,92	12,90
	60LO	3,48	4,60	10,36
	80SO	2,44	3,88	28,31
	80LO	2,31	4,00	12,21
	FO	9,2	14,1	4,6
Montero y col. (2005)	60SO	4,9	9,4	18,9
Lubina, 240 días de alimentación	60RO	4,8	8,8	9,1
	60LO	4,2	7,7	7,5
	80LO	4,0	8,1	9,8
	FO	3,8	12,4	3,4
Torstensen y col. (2005)	75VO	4,6	12,3	5,7
Salmón Atlántico, 12 meses de alimentación (VO: 3,7RO:2PO:1LO)	100VO	2,1	10,0	10,9
	FO	15,1	32,6	3,6
Mørkøre y col. (2007)	100SO	13,9	31,2	7,9
	FO	9,90	11,83	9,70
Fountoulaki y col. (2009)	69SO	4,03	6,45	30,56
Dorada, 170 días de alimentación	69PO	3,91	7,02	15,96
	69RO	3,10	5,83	18,47
	FO	8,84	5,16	8,95
Benedito-Palos y col. (2009)	33VO	5,25	3,58	11,96
Dorada, 14 meses de alimentación (VO: 17RO:58LO:25PO)	66VO	2,98	2,29	14,34

FO: aceite de pescado; VO: aceite vegetal; SO: aceite de soja; RO: aceite de colza; LO: aceite de linaza; PO: aceite de palma.

Los ácidos grasos EPA y DHA tienen una función nutritiva importante en la dieta, ya que son esenciales para el ser humano. Debido a su carácter antitrombogénico y antiinflamatorio, el consumo de pescado ha sido muy recomendado para la prevención de enfermedades crónicas de origen cardiovascular. También se ha sugerido un efecto positivo en la diabetes, cáncer y enfermedades degenerativas relacionadas con la edad (Simopoulos, 2005; Kris-Etherton y col., 2009). Además, el DHA es de especial relevancia en el desarrollo del cerebro. Se encuentra en grandes cantidades en la materia gris del cerebro y en las membranas de la retina, y se acumula en estos tejidos durante la vida fetal y en los primeros dos años después de nacer (Simopoulos, 2005).

Por todo esto, se han hecho diversas recomendaciones sobre las cantidades de estos ácidos grasos que deben ingerirse en la dieta (Kris-Etherton y col., 2009). En el presente estudio se realizó una estimación de la cantidad de pescado necesario de cada uno de los grupos experimentales alimentados con dietas con distintas fuentes de lípidos, para cubrir las recomendaciones propuestas por “Internacional Society for the Study of Fatty Acids and Lipids” (ISSFAL, 1999) (Tabla 2). Según estos resultados, con un porcentaje de sustitución del 75% sería necesario ingerir aproximadamente el doble de dorada cultivada en estas condiciones para cubrir el aporte recomendado en la dieta de EPA y DHA. Sin embargo, el mayor consumo de pescado alimentado con aceites vegetales supondría, no sólo una mayor ingesta de ácidos grasos HUFA *n*-3, sino también de PUFA *n*-6.

Tabla 2: Estimación de la cantidad de pescado necesario para cubrir las recomendaciones dietéticas de la ingesta de ácidos grasos realizadas por la “Internacional Society for the Study of Fatty Acids and Lipids” (ISSFAL, 1999).

Recomendaciones de ingesta adecuada			Dieta FO	Dieta VO
		g/día	g/semana	g/semana
DHA+EPA	Adultos	0,65	843,2 (3)	1430,4 (6)
	Salud cardiovascular	0,50 ^a	648,6 (2,5)	1100,3 (4)
DHA	Adultos	0,22 ^a	628,9 (2,5)	1050,1 (4)
	Embarazadas y lactantes	0,30 ^a	857,6 (3,5)	1432,0 (6)
EPA	Adultos	0,22 ^a	522,5 (2)	898,2 (3,5)

^a Recomendación de la ingesta mínima.
Entre paréntesis aparecen las raciones de pescado teniendo en cuenta que una ración corresponde con aproximadamente 250 g de filete.

Hace unos años, algunos autores indicaron que un modesto incremento de la ingesta de ácidos grasos *n*-6, junto con una disminución parcial de los SFA de la dieta, podía ser beneficioso frente a la prevención de ateromas (Renaud y col., 1986; Ulbricht y Wheelock, 1989).

Posteriormente, Ulbricht y Southgate (1991) describieron los índices aterogénico (IA) y trombogénico (IT) como indicadores de la calidad nutricional de las grasas de los alimentos, siendo los productos con valores bajos los más recomendados para la prevención de enfermedades cardiovasculares. Estos autores apuntaban que altos contenidos de ácido linoléico (18:2 n -6) y linolénico (18:3 n -3) en la carne tienen un efecto antiaterogénico y antitrombogénico, respectivamente.

En la Tabla 3 se muestran los IA y IT de distintos alimentos. Como se puede observar, el IA de la carne de animales terrestres es muy variable según el producto, siendo los más magros los menos aterogénicos. Los IAs del pescado, en general, son similares a aquellos productos cárnicos con menor contenido de grasa, excepto en el caso de la sardina que presenta un IA muy próximo a los valores observados en carne de cordero. Según nuestros resultados, y de acuerdo con los datos aportados por otros autores, dado el alto contenido de los aceites vegetales en ácidos grasos n -6, la inclusión de estos aceites en las dietas de peces de cultivo aportaría un pescado con IAs inferiores, y similares a productos como la pechuga de pavo o de pollo y la pierna de cerdo. Con respecto a los procesos trombogénicos, el papel de los PUFA de la serie n -3, y en concreto el EPA y el DHA, tienen especial relevancia en su prevención. Como se muestra en la Tabla 3, aunque existen algunas diferencias entre especies, en general, los ITs del pescado son inferiores a los observados en productos cárnicos. El uso de aceites vegetales como fuente de lípidos no tiene un efecto sobre la capacidad trombogénica del pescado, a excepción del aceite de linaza, que por su alto contenido en linolénico da lugar a pescados con índices inferiores.

A pesar de las propiedades antiaterogénicas de los ácidos grasos n -6, un exceso en la dieta puede provocar serios problemas de salud. Según diversos estudios las dietas de nuestros ancestros primitivos contenían cantidades similares de n -6 y n -3 (ratio de 1-2/1), pero debido a un mayor consumo de alimentos con un alto contenido de ácidos grasos n -6, esta ratio ha ido incrementando hasta niveles de 15-16,7/1 en los países occidentales (Simopoulos, 2006). Altos ratios de n -6/ n -3 promueve la aparición de patologías como enfermedades cardiovasculares, cáncer, osteoporosis y enfermedades de tipo inflamatorio y autoinmunes. En concreto una ingesta elevada de linolénico conduce a la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), a la agregación plaquetaria e interferencias en la incorporación de los ácidos grasos esenciales en los fosfolípidos de las membranas celulares (Simopoulos, 2006). Frente a esta situación, nutricionistas de todo el mundo han recomendado la ingesta de productos marinos por su alto contenido en PUFA n -3, que contribuya a disminuir el ratio n -6/ n -3. Pero la producción de un pescado con un alto contenido en ácido linoléico contribuiría al desajuste n -6/ n -3 en la dieta.

Tabla 3: Índices aterogénico (IA) y trombogénico (IT) de diversos productos cárnicos y de distintas especies de pescado alimentado con distintas fuentes de lípidos.

Alimento	IA	IT	Referencia
Rosbif de cordero magro y graso	1,00	1,58	Ulbricht y Southgate (1991)
Paletilla de cerdo magra	0,60	1,37	
Pierna de ternera magra	0,72	1,06	
Chuleta de cordero	1,00	1,33	Pérez-Llamas y col. (1998)
Pierna de ternera	0,72	1,69	
Pechuga de pavo	0,48	1,12	
Pierna de cerdo	0,36	1,09	
Conejo	0,57	0,81	
Pechuga de pollo	0,47	0,93	
Sardina	0,90	0,48	
Merluza	0,61	0,43	
Atún	0,52	0,49	
Conejo	0,57	0,66	Dal Bosco y col. (2004)
Lubina	100% aceite de pescado	0,63	Mourente y col. (2005)*
	60% aceite de colza	0,35	
	60% aceite de linaza	0,32	
	60% aceite de oliva	0,44	
Lubina	100% aceite de pescado	0,62	Montero y col. (2005)*
	60% aceite de soja	0,43	
	60% aceite de colza	0,44	
	60% aceite de linaza	0,53	
	80% aceite de linaza	0,35	
Dorada	100% aceite de pescado	0,64	Izquierdo y col. (2005)*
	60% aceite de soja	0,42	
	60% aceite de colza	0,39	
	60% aceite de linaza	0,40	
	80% aceite de soja	0,34	
	80% aceite de linaza	0,34	
Dorada	100% aceite de pescado	0,66	Presente tesis
	75% aceite vegetal	0,46	

* Cálculos realizados por Grigorakis (2007) a partir de los datos aportados por estos autores del perfil de ácidos grasos del músculo de dorada y lubina.

5.1.2. Calidad sensorial

Además de la calidad nutricional, la dieta de los peces tiene un impacto importante sobre diversos parámetros que influyen directamente en la percepción de la calidad del pescado, como son el color, la apariencia, el olor, el sabor y la textura (Lie, 2001). La sustitución de aceite de pescado por aceites vegetales puede modificar algunos parámetros de calidad (Izquierdo y col., 2003; Regost y col., 2003; Regost y col., 2004; Izquierdo y col., 2005; Montero y col., 2005; Røra y col., 2005; Mørkøre y col., 2007).

Desde hace ya tiempo se sabe que el contenido de lípidos y su distribución en el pez son factores que influyen sobre las propiedades texturales del pescado (Mohr, 1987). Las principales técnicas instrumentales utilizadas para medir la textura del pescado (punción, compresión, cizallamiento y tracción) evalúan la fuerza, deformación, pendiente y área bajo la curva de fuerza/deformación. Aunque la fuerza es el índice de calidad textural más comúnmente usado, el resto de variables son también indicativas de la dureza de las muestras (Barroso y col., 1998). Algunos autores atribuyen una mayor resistencia a la compresión, y por tanto mayores valores de los parámetros texturales, a un menor contenido de grasa en el músculo (Fauconneau y col., 1995; Andersen y col., 1997; Orban y col., 1997). En el presente estudio, los valores más altos de los parámetros texturales de dureza, gomosidad, masticabilidad, y elasticidad de los filetes del grupo de animales alimentado con la dieta con aceites vegetales (Dieta VO) se asociaron al menor contenido de grasa en el músculo de estos animales. Teniendo en cuenta que tanto la dieta con aceite de pescado como única fuente de lípidos (Dieta FO) como la que contenía aceites vegetales se formularon con el mismo porcentaje de grasa, siendo la única diferencia la fuente de lípidos, la distinta composición de ácidos grasos de la dieta pudo influir en el metabolismo y distribución de los lípidos en los tejidos y órganos de pez.

Otro de los parámetros de calidad de gran importancia en pescado es el color. Los sistemas desarrollados para la especificación de los colores en un espacio tridimensional (Hunter y Harold, 1987; Foley y col., 2000) son una herramienta útil para determinar y cuantificar el color del pescado, tanto de la piel como del músculo. Según este sistema el atributo luminosidad o valor L^* permite distinguir entre colores claros y oscuros. Los valores de L^* observados en el presente estudio (37-39) son acordes al color de un músculo blanco. El Chroma (C_{ab}^*), que se estima a partir de los parámetros cromáticos a^* y b^* , es una medida de cómo la luz gris o blanca, según el valor de L^* , se mezcla con los tonos de color. Según nuestros resultados, aunque no se observaron diferencias significativas en los parámetros a^* y b^* , el músculo de los animales alimentados con la dieta FO presentó menor cromaticidad (menor valor de C_{ab}^*), debido a una mayor proximidad de a^* y b^* a la zona central del diagrama (Figura 1). Estas doradas eran por tanto más blancas que las alimentadas con la dieta con aceite vegetal. Este efecto, como sugieren Grigorakis y col. (2003), podría ser debido a que el mayor contenido de grasa contribuye a la blancura del músculo.

Por otro lado, dado que los pigmentos se encuentran inmersos en las membranas lipídicas interaccionando con los lípidos de membrana (Gruszecki y Strzayka, 2005), las variaciones del perfil de ácidos grasos con el uso de distintas fuentes de lípidos en la dieta, podría provocar cambios en la interacción de estos pigmentos con los lípidos de membrana. Estos cambios podrían ser debidos a modificaciones bien en el tipo de pigmentos presente en la membrana, o bien en su espectro de absorción. El espectro de absorción de los carotenoides depende del

medio en el que se encuentren y en condiciones *in vivo* se ve afectado por la interacción con los lípidos y proteínas (Britton, 1995 a, b).

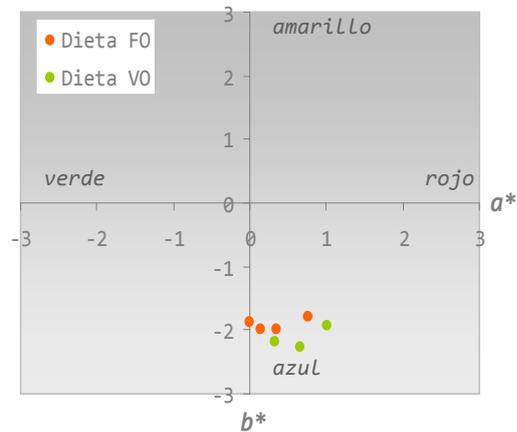


Figura 1: Representación gráfica de las coordenadas CIELab que definen la cromaticidad del músculo de las doradas alimentadas con dietas suplementadas con distintas fuentes de lípidos. Dieta FO: 0% aceite vegetal; Dieta VO: 75% aceites vegetales.

Frente a los resultados observados en cuanto al efecto de la fuente de lípidos en los atributos de textura y color, es importante plantearse si la inclusión de estos aceites en la dieta de peces puede afectar a las propiedades sensoriales del pescado hasta el punto de comprometer las preferencias del consumidor. La textura de la carne del pescado es un atributo que puede determinar en gran medida la aceptabilidad del producto, pero hay que considerar también otras características sensoriales como el olor, el sabor, y la apariencia. Estudios de preferencia con consumidores son utilizados habitualmente para estudiar la aceptación de nuevos productos alimentarios. Pero, normalmente al consumidor le resulta difícil explicar con detalle porqué prefiere un producto u otro, de manera que los resultados pueden ser difíciles de interpretar. Sin embargo, el análisis sensorial descriptivo realizado por un panel de catadores entrenado aporta una descripción exacta y detallada de las propiedades sensoriales de los productos bajo estudio (Sveinsdottir y col., 2009). Teniendo en cuenta el objetivo del sector acuícola de obtener un pescado competitivo con respecto al de pesca extractiva y el interés creciente por la elaboración de nuevos productos, la evaluación sensorial de un panel de catadores supone una herramienta avanzada y precisa a la hora de caracterizar un nuevo producto.

En la Figura 2 se muestra el perfil descriptivo de cada uno de los grupos experimentales que fueron alimentados con las dietas con distintas fuentes de lípidos. Según estos resultados, se observaron algunas diferencias sensoriales entre ambos productos en atributos relativos al olor

y sabor, y al carácter graso, aunque éstas no fueron significativas. La mayor intensidad de los atributos “sabor aceitoso” y “carácter graso” de las muestras de los animales que habían sido alimentados con la dieta con aceite de pescado como única fuente de lípidos fueron el reflejo de la mayor cantidad de grasa en el músculo de este grupo. Algunos autores describen además una correlación del contenido de grasa con la jugosidad (Einen y Thomassen, 1998; Grigorakis y col., 2003). Sin embargo, en el presente estudio, no se observaron diferencias en la jugosidad entre ambos grupos experimentales.

También se detectaron pequeñas diferencias en el olor propio y en atributos relacionados con el sabor (sabor propio y marino, y persistencia del sabor en la boca), que fueron percibidos con menor intensidad en las muestras de la dieta con aceite vegetal. Similares resultados han sido observados por otros autores con el uso de aceites vegetales como fuente de lípidos de la dieta de salmón (Torstensen y col., 2005) y de rodaballo (Regost y col., 2003). El aroma del pescado fresco es debido a aldehídos y alcoholes volátiles derivados principalmente de deterioro oxidativo de los PUFA *n*-3 y *n*-6 (Kawai, 1996; Durnford y Shahidi, 1998; Prost y col., 1998; Grigorakis y col., 2003a; Turchini y col., 2004).

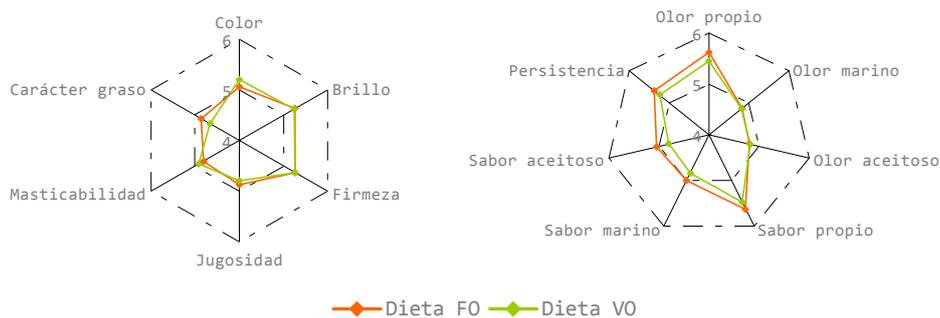


Figura 2: Perfil descriptivo de cada uno de los grupos experimentales que fueron alimentados con las dietas con distintas fuentes de lípidos. Dieta FO: 0% aceite vegetal; Dieta VO: 75% aceites vegetales.

Turchini y col. (2007) observaron elevadas correlaciones entre la valoración sensorial de olores y los aldehídos volátiles formados por autooxidación de los ácidos grasos. De forma que, el contenido de los aldehídos volátiles formados por autooxidación de PUFA *n*-3 eran mayores en los peces alimentados con dietas con altos porcentajes de aceite de linaza, que es rico en

PUFA *n*-3, y los derivados de los PUFA *n*-6 estaban en mayores cantidades en los peces de las dietas con altos porcentajes de aceite de soja, que es rico en PUFA *n*-6. Los olores de los aldehídos derivados de los PUFA *n*-3 como el 2-pentanal, el 2-hexanal y el 2,6-nonadienal son normalmente más agradables y se asocian con el pepino, la manzana, el champiñón, y la hierba, y el 2,4-heptadienal se asocia con el pepino, pero también con olores aceitosos y grasos. Los olores de los aldehídos derivados de los PUFA *n*-6, como el hexanal, el 2-octanal, 2-decanal y el 2,4-decadienal, son descritos como seboso, grasiento, herbáceo, aceitoso y asociados a aceite frito, aceite de bacalao y aceite oxidado (Kawai, 1996; Durnford y Shahidi, 1998; Prost y col., 1998; Belitz y Grosch, 1999; Sérot y col., 2001). Según nuestros resultados, no se observaron diferencias entre los olores marino y aceitoso, probablemente porque el porcentaje de sustitución del aceite de pescado fue del 75%, a diferencia de Turchini y col. (2007) cuyas dietas experimentales consistían en un reemplazo total del aceite de pescado por aceites vegetales. En el presente estudio, aunque algunos catadores percibieron ciertos olores y sabores relativos a aceites vegetales, éstos no fueron detectados con la intensidad suficiente como para ser descritos y consensuados por todo el panel.

En el presente estudio, se detectaron más diferencias en el sabor que en el olor. Diferencias de sabor entre pescados salvajes y de cultivo son atribuidas a las diferencias en el perfil de ácidos grasos, a los procesos de oxidación, a los ingredientes de las dietas, y al contenido de aminoácidos y minerales (Haard, 1992). Los ácidos grasos insaturados, además de tener un sabor más suave, son importantes precursores de los compuestos volátiles relacionados con el sabor del pescado (Grigorakis y col., 2003a). El ratio *n*-3/*n*-6 puede influir en el sabor del pescado, ya que los carbonilos derivados de los ácidos grasos *n*-3 poseen menores umbrales de sabor (Ashie y col., 1996). Generalmente, los alcoholes volátiles contribuyen a la percepción de sabores suaves, como por ejemplo, los que contienen 9 carbonos, que se han asociado a aromas a melón y pepino en pescados y mariscos. Según nuestros resultados, se percibió una mayor intensidad tanto de los sabores marino y aceitoso como del sabor propio en el pescado alimentado con la dieta con aceite de pescado.

Se han descrito ciertas modificaciones sensoriales con el uso de aceite de soja como: un incremento en dorada de la percepción en la boca de la adhesividad (Izquierdo y col., 2005); una reducción de la dureza del filete en la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) (Guillou y col., 1995) y en dorada (Izquierdo y col., 2005); mayor jugosidad en la dorada roja (*Pagrus auratus*) (Glencross y col., 2003); y olores y sabores no característicos del pescado en rodaballo (Regost y col., 2003), dorada (Izquierdo y col., 2005) y en tenca (*Tinca tinca*) (Turchini y col., 2007). En otros estudios sin embargo, no se han observado diferencias en ningún atributo sensorial (Bjerkeng y col., 1997; Montero y col., 2005). En el presente estudio, las diferencias observadas entre ambos grupos dietéticos no fueron percibidas de forma significativa por un panel de catadores, por lo que probablemente tampoco serían apreciadas por el consumidor.

5.2. Deterioro del pescado durante su almacenamiento en hielo

El estado de frescura del pescado puede ser descrito por una serie de propiedades definidas que pueden ser evaluadas por diversos indicadores (Bremner y Sakaguchi, 2000). Estas propiedades, y por lo tanto la frescura y calidad del producto final, dependen de diferentes factores biológicos y de procesamiento que influyen en el grado de los diversos cambios físico-químicos, bioquímicos y microbiológicos que ocurren *post mortem* en el pescado (Huss, 1995; Botta, 1995).

5.2.1. Cambios en las propiedades físico-químicas

El cambio más dramático en el pescado se produce por la instauración del *rigor mortis*. El desarrollo del *rigor mortis* y su evolución e involución en los procesos *post mortem* puede influir en las características de la carne (Nakayama y col., 1994). Por tanto, el periodo inmediatamente después del sacrificio del pez es crucial para la subsiguiente calidad del pescado (Børresen, 1992). El inicio y duración del *rigor mortis* varía según la especie, pero también es afectado por otros factores como las condiciones físicas del pez, la temperatura de almacenamiento, la manipulación antes del sacrificio y el método de sacrificio (Huss, 1995). En la Tabla 4 se muestra la evolución del *rigor* en dorada tras distintos métodos de sacrificio y aturdimiento.

5.2.1.1. pH

El *rigor mortis* está asociado con la acidificación del músculo, provocada por la producción de ácido láctico durante la fase *pre-mortem*. El estrés antes del sacrificio supone una mayor actividad física antes de la muerte que conduce al consumo de energía a expensas del ATP obtenido de las reservas de glucógeno. Este proceso persiste después de la muerte, con la consecuente acumulación de ácido láctico como producto de la glucólisis, que a su vez provoca una disminución del pH (Thomas y col., 1999; Poli y col., 2005). Diversos estudios muestran una relación entre el bajo pH y el inicio rápido del *rigor* en pescado (Bagni y col., 2007; Knowles y col., 2007; Wilkinson y col., 2008). En el caso de procedimientos no estresantes y métodos de sacrificio que conduzcan a la pérdida inmediata de la conciencia, el comienzo del *rigor* se produce por lo general de forma más gradual debido a la mayor cantidad de glucógeno residual *post mortem*.

Tabla 4: Evolución del *rigor mortis* en dorada con diversos grados de estrés pre-sacrificio, y distintos métodos de aturdimiento y sacrificio.

	Inicio del <i>rigor</i>	Máxima intensidad	Inicio de resolución	Final del <i>rigor</i>
Tejada y Huidobro (2002)				
Método de medida del <i>rigor mortis</i>: Curvatura de la cola (cm)*				
Sacrificio por inmersión en agua salada y hielo	5-6 h (1,5-2 cm)	20 h (4 cm)	25-35 h (1 cm)	50-60 h (0,5-0 cm)
Sacrificio por asfixia en aire	5-6 h (2 cm)	20 h (4 cm)	25-35 h (2 cm)	50-60 h (0,5-0 cm)
Sacrificio por inmersión en agua y hielo, previo aturdimiento por percusión	5-6 h (0,5-1,5cm)	20 h (5,5 cm)	25-35 h (2 -2,5 cm)	55-60 h (0,5-0 cm)
Sacrificio por inmersión en agua salada y hielo, pescado eviscerado	>10 h	25 h (3 cm)	30 h (1,5 cm)	55-60 h (0,5-0 cm)
Sacrificio por asfixia en aire, pescado eviscerado	>10 h	25 h (3 cm)	30 h (1,5 cm)	50-60 h (0,5-0 cm)
Sacrificio por inmersión en agua y hielo, previo aturdimiento por percusión, pescado eviscerado	>10 h	25 h (3 cm)	30 h (1,5 cm)	50-60 h (0,5-0 cm)
Bagni y col. (2007)				
Métodos de medida del <i>rigor mortis</i>: Índice <i>Rigor</i> (%)*				
Sacrificio por asfixia en aire a 8°C o en agua a 1,4°C	2 h (60%)	6 h (121%)	> 36 h	>48 h
Sacrificio por asfixia en aire a 8°C o en agua a 1,4°C; estrés previo por alta densidad de población en el tanque	2 h (119%)	6 h (121%)	> 24 h	>48 h
Matos y col. (2010)				
Método de medida del <i>rigor mortis</i>: Índice <i>Rigor</i> (%)*				
Sacrificio por inmersión en agua salada y hielo; aturdimiento previo con anestesia profunda	3-4 h (10-20%)	21 h (100%)	32-48 h (90-80%)	>72 h (84,4%)
Sacrificio por inmersión en agua salada y hielo; estrés previo por alta densidad de población en la jaula	1 h (50%)	2 h (79,2%)	3 h (78%)	>72 h (47,4%)
* Las medidas se refieren a la distancia entre la parte final de la cola y una superficie fija donde se apoya la mitad anterior del cuerpo del pez, dada en cm (Curvatura de la cola) y en tanto por ciento (Índice <i>Rigor</i> (%) = ((h0-h)/h0)*100; h0: distancia medida inmediatamente después de la muerte).				

El pH del pez vivo es cercano a 7, y después de la muerte éste puede variar de 6 a 7 dependiendo de la estación del año, de la especie y otros factores (Simeonidou y col., 1998). Diversos autores han aportado valores de pH en dorada de entre 7,2 y 6,4 que han disminuido hasta valores de 6,9-6,15 a las 5-6 h tras la muerte (Figura 3). Según nuestros resultados, el pH observado a las 24h tras el sacrificio en los animales que habían ayunado 24 y 48h mostraron valores similares a los observados por otros autores tras 20h (Tejada y Huidobro, 2002) y 24h (Taskaya y col., 2003; Bagni y col. 2007). En los animales ayunados 72h y en los alimentados con distintas fuentes de lípidos, cuyas medidas de pH se realizaron a las 5-6 horas tras la muerte, los valores de pH fueron inferiores, y similares a los observados por otros

Durante los días posteriores de almacenamiento se observó un incremento del pH (Figura 4). Similares resultados han sido observados en dorada (Kyrana y col., 1997; Tejada y Huidobro, 2002; Grigorakis y col., 2003; Goulas y Kontominas, 2007; Kilinc y col., 2007) y otras especies almacenadas en hielo (Espe y col., 2004; Rodríguez y col., 2004; Campos y col., 2005; Chaijan y col., 2005; Özogul y col., 2006; Rodríguez y col., 2006; Kilinc y col., 2007; Tejada y col., 2007; Tzikas y col., 2007). Incrementos del pH en el músculo del pescado indica la acumulación de compuestos alcalinos formados mediante mecanismos autolíticos y/o microbiológicos (Hebard y col., 1982). Se ha postulado también que el cambio del pH *post mortem* depende de la liberación de fosfato inorgánico y amoníaco debido a la degradación enzimática de ATP (Sikorski y col., 1990). El incremento inicial del pH observado en el presente estudio pudo deberse más a estos procesos autolíticos, ya que éstos tienen lugar en las primeras fases de almacenamiento. Posteriormente, en un estado más avanzado, el incremento del pH debió ser debido a la producción de compuestos básicos como resultado de la actividad microbiana. Generalmente, el pH muestra un importante incremento en las últimas fases de almacenamiento en frío, coincidiendo con el final de la fase lag del crecimiento de microorganismos (Aubourg y col., 2007). Según nuestros resultados, la fase exponencial de crecimiento se produjo durante la segunda semana, siendo los recuentos de microorganismos mucho mayores a partir del día 14.

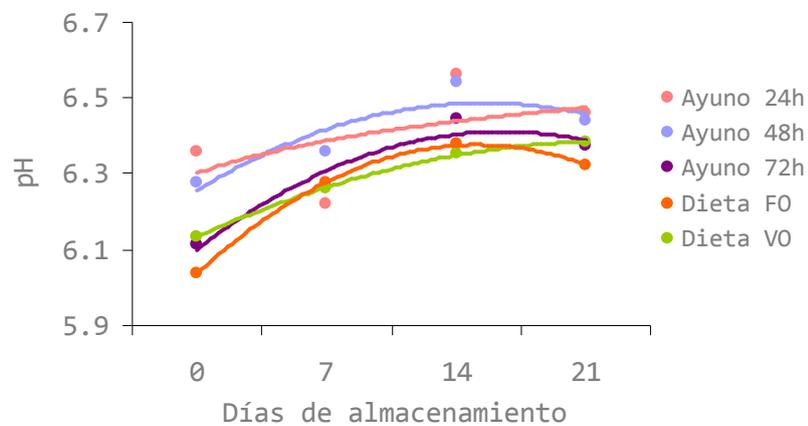


Figura 4: Evolución del pH del músculo de dorada durante el almacenamiento de animales ayunados durante distintos periodos previos al sacrificio (Ayuno de 24h, 48h y 72h) y de los alimentados con distintas fuentes de lípidos (Dieta FO y VO).

5.2.1.2. Capacidad de retención de agua (CRA)

La inmovilización de agua en el tejido muscular es aparentemente determinada por la disposición espacial de las proteínas miofibrilares (principalmente miosina) o filamentos (Figura 5A). Durante el desarrollo del *rigor*, la asociación de los filamentos gruesos y finos provoca la contracción de la red de proteínas disminuyendo el espacio disponible para la retención de agua. Parte del agua inmovilizada queda entonces libre para moverse y fluye a baja presión (Figura 5B). Este efecto también puede ser provocado por una disminución del pH del tejido, de manera que, un pH cercano al punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares incrementa la atracción entre grupos de proteínas adyacentes debido a la menor carga neta, contribuyendo así al apretado de la red de filamentos. Según nuestros resultados, en el estudio de distintas fuentes de lípidos, se observó menor CRA el día 0 respecto al resto de días (Figura 6). Dado que las muestras para el análisis se tomaron tras pocas horas después del sacrificio, la caída de pH, junto con los cambios estructurales asociados al *rigor*, pudo provocar una importante pérdida de agua en el momento de la medida. En el estudio de antioxidantes no se observó este efecto, ya que al realizar la toma de muestras a las 24 horas tras el sacrificio, la intensidad del *rigor* era menor. Resultados similares han sido descritos por Ofstad y col. (1996) en bacalao (*Gadus morhua* L) y salmón (*Salmo salar*), que observaron una mayor pérdida de líquido tras 3 horas *post mortem* que después de 48 horas.

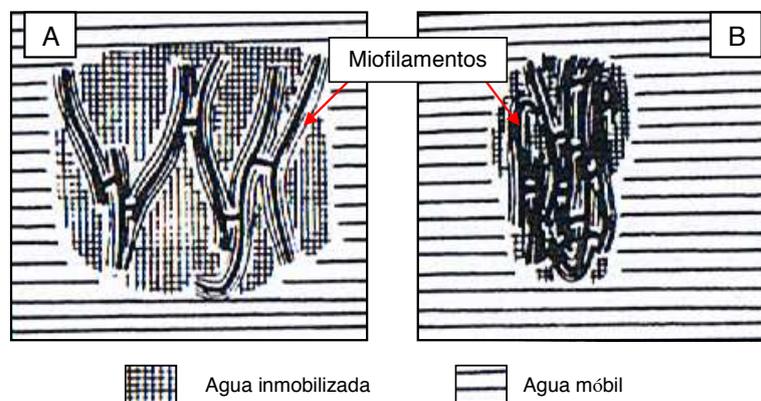


Figura 5: Representación de la influencia de la disposición espacial de la red de proteínas o filamentos del músculo en la capacidad de retención de agua (CRA) de la carne (adaptado de Hamm, 1972, 1975; en Hamm, 1986).

Durante el almacenamiento en hielo, otros cambios estructurales del músculo, como el desprendimiento del sarcolema, la formación de huecos en la matriz extracelular, el incremento del espacio intermiofibrilar y la contracción transversal de las células, pueden estar relacionados con una disminución de la CRA. Estas alteraciones del músculo han sido descritas en dorada (Ayala y col., 2010) y otras especies (Ofstad y col., 1996; Olsson, y col., 2003b). Según nuestros resultados, en el estudio de fuentes alternativas de lípidos, y de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores en dorada (Tejada y Huidobro, 2002) y lubina (Poli y col., 2001), no se observaron cambios significativos de la CRA después de la primera semana. En halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), se observó que la pérdida de líquido, tras incrementar durante los primeros 4 días de almacenamiento en hielo, comenzaba a disminuir después de 8 días (Olsson y col., 2003a). Teniendo en cuenta que en los productos cárnicos la mayor pérdida de agua se produce generalmente durante las primeras 24-48 horas *post mortem* (Moeseke y De Smet, 1999), la evolución de la CRA en pescado podría suceder de forma similar.

Después de la primera semana, se observaron mayores valores de CRA en los animales alimentados con la dieta con aceite vegetal comparado con los alimentados con la dieta con aceite de pescado. Estos resultados sugieren un efecto de la fuente de lípidos de la dieta sobre este parámetro, sin embargo, al comparar nuestros resultados con los aportados por otros autores, la interpretación resulta algo confusa. En filetes de salmón Atlántico ahumado almacenados en refrigeración se observó una mayor pérdida de líquido en el grupo de animales alimentados con una dieta cuya fuente de lípidos era de soja que con la que era de Peruvian (de pescado) (Rora y col., 2005). En filetes crudos de la misma especie, cuyos animales fueron alimentados con cuatro dietas experimentales, se observó mayor pérdida de agua con las dietas con aceite "Peruvian" y de soja que con las dietas con aceite "Capelin" (también de pescado) y de colza (Regost y col., 2004). Por el contrario, en bacalao no se observaron diferencias en la pérdida de líquido entre los grupos alimentados con dietas con aceite de pescado y soja (Mørkøre y col., 2007).

En el estudio de antioxidantes, la CRA disminuyó de forma progresiva con el tiempo de almacenamiento (Figura 6). Estas diferencias con respecto al estudio de fuentes alternativas de lípidos fueron debidas a la distinta metodología empleada. En el estudio de aceites vegetales las medidas de CRA se determinaron en fresco, sin embargo, en el de antioxidantes se hicieron tras congelar previamente durante 18 h y descongelar durante 2 h a temperatura ambiente. Durante el proceso de congelación, el músculo del pescado puede sufrir una serie de cambios, tales como la deshidratación y agregación de las proteínas miofibrilares, que resultan en la alteración de sus propiedades funcionales, la pérdida de la capacidad de retención de agua, y cambios en la textura del músculo (Barroso y col., 1998).

La capacidad de retención de agua del músculo del pescado es muy importante tanto desde un punto de vista comercial como para la aceptación del producto por parte del consumidor (Wilsson III y van Laack, 1999; Schäfer y col., 2002; Olsson y col., 2003b; Lakshmanan y col., 2007). La pérdida de peso que provoca la liberación de agua durante el procesado de un producto y durante su almacenamiento puede suponer pérdidas económicas. Los cambios en el contenido de agua y su distribución en el interior del músculo pueden influir en parámetros de calidad del pescado relacionados con su textura y apariencia, así como con su estabilidad durante el almacenamiento (Andersen y Rinnan, 2002; Lakshmanan y col., 2007).

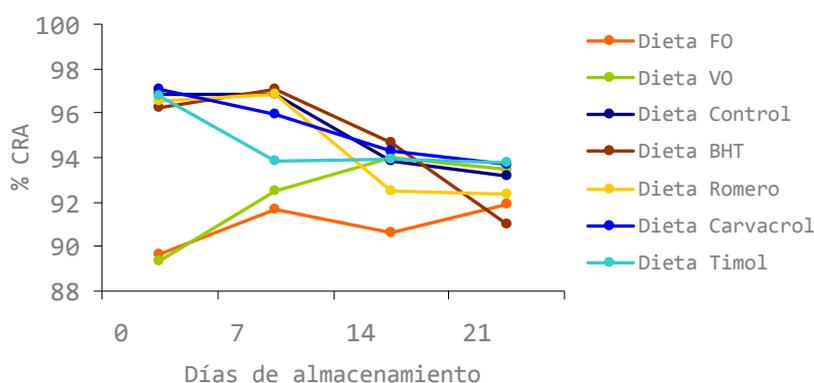


Figura 6: Evolución de la capacidad de retención de agua (CRA) del músculo de dorada durante el almacenamiento de animales alimentados con distintas fuentes de lípidos (Dietas FO y VO) y con dietas suplementadas con distintos antioxidantes (Dietas Control, BHT, Romero, Carvacrol, y Timol).

5.2.1.3. Textura

La textura del pescado es quizás uno de los parámetros de calidad más determinantes en la aceptabilidad del pescado. Después del sacrificio, tienen lugar los procesos autolíticos y microbianos, y el músculo se vuelve más blando y menos elástico, debido principalmente a los cambios ocurridos en el tejido muscular. La textura puede ser estimada mediante medidas instrumentales y/o mediante la valoración sensorial. Los ensayos de compresión realizados con un texturómetro son una imitación de la valoración sensorial realizada mediante la presión con el dedo (Olafsdottir y col., 2004). En el presente estudio, en todos los grupos de ayuno previos al sacrificio, se observó una disminución de la dureza con el tiempo de almacenamiento con ambos métodos, mostrando una buena correlación (Figura 7).

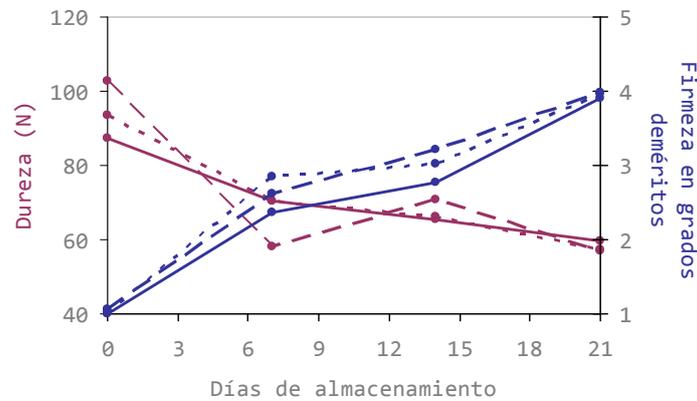


Figura 7: Evolución de la firmeza, estimada mediante el método instrumental (rojo) y mediante valoración sensorial (azul), del músculo de dorada durante el almacenamiento de animales ayunados 24h (líneas continuas), 48h (líneas discontinuas) y 72h (líneas de puntos).

El ablandamiento de la carne del pescado está generalmente asociado al efecto de la descomposición proteolítica del músculo (Huss, 1995). Los cambios que tienen lugar en el músculo del pescado *post mortem* relacionados con la alteración de la textura de la carne se deben a la actividad de enzimas endógenas (calpaínas, catepsinas, elastasas y colagenasas) que provocan la hidrólisis de las proteínas musculares y del tejido conectivo (Ofstad y col., 1996; Taylor y col., 2002; Delbarre-Ladrat y col., 2006). La velocidad con que se produzcan estos cambios presenta variaciones intra e interespecíficas, que pueden ser debidas a la influencia de factores, tanto intrínsecos como extrínsecos, en las proteínas y enzimas (Delbarre-Ladrat y col., 2006).

En dorada, el estudio de los cambios ultraestructurales durante el almacenamiento en hielo reveló una rápida degradación del músculo, que empezó en una fase muy temprana después de la muerte, y cuyos cambios fueron asociados al decrecimiento de los parámetros texturales desde la fase *pre-rigor* (3h después de la muerte) hasta 5-10 días (Ayala y col., 2010). En el presente estudio, entre los días 0 y 7, se observó un ablandamiento acusado del cuerpo de la dorada, percibido tanto con las medidas instrumentales de dureza como con la valoración sensorial de la firmeza (Figura 7). Posteriormente, durante la segunda semana de almacenamiento, el deterioro de este parámetro no fue tan evidente. De forma similar, en el estudio de Ayala y col. (2010), a pesar de observar que las alteraciones del músculo se producían con intensidad creciente hasta el día 22 de almacenamiento, los parámetros texturales permanecieron constantes. Algunos autores sugieren que es posible un umbral de

deterioro del tejido muscular en el que a un nivel determinado, las diferencias de textura podrían no ser medidas instrumentalmente (Bahuaud y col., 2008). Según nuestros resultados, aunque durante la última semana si se observó un descenso de la dureza, los cambios no fueron tan intensos como al inicio del almacenamiento.

Algunos autores han sugerido que, aunque el deterioro de la textura está principalmente asociado a procesos autolíticos, las bacterias del deterioro pueden actuar acelerando las reacciones que tienen lugar por autólisis (Hansen y col., 1996; Olsson y col., 2003a). De modo que, la pequeña disminución de la dureza observada durante la última semana en el presente estudio pudo ser debida en parte al mayor crecimiento de microorganismos.

5.2.1.4. Color

Los cromatóforos de la piel de los peces pueden ser oscuros por contener melaninas (melanóforos) o blancos (guanóforos), y según el tipo de carotenoides pueden ser amarillos (xantóforos) y rojos o naranjas (eritróforos). La cantidad y tipo de carotenoides es específico de la especie y es el resultado del alimento ingerido, de la capacidad de absorción y transporte sanguíneo, y del metabolismo de estos pigmentos (Torrissen y col., 1989). La dorada se caracteriza por un color gris-plata en la parte del lomo y un blanco luminoso del vientre, y con pigmentación tornasolada, aunque las doradas de cultivo tienen una pigmentación más apagada y suelen ser de un gris más oscuro. Nuestros resultados reflejaron las diferencias entre ambas partes del cuerpo con menores valores de L^* (65-80) en el área dorsal que en la ventral (85-90).

En el área dorsal del cuerpo se observó también una mayor intensidad cromática de la piel, y las variaciones con el tiempo de almacenamiento fueron más significativas que en la ventral. Gouveia y col. (2002) aportaron concentraciones de carotenoides en la zona dorsal del cuerpo de la dorada (~ 10 – 20 mg/kg de peso seco) superiores a la zona ventral (<10 mg/kg de peso seco). Casi la totalidad de estos pigmentos son ésteres de luteína (~ 60%) y epiluteína (~ 26 – 38 %, según la zona) (Gomes y col., 2002). Por lo que la cromaticidad de la piel de la dorada se caracteriza por una predominancia del color amarillo ($b^* \approx 4-8$; el día 0) (Figura 8). Con el tiempo de almacenamiento se observó una decoloración de la piel, reflejada por un descenso del Chroma (C^*_{ab}), y una tendencia hacia un tono más verdoso. Estos cambios pudieron estar asociados con cambios en la intensidad de los pigmentos dentro de los cromatóforos de la piel (Pavlidis y col., 2006).

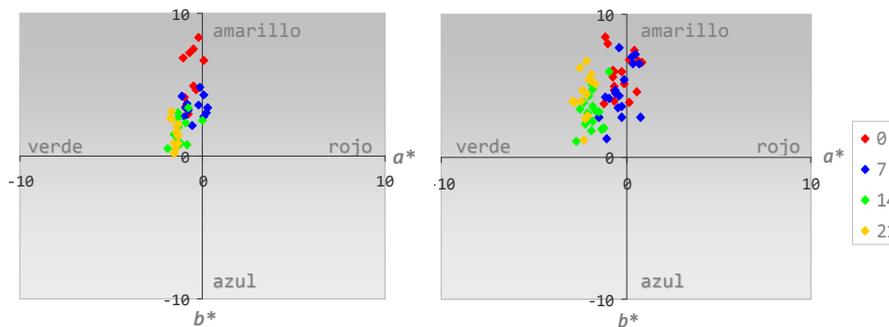


Figura 8: Representación gráfica de las coordenadas CIELab que definen la cromaticidad de la piel de las doradas sometidas a distintos periodos de ayuno antes del sacrificio (izquierda) y de las alimentadas con dietas suplementadas con distintos antioxidantes (derecha).

También en el músculo se observó una pérdida de color con el almacenamiento (Figura 9). En dorada el contenido de carotenoides del músculo (1 - 3 mg/kg de peso húmedo) es muy inferior al de la piel (Gomes y col., 2002), por lo que el rango de valores de los parámetros cromáticos fue también inferior, y similar al aportado por otros autores para dorada y lubina (Cakli y col., 2007; Kilinc y col., 2007; Valente y col., 2011).

En el estudio de antioxidantes el principal factor de cambio de la cromaticidad fue debido al parámetro b^* ($p < 0,05$), que mostró una tendencia con el tiempo a valores más próximos a 0 (Figura 9). Scaife y col. (2000) observaron una correlación entre los cambios del color del músculo y el menor contenido de carotenoides, que atribuyeron a una mayor tasa de oxidación de estos pigmentos. Sin embargo, en el presente estudio, las variaciones de color con el tiempo se observaron en todos los grupos alimentados con dietas suplementadas con antioxidantes, pero no en el grupo control (sin aditivos), lo que sugiere que otros factores pueden estar relacionados.

En el estudio de distintas fuentes de lípidos las variaciones de color con el tiempo fueron observadas en el parámetro a^* ($p < 0,001$), con una tendencia hacia valores más próximos a 0, que indicaron una pérdida del rojo en ambos grupos experimentales (Figura 9). El grupo de animales alimentado con la dieta con aceites vegetales presentó mayores valores de a^* durante todo el almacenamiento, pero estas diferencias fueron más bien debidas al efecto de la dieta en la calidad del producto final que a la intensidad con que se produjo la decoloración.

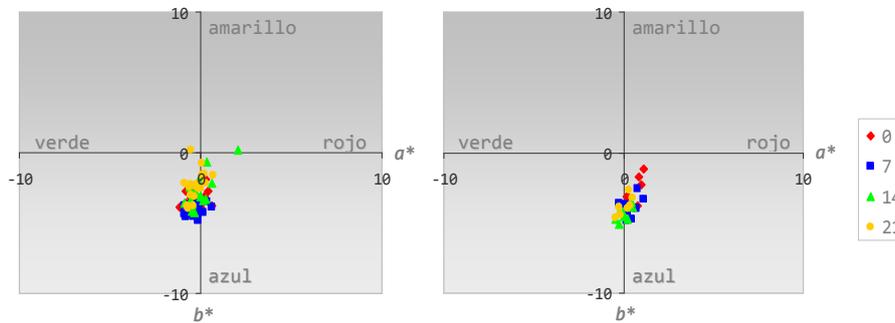


Figura 9: Representación gráfica de las coordenadas CIELab que definen la cromaticidad de los filetes de las doradas alimentadas con dietas suplementadas con distintos antioxidantes (izquierda) y de las alimentadas con distintas fuentes de lípidos (derecha).

Los cambios de color del músculo que se producen durante el almacenamiento podrían estar en parte relacionados con la pérdida de líquido. Se sabe que los pigmentos carotenoides presentes en la carne se encuentran unidos a proteínas musculares (Henmi y col., 1990) y también se ha observado que el incremento de la pérdida de líquido durante el almacenamiento en hielo de filetes de pescado puede ir acompañada de la pérdida de proteínas liberadas del tejido muscular (Olsson y col., 2003a). El deterioro de las membranas celulares y la alteración de las proteínas o de las fibras musculares podrían provocar la liberación de estos pigmentos al medio acuoso y posteriormente éstos se perderían por el efecto goteo.

Además de los cambios de cromaticidad, tanto en el estudio de ayuno como el de aceites vegetales, se observó un incremento de la luminosidad (parámetro L^*) con el tiempo de almacenamiento, mostrando un esclarecimiento de los filetes ($p < 0,05$). Resultados similares han sido observados por otros autores en filetes de salmón (Espe y col., 2004) y en músculo homogenizado de dorada y de lubina tras almacenar a los animales enteros (Kilinc y col., 2007). En el estudio de aceites vegetales, al principio del almacenamiento, se observaron valores de L^* más bajos que el resto de días y que los valores iniciales del estudio de antioxidantes. El incremento de la luminosidad de la carne del pescado durante las primeras horas tras el sacrificio ha sido atribuido a la caída del pH del músculo (Eifert y col., 1992; Robb, 2001; Kiessling y col., 2004). La desnaturalización de las proteínas musculares como consecuencia del descenso del pH tras el sacrificio, las hace insolubles y provoca la pérdida de agua del músculo, dando lugar a cambios en la reflexión de la luz de la superficie (Robb, 2001). La diferencia de valores de L^* entre los días 0 y 7 es observada en el estudio de aceites vegetales pudo deberse al incremento de este parámetro tras pocas horas después del sacrificio, y después de la toma de muestras, como consecuencia del descenso del pH. En este

estudio además, se observó una importante pérdida de agua al principio del almacenamiento (Figura 6, apartado 2.1.2.).

5.2.2. Oxidación de lípidos

Además de los cambios en las propiedades físicas del músculo que se producen en el pescado tras su sacrificio, éste es especialmente susceptible a la oxidación lipídica debido a su alto contenido de HUFA (Harris y Tall, 1994). Según nuestros resultados, el menor contenido de estos ácidos grasos observado en el músculo como resultado de la sustitución parcial del aceite de pescado de la dieta por aceites vegetales, pudo incrementar la estabilidad oxidativa de la carne del pescado. Los valores de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) de los animales alimentados con la dieta con aceites vegetales fueron significativamente menores a los de los animales alimentados con la que contenía aceite de pescado como única fuente de lípidos durante todo el almacenamiento. Algunos estudios muestran resultados similares con la inclusión de aceites vegetales en la dieta de dorada (Menoyo y col., 2004) y otras especies (Ng y col., 2004; Regost y col., 2004; Ng y Bahurmiz, 2009).

Por otro lado, dado que los aceites vegetales de soja y colza contienen importantes cantidades de tocoferoles (Kamal-Eldin, 2006), el uso de estos aceites como parte de la fuente de lípidos podría favorecer la estabilidad oxidativa del pescado por la transferencia al músculo de sustancias antioxidantes de la dieta. En el presente estudio no se analizó la concentración de estos compuestos en el músculo del pescado, pero diversos estudios muestran como los tocoferoles de diversos aceites vegetales de la dieta pueden ser depositados en la carne del pescado y disminuir la oxidación de lípidos (Ng y col., 2004; Regost y col., 2004; Wang y col., 2006). También Peng y col. (2008) observaron en el hígado de dorada negra (*Acanthopagrus schlegelii*) un incremento de α -tocoferol y una reducción de TBARS en los animales alimentados con dietas con porcentajes crecientes de aceite de soja.

La oxidación de lípidos es una de las principales causas de deterioro de muchos alimentos que contienen grasas y aceites. El deterioro oxidativo de los PUFA conduce, mediante la formación de hidroperóxidos de cadena corta, a la producción de aldehídos, cetonas y otros compuestos que se consideran responsables del desarrollo de la rancidez durante el almacenamiento de los alimentos (Botsoglou y col., 1994). Estas sustancias producen olores, sabores y colores indeseables que reducen la aceptabilidad del producto y su valor nutritivo, y algunas incluso pueden contribuir a cambios en la textura (Haard, 1992; Fennema, 1993; Huss, 1995). Además, la oxidación de lípidos da lugar a la producción de compuestos poco saludables, como los

radicales libres y aldehídos reactivos. Se ha demostrado que el malondialdehído (MDA), que es el producto mayoritario de la degradación de hidroperóxidos lipídicos, es mutagénico y carcinogénico (Shamberger y col. 1974; Basu y Marnet, 1984; en Botsoglou y col., 1994), por lo que su presencia puede comprometer la seguridad del alimento.

El uso de antioxidantes para retrasar la rancidez oxidativa es muy frecuente en la industria alimentaria. En el sector de producción animal, además, la inclusión de antioxidantes en la dieta del animal puede ser un método efectivo para incrementar la estabilidad oxidativa del músculo, especialmente en aquellos productos en los que la adición del antioxidante en el producto final puede resultar dificultosa. Numerosos estudios han mostrado el efecto antioxidante de dietas suplementadas con tocoferoles en productos cárnicos (Nam y col., 1997; Hoving-Bolink y col., 1998; Eikelenboom y col., 2000; Houben y col., 2000; Dal Bosco y col., 2004; Sau y col., 2004) y en pescado (Akhtar y col., 1998; Scaife y col., 2000; Ruff y col., 2002; Ruff y col., 2003; Ortiz y col., 2009).

En los últimos años además se ha prestado especial atención en especias y plantas aromáticas que han sido usadas tradicionalmente durante siglos en la conservación de alimentos. El uso de dietas suplementadas con compuestos polifenólicos ha sido estudiado en diversos productos cárnicos (Botsoglou y col., 2002; Botsoglou y col., 2003; O'Grady y col., 2006; Simitzis y col., 2008; Nieto y col., 2010a; Nieto y col., 2010b; Simitzis y col., 2010). En pescado, la efectividad de estos productos como conservantes aplicados mediante tratamientos exógenos ha sido comprobada por algunos autores (Harpaz y col., 2003; Altieri y col., 2005; Serdaroglu y Felekoğlu, 2005; Mahmoud y col., 2006; Goulas y Kontominas, 2007; Sánchez-Alonso y Borderías, 2008; Kostaki y col., 2009; Attouchi y Sadok, 2010; Tironi y col., 2010). Sin embargo, según nuestro conocimiento, tan sólo Akhtar y col. (1998) describe el efecto combinado de oleoresina de romero y α -tocoferol en la estabilidad lipídica de trucha arco iris (*Onchorhynchus mykiss*) tras incorporarlos a la dieta.

Según nuestros resultados, la adición de antioxidantes de este tipo a los piensos pueden contribuir a retrasar los procesos de oxidación en el pescado, debido a la transferencia de estos compuestos o sus derivados al músculo del pez. Este efecto fue observado al incluir extracto de romero o aceite esencial de tomillo -quimiotipo carvacrol- en el pienso de la dorada. Tanto las dietas que contenían estos productos como la dieta elaborada con BHT tuvieron un efecto antioxidante en el pescado que no se observó con la dieta control sin aditivos. Los tratamientos endógenos con estos productos, aunque puede resultar más complicado conseguir un efecto antioxidante significativo, presentan una ventaja frente a la aplicación exógena, y es que no requieren la manipulación del pescado, y por tanto, la alteración de su calidad es minimizada.

A pesar de los distintos niveles de oxidación observados entre los peces alimentados con las distintas dietas experimentales, en el presente estudio no se observó una oxidación intensa en el músculo de dorada. En la Tabla 5 se muestran los valores de TBARS aportados para dorada y otras especies almacenadas en refrigeración. Este índice es ampliamente utilizado para determinar el grado de oxidación del pescado durante su almacenamiento. Sin embargo, en muchos casos el pescado refrigerado es considerado no apto para el consumo por una proliferación bacteriana antes de que las modificaciones de la fracción lipídica muestren signos de deterioro evidentes (Papadopoulos y col., 2003; Chytiri y col., 2004; Grigorakis y col., 2004; Cakli y col., 2007; Kilinc y col., 2007).

Como se puede observar en la Tabla 5, la mayoría de los trabajos expuestos muestran valores de TBARS que no alcanzan el límite por encima del cuál se ha asociado al desarrollo de olores y sabores inaceptables en el pescado (1-2 mg de MDA/kg, según Conell, 1995). Pero, en algunos casos estos valores son más altos de lo habitual (Simeonidou y col., 1998; Ruiz-Capillas y col., 2001; Taliadourou y col., 2003). Según Fernández y col. (1997), no siempre los rangos de TBARS asociados a olores y sabores relacionados con oxidación deben ser considerados como valores de referencia de umbrales de rancidez, ya que, además de la especie, los valores de TBARS son influidos por otros factores, como pueden ser el estado de alimentación y la edad de los animales antes del sacrificio, y el método utilizado para su análisis. Incluso las condiciones del test en si mismas pueden contribuir a las variaciones en los resultados obtenidos en cualquier test de TBA.

El índice del TBA es el método más frecuentemente utilizado como medida de la oxidación de lípidos en la carne de alimentos procedentes de animales debido a su relativa sencillez (Raharjo y Sofos, 1993). Sin embargo, se ha observado que la interferencia en la reacción del TBA y el MDA de ciertos compuestos presentes en la muestra puede dificultar la medición espectrofotométrica. Algunos de estos compuestos son proteínas hidrosolubles, péptidos (Shamberger y col., 1977; Schmedes y Holmes, 1989; en Botsoglou y col., 1994), otros aldehidos distintos del MDA (Kosugi y col., 1988), pigmentos (Shamberger y col., 1977, en Botsoglou y col., 1994; Bird y Draper, 1984), aminoácidos, aditivos y gotas de grasa (Hoyland y Taylor, 1991). En pescado, esta interacción puede ser muy variable según la especie (Papadopoulos y col., 2003). Además, algunos otros compuestos con propiedades espectrales similares a la del complejo TBA-MDA, que pueden estar presentes en los extractos de carne, pueden provocar interferencias, con la consecuente sobrestimación de los resultados (Rey y col., 2005). Por tanto, la cuantificación de MDA puede no revelar la tasa real de oxidación (Aubourg, 1993).

Tabla 5: Valores de TBARS (mg MDA/kg) en diversas especies de pescado almacenado en refrigeración.

Días	Especie	TBARS	Autores
21	Dorada	2,50 - 5,67	Presente Tesis: Distintos tiempos de ayuno previos al sacrificio. Alvarez y col. (2008)
21	Dorada	0,16 - 0,48	Presente Tesis: Distintas fuentes de lípidos.
21	Dorada	0,05 - 0,46	Presente Tesis: Dietas suplementadas con antioxidantes. Alvarez y col. (2011)
24	Dorada	0,62 - 1,17	Kyraná y col. (1997)
18	Dorada Lubina	0,360 - 0,949 0,259 - 1,415	Cakli y col. (2007)
15	Dorada Lubina	0,51 - 3,00 0,49 - 3,20	Kilinc y col. (2007) * Sin hielo.
7 9	Lubina	4°C: 0,04 - 0,10 1°C: 0,09 - 0,17	Poli y col. (2001)
16	Lubina	Sin visceras: 0,0015 - 0,0045 Eviscerado: 0,0025 - 0,0073	Papadopoulou y col. (2003)
17	Lubina	0,058 - 0,157	Ozden y col. (2007)
16	Lubina	1,55 - 8,15	Talladourou y col. (2003)
25	<i>Merluccius merluccius</i>	4,6 - 8,6	Ruiz-Capillas y col. (2001)
19 22	<i>Trachurus trachurus</i>	Agua/hielo: ~ 0,0 - 1,5 Hielo: ~ 0,0 - 0,6	Losada y col. (2006)
19	<i>Scophthalmus maximus</i>	0,27 - 0,91 (eviscerado)	Ozogul y col. (2006)
16	<i>Liza aurata</i>	Con hielo: ~ 0,1 - 0,9 Sin hielo: ~ 0,1 - 0,8	Bahmani y col. (2011)
9	<i>S. pilchardus</i>	Agua/hielo: 0,26 - 1,36 Hielo: 0,38 - 3,31	Losada y col. (2007) * Congelación previa de 1, 2 y 4 meses.
	<i>Solea senegalensis</i>	~ 0,4 - 0,8 ~ 0,2 - 0,4	Tejada y Huidobro (2007)
6	<i>Scomber japonicus</i> <i>Trachurus trachurus</i> <i>Sardine mediterraneus</i> <i>Scomber scombrus</i> <i>Boops boops</i> <i>Mullus barbatus</i> <i>Merluccius mediterraneus</i>	1,82 - 7,43 1,91 - 9,58 2,46 - 18,32 2,03 - 10,13 3,02 - 20,98 1,51 - 14,61 1,28 - 8,54	Simeonidou y col. (1998)

~: valores aproximados, extraídos de una representación gráfica.

5.2.3. Producción de compuestos volátiles nitrogenados asociados al deterioro

La determinación del nitrógeno básico volátil total (NBVT) es una medida de los compuestos nitrogenados asociados con el deterioro del pescado. El nitrógeno básico volátil total (NBVT) incluye las medidas de trimetilamina (TMA), producida por deterioro bacteriano, la dimetilamina (DMA), producida por enzimas autolíticas durante el almacenamiento en congelación, y el amoníaco, producido bien por la desaminación bacteriana de aminoácidos y catabolitos de nucleótidos, bien por la degradación autolítica del AMP (Huss, 1995). La TMA es uno de los compuestos dominantes del pescado estropeado. Su producción es típica de muchas bacterias como *Shewanella putrefaciens*, *Alteromonas*, *Photobacterium* y *Vibrio*. Aunque, en pescados en los que el deterioro es debido a una flora no reductora de OTMA, como es el caso de *Pseudomonas spp*, un leve incremento en las bases volátiles durante el almacenamiento puede ser debido a la producción de amoníaco por desaminación bacteriana de aminoácidos. También en las primeras semanas de almacenamiento en hielo se forma un poco de amoníaco debido al proceso autolítico de degradación de AMP (Huss, 1995).

Según nuestros resultados, no se produjo un incremento importante con el tiempo de almacenamiento (Figura 10). En el estudio de ayuno, se observó una correlación significativa con el tiempo ($b=0,159$; $p<0,001$), pero el incremento con el almacenamiento fue pequeño (desde valores de 19-22 mg N/ 100g, el día 0, hasta 23-26 mg N/ 100g, el día 21). En el estudio de fuentes alternativas de lípidos, los valores fueron de 23-28, en el grupo de animales alimentado con la dieta FO, y de 25-28, en el grupo de los alimentados con la dieta VO, pero no se observaron variaciones significativas con el tiempo ni con la dieta. Según los resultados obtenidos por otros autores, los valores del NBVT en dorada se mantienen normalmente entre 20 y cerca de 30 mg N/ 100g durante los primeros estadios de almacenamiento y después de 20-25 días se pueden llegar a alcanzar valores superiores a 40 mg N/ 100g. Estos resultados indican un incremento tardío del NBVT.

Niveles de 30-35 mg N/100g son generalmente considerados como límite de aceptabilidad para pescados de agua fría almacenados en hielo (Connell, 1995). En nuestro caso, los valores obtenidos siempre fueron inferiores a este valor, aun cuando el pescado había alcanzado su vida útil. Similares resultados han sido aportados por otros autores en dorada (Kyra y col., 1997; Tejada y Huidobro, 2002; Özogul y col., 2007) y lubina (Kyra y Lougovois, 2002; Papadopoulos y col., 2003; Özogul y col., 2004; Castro y col., 2006), por lo que algunos no lo consideran un buen indicador de frescura para estos pescados almacenados en hielo.

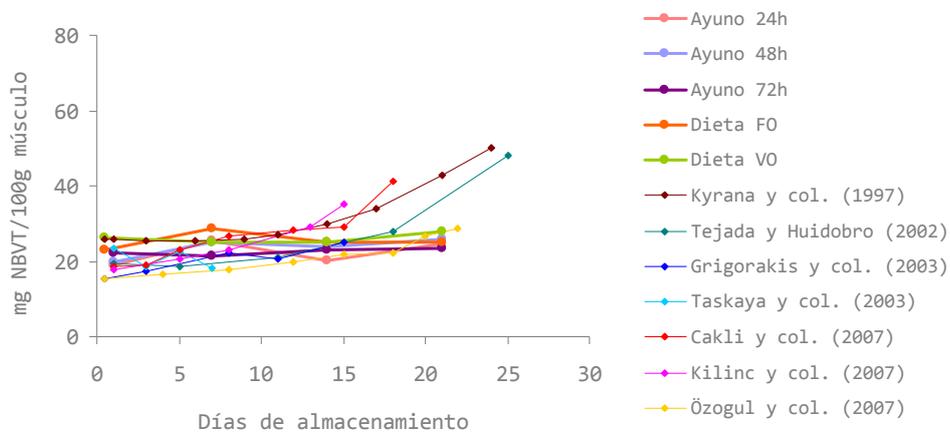


Figura 10: Cambios en el nitrógeno básico volátil total (NBVT) en dorada con el tiempo de almacenamiento, observados en los estudios de ayuno (Ayuno de 24, 48 y 72h) y fuentes alternativas de lípidos (Dietas FO y VO) de la presente tesis, y los aportados por otros autores.

5.2.4. Crecimiento de microorganismos

En los peces vivos o recién capturados los microorganismos se encuentran en todas las superficies externas (piel y branquias) y en los intestinos (Gram y Huss, 1996; Leisner y Gram, 1999). El número total de microorganismos varía enormemente, siendo el rango normal de 10^2 - 10^7 ufc/cm² en la superficie de la piel (Huss, 1995) y 10^3 - 10^9 ufc/g en las branquias e intestinos (Shewan, 1962, en Huss, 1995). Estos recuentos dependen más del hábitat del pez vivo que de la especie (Shewan, 1977, en Huss, 1995), de manera que los pescados capturados en aguas frías y limpias contienen menor número de microorganismos que los de aguas cálidas y contaminadas. Por otro lado, durante el proceso de fileteado para la extracción de muestras puede haber contaminación cruzada, siendo posibles fuentes de contaminación la microflora hospedadora del pez, los utensilios utilizados (tablas de cortar, cuchillos), el personal, y el agua-hielo utilizada para el sacrificio (Chytiri y col., 2004). El recuento de aerobios considerado por International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1986) como límite máximo en pescado fresco es de $5 \cdot 10^5$ ufc/g ($\approx 5,7$ log ufc/g). En el presente estudio, los recuentos iniciales de aerobios fueron de $<1 - 4$ log ufc/g (Figura 11), indicando una alta calidad del pescado y buenas prácticas de manejo.

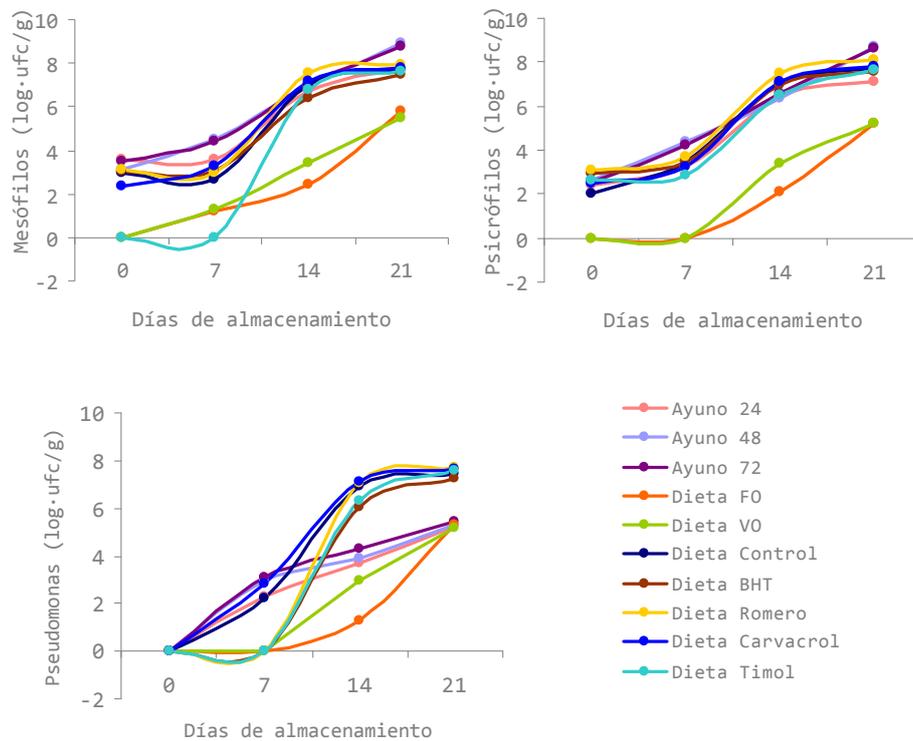


Figura 11: Crecimiento microbiano en el músculo de dorada durante el almacenamiento en hielo de cada uno de los grupos experimentales.

En el pescado conservado en refrigeración, los procesos de deterioro microbianos comienzan normalmente después de la segunda semana (Oehlenschläger, 2011). Según nuestros resultados, el crecimiento se produjo mayoritariamente entre los días 7 y 14 de almacenamiento, de manera que tras dos semanas los recuentos de mesófilas de los grupos experimentales de los estudios de ayuno y de antioxidantes habían alcanzado ya el límite máximo de aceptabilidad para el consumo del pescado (7 log ufc/g, según ICMSF, 1986) o estaban muy próximos (Figura 11). En el trabajo de fuentes alternativas se observaron recuentos microbianos más bajos que en los estudios de ayuno y antioxidantes. Estos resultados podrían indicar una mejor calidad del agua del circuito durante el crecimiento de los animales, o bien que la invasión microbiana del músculo durante el almacenamiento fuese menor, o que la contaminación por parte de microorganismos presentes en la piel y en las vísceras al extraer las muestras de carne fuese mínima.

La microflora en peces de aguas templadas está dominada por bacterias psicrotrófas, también llamados psicrófilos facultativos, que pueden crecer a 0 °C, aunque su temperatura óptima de crecimiento sea de 20-30 °C y la máxima de casi 35 °C, y son los principales agentes de la putrefacción de alimentos refrigerados (Prescott y col., 1999). En el presente estudio, los crecimientos de aerobios mesófilos y psicrófilos fueron muy similares durante todo el periodo de almacenamiento. Los recuentos de estas bacterias se determinan en unas condiciones de incubación de 30 °C durante 72 h, para mesófilas, y de 15 °C durante 3 días, para psicrófilos. Ambas temperaturas de incubación pueden ser toleradas por los microorganismos psicrotrófos. Éstos probablemente constituyeran gran parte de la población microbiana del pescado de nuestros estudios.

La composición de la microflora cambia drásticamente durante el almacenamiento, de forma que, después de 1 a 2 semanas de conservación con hielo y en condiciones aeróbicas, la flora está constituida casi exclusivamente por *Pseudomonas spp.* y *Shewanella putrefaciens* (Huss, 1995). Éstas son las bacterias específicas del deterioro del pescado conservado en refrigeración (<4°C) y/o en hielo (Gram y Huss, 1996; Leisner y Gram, 1999). En la Figura 11 se representan el recuento de *Pseudomonas* obtenido en cada uno de los grupos experimentales. Su crecimiento se detectó los días 7 y 14, lo que indica que comenzó a proliferar durante la primera y segunda semanas.

La composición de la dieta podría tener un efecto sobre el crecimiento de bacterias en el músculo durante el almacenamiento, ya que durante la segunda semana el crecimiento de mesófilos ($p>0,05$), psicrófilos y *Pseudomonas* ($p<0,05$) fue mayor en los animales alimentados con la dieta con aceite vegetal respecto a los alimentados con la dieta con aceite de pescado. Según Huss (1995), la microflora del tracto gastrointestinal es reflejo del medio ambiente del pez y de su ingesta. Por lo que las diferencias observadas entre los grupos alimentados con distintas fuentes de lípidos pudieron ser debidas a diferencias en los microorganismos que provienen de la microbiota gastrointestinal. Algunos estudios muestran cambios en la microflora intestinal del pez con la inclusión de harinas y aceites vegetales en la dieta (Ringø y col., 2002; Heikkinen y col., 2006; Refstie y col., 2006). Aunque el conocimiento de la microbiota intestinal de peces y el efecto de la dieta sobre su composición es bastante limitado.

También el ayuno previo al sacrificio tuvo un efecto en el crecimiento de microorganismos en el músculo del pescado durante su almacenamiento. Todos los recuentos microbianos, tanto los aerobios como las enterobacterias y coliformes, fueron más abundantes en los animales ayunados 48 y 72 h que en los ayunados 24h. Estas diferencias pudieron estar relacionadas con la actividad bacteriana del tracto digestivo durante las primeras horas después de la ingesta, que es cuando tiene lugar el tránsito gastrointestinal del alimento. Según los resultados del trabajo de evacuación los procesos digestivos y de vaciado del intestino a la temperatura a

la cuál se encontraban los peces durante el ayuno (21° C) ocurren en un periodo de tiempo aproximado de 24h. Por tanto, los animales ayunados 48 y 72 h, a diferencia de los ayunados 24h, tenían sus digestivos totalmente vacíos.

En cuanto a la adición en el pienso de compuestos naturales, se observó un efecto antibacteriano de la dieta suplementada con aceite esencial de tomillo -quimiotipo timol. En los animales alimentados con esta dieta el recuento de mesófilos fue <1 hasta después de la primera semana de almacenamiento (Figura 11). Además del efecto antioxidante, la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de plantas aromáticas ha sido descrita en diversos alimentos (Burt, 2004). En concreto se sabe que el carvacrol y el timol son capaces de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, provocando la liberación de los lipopolisacáridos y aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática al ATP (Lambert y col., 2001).

5.2.5. Cambios en los atributos sensoriales

Los cambios físico-químicos y microbiológicos que ocurren en el pescado desde el momento de la muerte conllevan una serie de cambios sensoriales, de forma que, una estimación de frescura se puede obtener mediante la definición de criterios relacionados con el cambio en atributos como la apariencia, el olor, el color y la textura, que pueden ser medidos y cuantificados por métodos sensoriales o instrumentales (Olafsdottir y col., 2004). Los cambios sensoriales característicos en el pescado *post mortem* varían considerablemente dependiendo de la especie y el método de almacenamiento (Huss, 1995). En la presente Tesis, el Método del Índice de Calidad (QIM) adaptado para dorada, ofreció muy buenos resultados en todos los estudios de vida útil, ya que los atributos valorados, aunque no variaban todos con la misma intensidad, reflejaron la pérdida de frescura y el deterioro con el tiempo de almacenamiento de forma muy significativa.

Los primeros cambios sensoriales del pescado durante el almacenamiento están relacionados con la apariencia y la textura. Inmediatamente después de la muerte, el músculo está totalmente relajado y la textura es flexible y elástica. Tras algunas horas el músculo se contrae y se torna duro y rígido, de forma que todo el cuerpo se vuelve inflexible. Esta condición se mantiene hasta que se resuelve el *rigor*, que el músculo se relaja nuevamente y recupera la flexibilidad, pero no la elasticidad previa al *rigor* (Huss, 1995). Posteriormente, durante el almacenamiento, la degradación del músculo provoca el ablandamiento de la carne (Taylor y col., 2002; Delbarre-Labrat y col., 2006; Ayala y col., 2010).

En nuestros estudios, la firmeza y la elasticidad se valoraron presionando con el dedo índice sobre la zona central del cuerpo del animal, junto a la aleta lateral, que es la zona más gruesa. La firmeza se define como la fuerza requerida para deformar la muestra, y la elasticidad está relacionada con la capacidad de la muestra de recuperar la forma que tenía antes de ejercer la presión con el dedo. Según nuestros resultados, ambos atributos fueron valorados con la máxima puntuación el día 0, y durante los primeros días de almacenamiento tanto la elasticidad como la firmeza del primer día se iban perdiendo.

La pérdida de brillo y decoloración de la piel, el mucus blanquecino de la superficie y una rugosidad marcada en la parte de la cola fueron otros indicios de la pérdida de frescura de la dorada. Se observaron además diferencias en los cambios del color de la piel según el tiempo de ayuno y la fuente de lípidos de la dieta. Los cambios *postmortem* en el color de la piel en pescado pueden estar asociados con alteraciones en la reflexión de la luz debido a la autólisis celular y/o con cambios en la intensidad de los pigmentos dentro de los cromatóforos de la piel (Pavlidis y col., 2006). También el crecimiento de microorganismos durante el deterioro de los alimentos provoca la decoloración de éstos por la producción de pigmentos, así como la formación de mucus como consecuencia de la producción de material extracelular polisacárido (Gram y Huss, 1996).

El crecimiento de microorganismos conlleva además la producción de malos olores y sabores, como consecuencia de la hidrólisis de componentes del alimento (Gram y Huss, 1996). En concreto, en el pescado conservado en refrigeración, aunque los procesos autolíticos conduzcan al deterioro, la actividad microbiana es la principal razón del desarrollo de olores y sabores asociados a productos estropeados (Leisner y Gram, 1999). Shewan (1962) demostró que la mayoría de los componentes volátiles son producidos por bacterias, al comparar los compuestos químicos desarrollados durante el deterioro natural del pescado y el del pescado estéril (en Huss, 1995). El mayor reservorio de sustratos para la actividad metabólica de las bacterias, que son importantes para el deterioro del pescado, es la fracción soluble en agua. A partir de estos sustratos se producen un amplio rango de compuestos volátiles que dan lugar a olores asociados al deterioro del pescado (Tabla 6).

Según nuestros resultados, el olor a fresco del pescado se fue perdiendo durante la primera semana de almacenamiento, de manera que el día 7 se percibía un olor neutro del cuerpo. Posteriormente, comenzaron a aparecer malos olores, percibiéndose el día 14 el olor típico del pescado cuando no es fresco, y el día 21 el olor era ya a pescado podrido. Los cambios percibidos en el olor de las agallas ocurrieron en el mismo sentido que el olor del cuerpo, aunque siempre con una mayor intensidad de olor. Estos cambios se produjeron de forma más

acusada en los animales ayunados de 48 y 72h respecto a los ayunados 24h, posiblemente por el mayor crecimiento microbiano.

Tabla 6: Sustratos y compuestos asociados a olores desagradables producidos por bacterias durante el deterioro del pescado almacenado aeróbicamente, empacado en hielo o a temperatura ambiente.

Sustratos	Compuestos típicos de deterioro	Microorganismos específico del deterioro	Olores asociados al deterioro
TMAO	TMA	<i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Photobacterium phosphoreum</i> <i>Vibrinaceae</i> <i>Aeromonas spp</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	Olor típico a pescado pasado
Aminoácidos con azufre (cisteína, metionina)	Sulfuros	<i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Photobacterium phosphoreum</i> <i>Vibrinaceae</i>	Olor a podrido muy desagradable
Aminoácidos (glicina, leucina)	serina, Ésteres, aldehídos	cetonas, <i>Pseudomonas spp</i>	Olores dulces y afrutados
Aminoácidos, urea	NH ₃	Anaerobios deteriorativos	Olor pungente, penetrante

Huss, 1995; Leisner y Gram, 1999.

Tanto el olor como el color de las agallas reflejaron muy bien la pérdida de frescura y el deterioro, puesto que los cambios observados con el paso de las semanas fueron muy significativos desde el inicio del almacenamiento. El color de las agallas (Figura 12) se iba oscureciendo durante la primera semana desde un color vivo rojo-rosado, el día 0, hacia un rojo oscuro-marrón. Posteriormente, se decoloraban y viraban hacia un marrón claro-verdoso con tonos ocre. Esta evolución era irregular, ya que en ocasiones se podía observar un color rojo-marrón y/o una decoloración parcial en doradas de la misma calidad e incluso del mismo pez. Resultados similares fueron observados por Huidobro y col. (2000), por lo que estos autores decidieron asignar la misma puntuación en ambos casos, de forma que el color de las agallas era “roja oscuro/luminoso” (0 puntos deméritos) o “rojo marrón/decolorado” (1 punto demérito). En el presente estudio, sin embargo, el sistema de puntuación basado en una escala continua permitió valorar la progresión de los cambios con el tiempo.



Figura 12: Cambios en las agallas de la dorada durante almacenamiento en hielo (de izquierda a derecha mayor grado de deterioro).

Dado el importante riego sanguíneo de las agallas, los cambios observados en el color pueden ser debidos a la producción de metahemoglobina por la oxidación de la hemoglobina. De hecho, en ocasiones se percibía un olor a hierro, que podría estar asociado precisamente a esta conversión. Según nuestro conocimiento, este efecto no se ha documentado en las agallas de pescado. Sin embargo, se sabe que la oxidación lipídica resulta en la formación de pro-oxidantes capaces de reaccionar con la oximioglobina que conduce a la formación de metamioglobina, provocando la decoloración de los productos cárnicos (Frankel, 1998). Este efecto se ha observado tanto en carne roja (Isdell y col., 2003; Ruiz de Huidobro y col., 2003; Mancini y Hunt, 2005; Georgantelis y col., 2007) como en pescados de músculo oscuro, como la sardina, el jurel (Chaijan y col., 2005) o el atún (Haard, 1992).

El estado de la agallas y de los ojos son atributos frecuentemente utilizados por el consumidor para valorar la frescura del pescado. Según nuestros resultados, en la dorada se producen cambios fácilmente detectables en la forma del ojo (Figura 13). Una semana de almacenamiento bastaba para perder la forma convexa típica, observándose ya el día 7 ojos planos o ligeramente hundidos. Se observó además un deterioro más lento de este atributo en los grupos de animales alimentados con las dietas suplementadas con BHT y aceite esencial de tomillo-quimiotipo timol respecto al resto de grupos alimentados con las dietas con otros o sin ningún aditivo. En cuanto a los cambios en la claridad del ojo, a pesar de no ser tan evidentes, también se detectaban a los pocos días de almacenamiento por una ligera opacidad de la pupila. En algunos casos, además, se observaban hemorragias en la parte externa alrededor del ojo.



Figura 13: Cambios en los ojos de la dorada durante almacenamiento en hielo (de izquierda a derecha mayor grado de deterioro).

Algunos autores consideran que el color de las agallas y la forma del ojo no son buenos indicadores de frescura para dorada, debido a que los cambios durante el periodo de almacenamiento son muy variables (Alasalvar y col., 2001; Cakli y col., 2007). Sin embargo, según nuestros resultados, y de acuerdo con otros autores (Huidobro y col., 2000; Kilinc y col., 2007), los cambios más tempranos y pronunciados se producían precisamente en la apariencia de los ojos y las agallas. Por tanto, aunque no sean buenos indicadores de deterioro, dado que los cambios que se producen muestran evidencias de la pérdida de frescura desde el principio del almacenamiento, si pueden considerarse buenos indicadores de frescura.

5.2.6. Estimación de la vida útil

La principal característica de la evaluación sensorial del pescado mediante el Método del Índice de Calidad (QIM) es que está expresado con una puntuación de grados deméritos, pudiéndose relacionar linealmente con el tiempo de almacenamiento (Huidobro y col., 2000; Sveinsdóttir y col., 2002, 2003; Lougovois y col., 2003; Hyldig y Green-Petersen, 2004). En la Figura 14 se ilustra la regresión lineal del índice de calidad frente al tiempo de almacenamiento para los distintos grupos experimentales del presente estudio. Aunque tras una semana de almacenamiento ya se observaron algunos indicios de la pérdida de frescura, el pescado no mostró signos evidentes de deterioro hasta pasadas dos semanas, coincidiendo con la fase exponencial de crecimiento microbiano. De hecho, tanto el análisis sensorial como el microbiológico fueron los más sensibles a las variaciones del tiempo de almacenamiento en hielo en todos los estudios de vida útil.

La pendiente de la recta obtenida de la regresión del índice de calidad frente al tiempo es la tasa de deterioro (tasa de acumulación de los puntos deméritos), y un simple cálculo puede indicar la equivalencia en número de días de almacenamiento para cada grado de deterioro.

Por tanto, la vida útil del producto puede ser estimada según un valor del índice de calidad al cuál se decide que el producto ya no se vende, o bien, un valor de la recta donde se cruza algún límite arbitrario entre los grados de deterioro de los productos evaluados (Hyldig y col., 2007). En el estudio de ayuno, que fue el primer estudio de vida útil realizado, dada la correlación entre el análisis sensorial y microbiológico, se estableció un Índice de Calidad (IC) de 38 como máximo de aceptabilidad sensorial, que fue el valor alcanzado al cumplirse la vida útil microbiológica, según la normativa que establece un recuento de aerobios mesófilos de 7 log ufc/g como límite de aceptabilidad para el consumo humano (ICMSF, 1986) (Tabla 7).

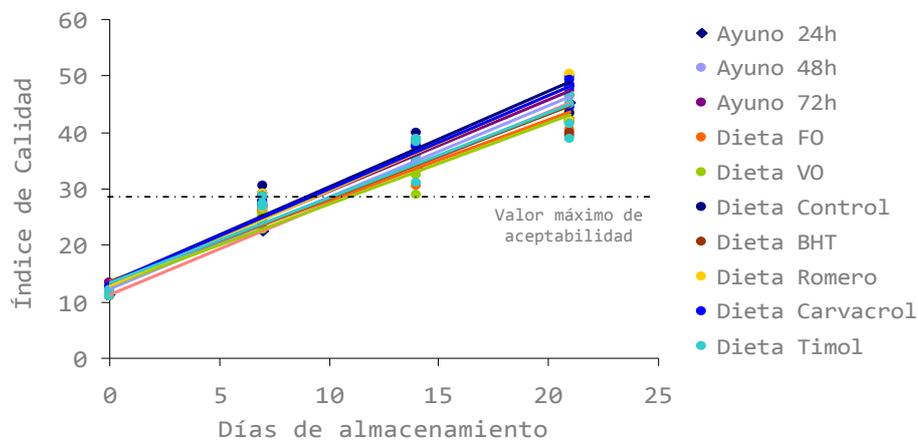


Figura 14: Regresión lineal del índice de calidad frente al tiempo de almacenamiento para los distintos grupos experimentales.

Según estos resultados, el valor por encima del cuál la dorada almacenada aeróbicamente en refrigeración con hielo sería rechazada sensorialmente se alcanzaría entre los días 14 y 17 (Tabla 7). Similares resultados han sido aportados por varios autores que han estimado la vida útil de dorada almacenada en similares condiciones en torno a 13-18 días (Alasalvar y col., 2001; Tejada y Huidobro, 2002; Cakli y col., 2007; Kilinc y col., 2007). Sin embargo, no siempre la vida útil sensorial coincide con la microbiológica. Kilinc y col. (2007) observaron que doradas almacenadas en hielo, que habían alcanzado el valor límite de mesófilos el día 13 de almacenamiento, eran todavía aceptables según el análisis sensorial. En el presente estudio, la vida útil sensorial del grupo de doradas alimentadas con la dieta "Romero" era de 15 días, pero el recuento de mesófilos el día 14 sobrepasaba el límite de aceptabilidad (7,53 log ufc/g). En el caso de los animales del experimento de distintas fuentes de lípidos, el recuento límite de

mesófilos no fue alcanzado durante todo el periodo de almacenamiento, pero, según nuestra estimación, el pescado sería sensorialmente rechazado a partir del día 17 de almacenamiento.

Tabla 7: Cálculo de la vida útil de la dorada de los distintos grupos experimentales según la relación del deterioro con el tiempo de almacenamiento en refrigeración.

	Ecuación de la regresión	R ²	Vida útil
Ayuno 24h	$Mesófilos^{(a)} = 2,497 + 0,011*24 + 0,259*d$	0,9282	16
Ayuno 48h	$Mesófilos^{(a)} = 2,497 + 0,011*48 + 0,259*d$	0,9282	15
Ayuno 72h	$Mesófilos^{(a)} = 2,497 + 0,011*72 + 0,259*d$	0,9282	14
Dieta FO	$IC = 13,597 + 1,425*d$	0,9606	17
Dieta VO	$IC = 12,916 + 1,443*d$	0,9720	17
Dieta Control	$IC = 13,424 + 1,697*d$	0,9665	14
Dieta BHT	$IC = 13,292 + 1,502*d$	0,9445	16
Dieta Romero	$IC = 12,958 + 1,675*d$	0,9691	15
Dieta Carvacrol	$IC = 13,290 + 1,664*d$	0,9781	15
Dieta Timol	$IC = 13,469 + 1,499*d$	0,9403	16

IC: Índice de Calidad; d: días de almacenamiento.

^(a)Valor límite de aceptabilidad para el consumo humano del recuento de aerobios mesófilas (7 log ufc/g) establecido por la normativa ICMSF (1986).

La vida útil de pescado almacenado en hielo depende de diversos factores como la temperatura de almacenamiento, la manipulación del pescado tras el sacrificio, la especie, la zona de pesca, e incluso la estación del año en la que éste sea capturado (Huss, 1995). En peces de acuicultura además, factores como la dieta, el método de sacrificio, etc, puede tener una influencia importante. Según nuestros resultados, el tiempo de ayuno previo al sacrificio tuvo un efecto sobre la vida útil de dorada almacenada en refrigeración con hielo, ya que el prolongar este periodo más de 24 horas puede acelerar los procesos de deterioro y limitar la vida útil sensorial y microbiológica. Este efecto fue debido principalmente a un mayor crecimiento microbiano en el músculo del pescado *post mortem*.

El uso de una fuente de lípidos de origen vegetal, sin embargo, no tuvo un efecto significativo en el índice de calidad ni en el recuento de mesófilos, que son los que determinarían en última instancia la aceptabilidad del producto. En este caso, aunque si se observaron diferencias significativas con la dieta en algunos de los atributos sensoriales valorados y en el recuento de algunos microorganismos, así como una menor oxidación lipídica en los animales alimentados con la dieta con aceite vegetal, éstas no mostraron un efecto significativo sobre la vida útil.

Por otro lado, los menores índices de oxidación observados en los animales alimentados con los piensos suplementados con BHT, aceite esencial de *Thymbra capitata* (quimiotipo carvacrol), y extracto de romero, y el efecto antibacteriano del pienso con aceite esencial de

Thymus zygis (quimiotipo timol), resultaron en una mayor vida útil respecto a las doradas alimentadas con la dieta sin aditivos. Por tanto, el uso de conservantes naturales en la dieta con propiedades antioxidantes y antimicrobianas podría aportar un valor añadido a la dorada almacenada en hielo prolongando su vida útil.

CONCLUSIONES

1.- La temperatura tiene una notable influencia en el tiempo requerido para completar la evacuación gastrointestinal en la dorada. Teniendo en cuenta las variaciones estacionales de temperatura que tienen lugar en el Mediterráneo a lo largo del año, el tiempo de ayuno en una granja debería ser en torno a 24h en verano, 36h en primavera y otoño, y 48h en invierno.

2.- El tiempo de ayuno antes del sacrificio influye significativamente sobre la vida útil, de modo que, a una temperatura promedio de 21°C, un ayuno de más de 24h acelera los procesos de deterioro del pescado. Según el recuento de microbiológico, la vida útil se estimó en 16 días para las doradas ayunadas 24h, 15 días para las ayunadas 48h y 14 días para las de 72h. Por tanto, hay que considerar el compromiso entre las ventajas de obtener un digestivo libre de restos de alimento y los cambios provocados por el ayuno sobre la calidad del producto final.

3.- El uso de aceites vegetales como parte de la fuente de lípidos en la dieta de dorada modificó el perfil de ácidos grasos de la carne, con ciertas implicaciones en las propiedades nutricionales del pescado. También se vieron afectados algunos parámetros de calidad, como el color y la textura, aunque como estos no fueron percibidos sensorialmente de forma significativa por un panel de catadores entrenados, es de esperar que no sean apreciables a nivel de consumidores.

4.- La sustitución parcial del aceite de pescado por aceites vegetales en la dieta no tuvo un efecto sobre la vida útil de la dorada almacenada en hielo, siendo en ambos grupos experimentales de 17 días. A pesar de observar indicios de una menor oxidación lipídica en el grupo de animales alimentados con la dieta con aceite de pescado como única fuente de lípidos y algunas diferencias sensoriales y microbiológicas, no se observó un efecto significativo en el Índice de calidad ni en el recuento de mesófilos, que son los que determinarían en última instancia la aceptabilidad del producto.

5.- La inclusión en la dieta de antioxidantes mostró una influencia sobre la conservación del pescado. Se observó un efecto antioxidante de las dietas suplementadas con butil hidroxitolueno, aceite esencial de tomillo (quimiotipo carvacrol), y extracto de romero, y un efecto antibacteriano de la dieta con aceite esencial de tomillo (quimiotipo timol). La vida útil sensorial de dorada almacenada en hielo fue prolongada en animales que habían sido alimentados con dietas suplementadas con BHT y timol, en dos días, y con romero y carvacrol, en un día, frente a la dieta sin aditivos, cuya vida útil fue de 14 días.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

- Akhtatar, P., Gray, J.I., Booren, A.M., y Garling, D.L. (1998). Effect of dietary components and surface application of oleoresin rosemary on lipid stability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle during refrigeration and frozen storage. *Journal of Food Lipids* 5, 43-58.
- Alasalvar, C., Taylor, K.D.A., Öksüz, A., Garthwaite, T., Alexis, M.N., y Grigorakis, K. (2001). Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods. *Food Chemistry* 72, 33-40.
- Alasalvar, C., Taylor, K.D.A., Zubcov, E., Shahidi, F., y Alexis, M. (2002). Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chemistry* 79, 145-150.
- Altieri, C., Speranza, M.A., Del Nobile, y Sinigaglia, M. (2005). Suitability of bifidobacteria and thymol as biopreservatives in extending the shelf life of fresh packed plaice fillets. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1294-1302.
- Andersen, U.B., Thomassen, M.S., y Røra, A.M.B. (1997). Texture properties of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects of diet, muscle fat content and time of storage on ice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 74, 347-353.
- Andersen, C.M., y Rinnan, Å (2002). Distribution of Water in Fresh Cod. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 35, 687-696.
- Aoki, T., y Ueno, R. (1997). Involvement of cathepsins B and L in post-mortem autolysis of mackerel muscle. *Food Research International* 30, 585-591.
- APROMAR, Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos (2011). *La acuicultura marina de peces en España 2011*. España.
- Ashie, I.N.A., Smith, J.P., y Simpson, B.K. (1996). Spoilage and self-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36, 87-121.
- Ashley, P.J. (2007). Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science* 104, 199-235.
- Attouchi, M., y Sadok, S. (2010). The effect of powdered thyme sprinkling on quality changes of wild and farmed gilthead sea bream fillets stored in ice. *Food Chemistry* 119, 1527-1534.
- Auburg, S.P., 1993. Review: interaction of malonaldehyde with biological molecules-new trends about reactivity and significance. *International Journal of Food Science and Technology* 28, 323-335.
- Aubourg, S.P., Quitral, V., Larraín, M.A., Rodríguez, A., Gómez, J., Maier, L., y Vinagre, J. (2007). Autolytic degradation and microbiological activity in farmed Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during chilled storage. *Food Chemistry* 104, 369-375.
- Ayala, M.D., Abdel, I., Santaella, M., Martínez, C., Periago, M.J., Gil, F., Blanco, A., y López Albors, O. (2010). Muscle tissue structural changes and texture development in sea bream, *Sparus aurata* L., during post-mortem storage. *LWT - Food Science and Technology* 43, 465-475.

B

- Bagni, M., Civitareale, C., Priori, A., Ballerini, A., Finioia, M., Brambilla, G., y Marino, G. (2007). Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 263, 52-60.
- Bahuaud, D., Morkore, T., Langsrud, O., Sinnes, K., Veiseth, E., Ofstad, R., y Thomassen, M.S. (2008). Effects of -1.5°C super-chilling on quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) pre-rigor fillets: cathepsin activity, muscle histology, texture and liquid leakage. *Food Chemistry* 111, 329-339.
- Barlow, S. (2000). Fish meal and fish oil: sustainable feed ingredients for aquafeeds. *The Global Aquaculture Advocate* 3, 85-88.
- Barroso, M., Careche, M., y Borderias, A.J. (1998). Quality control of frozen fish using rheological techniques. *Trends in Food Science and Technology* 9, 223-229.
- Basu, A., y Marnett, L. (1984). Unequivocal Demonstration that Malonaldehyde is a Mutagen. *Carcinogenesis* 4, 331-333. En Botsoglou, N.A., Fletouris, D.J., Papageorgiou, G.E., Vassilopoulos, V.N., Mantis, A.J., y Trakatellis, A.G. (1994). Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 1931-1937.
- Belitz, H.-D., y Grosch, W. (1997). *Química de los alimentos* (2ª ed., p. 1087). Zaragoza, España: Acribia S.A.
- Belitz, H.D., y Grosch, W. (1999). *Food chemistry* (2ª ed.). Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Bell, J.G., McEvoy, J., Webster, J.L., McGhee, F., Millar, R.M. y Sargent, J.R. (1998). Flesh lipid and carotenoid composition of Scottish farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 119-127.
- Bell, J.G., McEvoy, J., Tocher, D.R., McGhee, F., Campbell, P.J., y Sargent, J.R. (2001). Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *JN The Journal of Nutrition* 131, 1535-1543.
- Bell, J.G., Hendersen, R.J., Tocher, D.R., McGhee, F., Dick, J.R., Porter, A., Smullen, R.P., y Sargent, J.R. (2002). Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *JN The Journal of Nutrition* 132, 222-230.
- Benedito-Palos, L., Navarro, J.C., Bermejo-Nogales, A., Saera-Vila, A., Kaushik, S., y Pérez-Sánchez, J. (2009). The time course of fish oil wash-out follows a simple dilution model in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed graded levels of vegetable oils. *Aquaculture* 288, 98-105.
- Bird, R.P., y Draper, H.H. (1984). Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. En L. Packer (Ed.), *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 299-305). London: Academic Press.
- Bjerkeng, B., Refstie, S., Fjalestad, K.T., Storebakken, T., Rødbotten, M., Roem, A.J. (1997). Quality parameters of the flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as affected by dietary fat content and full-fat soybean meal as a partial substitute for fish meal in the diet. *Aquaculture* 157, 297-309.

- Bjerkeng, B., Hatlen, B., y Wathne, E. (1999). Deposition of astaxanthin in fillets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with herring, capelin, sandeel, or Peruvian high PUFA oils. *Aquaculture* 180, 307-319.
- Bjerkeng, B., Peisker, M., von Schwartzberg, K., Ytrestøyl, T., y Åsgård, T. (2007). Digestibility and muscle retention of astaxanthin in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with the red yeast *Phaffia rhodozyma* in comparison with synthetic formulated astaxanthin. *Aquaculture* 269, 476-489.
- Børresen, T. (1992). Quality aspects of wild and reared fish. En: H.H. Huss, M. Jacobsen M., y J. Liston (Eds.), *Quality assurance in the fish industry* (pp. 1-17). London, UK: Elsevier.
- Botsoglou, N.A., Fletouris, D.J., Papageorgiou, G.E., Vassilopoulos, V.N., Mantis, A.J., y Trakatellis, A.G. (1994). Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 1931-1937.
- Botsoglou, N.A., Christaki, E., Fletouris, D.J., Florou-Paneri, P., y Spais, A.B. (2002). The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. *Meat Science* 62, 259-265.
- Botsoglou, N.A., Grigoropoulou, S.H., Botsoglou, E., Govaris, A., y Papageorgiou, G. (2003). The effects of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. *Meat Science* 65, 1193-1200.
- Botta, J. R. (1995). Evaluation of seafood freshness quality. New York: VCH Publishers Inc.
- Bourne, M.C. (1978). Texture Profile Analysis. *Food Technology* 32 (7), 62-66, 72.
- Braekkan, O.R. (1976). Den emæringsmessige betydning av fisk. *Fiskets Gang* 35. En: H.H. Huss (Ed.), *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO Fisheries Technical Paper No. 348. FAO, Rome, Italy.
- Bremner, A. (1985). A conveniente easy-to-use system for estimating the quality of chilled seafood. En D.N. Scott, y C. Summers (Eds.), *Proceedings of the fish processing conference* (pp. 59-703). Nelson, New Zealand: Fish Processing Bulletin 7, 23-25 April 1985. En Hyldig, G., Bremner, A., Martinsdóttir, E., y Schelvis, R. (2007). Quality Index Methods. En L.M.L. Nollet (Ed.), *Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality*. Published Online: Wiley-Online Library.
- Bremner, H. A., y Sakaguchi, M. (2000). A critical look at whether 'freshness' can be determined. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 9, 5-25.
- Bremner, H.A. (2000). Toward practical definitions of quality for food science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40, 83-90.
- Britton, G. (1995a). UV/Visible spectroscopy. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen, y H. Pfander (Eds.), *Carotenoids* (Vol. 1B: Spectroscopy, pp. 13-62). Basel, Boston: Birkhäuser Verlag.
- Britton, G. (1995b). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal* 9, 1551-1558.
- Brodtkorb, B.T., Rosenlund, G., y Lie, Ø. (1997). Effects of dietary levels of 20:5n-3 and 22:6n-3 on tissue lipid composition in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*, with emphasis on brain and eye. *Aquaculture Nutrition* 3, 175-187.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253.

C

Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., Dincer, T., y 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.

Campos, C.A., Rodríguez, O., Losada, V., Aubourg, S.P., y Barros-Velázquez, J. (2005). Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*Sardina pilchardus*). *International Journal of Food Microbiology* 103, 121-130.

Castro, P., Penedo Padrón, J.C., Caballero Cansino, M.J., Sanjuán Velázquez, E., y Millán De Larriva, R. (2006). Total volatile base nitrogen and its use to assess freshness in European sea bass stored in ice. *Food Control* 17, 245-248.

Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W., y Faustman, C. (2005). Changes of pigments and color in sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) muscle during iced storage. *Food Chemistry* 93, 607–617.

Chytiri, S., Chouliara, I., Savvaidis, I.N., y Kontominas, M.G. (2004). Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. *Food Microbiology* 21, 157-165.

Connell, J.J., 1995. *Control of fish quality* (4^a ed.). London: Fishing News Books Limited.

Conway, W.J. (1962). *Microdifusion analysis and volumetric error*. London: Crosby Lockwood. En: H.H. Huss (Ed.), *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO Fisheries Technical Paper No. 348. FAO, Rome, Italy.

Craig, S.R., MacKenzie, D.S., Jones, G., y Gatlin III, D.M. (2000). Seasonal changes in the reproductive condition and body composition of free-ranging red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* 190, 89-102.

D

Dal Bosco, A., Castellini, C., Bianchi, L., y Mugnai, C. (2004). Effect of dietary α -linolenic acid and vitamin E on the fatty acid composition, storage stability and sensory traits of rabbit meat. *Meat Science* 66, 407-413.

Dalgaard, P. (1995). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology* 26, 319-333.

Delbarre-Ladrat, C., Chéret, R., Taylor, R., y Verrez-Bagnis, V. (2006). Trends in post-mortem aging in fish: understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. *Critical reviews in food science and nutrition* 46, 409-421.

De Silva, S.S, y Anderson, T.A. (1995). *Fish nutrition in aquaculture* (p. 319). London, UK: Chapman & Hall.

Dosanjh, B.S., Higgs, D.A., McKenzie, D.J., Randall, D.J., Eales J.G., Rowshandeli, N., Rowshandeli, M., y Deacon, G. (1998). Influence of dietary blends of menhaden oil and

canola oil on growth, muscle lipid composition, and thyroidal status of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in sea water. *Fish Physiology and Biochemistry* 2, 123-134.

Durnford, E., y Shahidi, F. (1998). Flavour of fish meat. En F. Shahidi (Ed.), *Flavor of meat, meat products and seafood* (2ª ed, pp. 130-158). London, UK: Blackie Academic and Professional.

E

Eifert, J.D., Hackney, C.R., Libey, G.S., y Flick, Jr., G.J. (1992). Aquacultured hybrid striped bass fillet quality resulting from post-harvest cooling or CO₂ treatments. *Journal of Food Science* 57, 1009-1102.

Eikelenboom, G., Hoving-Bolink, A.H., Kluitman, I., Houben, J.H., y Klont, R.E. (2000). Effect of dietary vitamin E supplementation on beef colour stability. *Meat Science* 54, 17-22.

Einen, O., y Thomassen, M.S. (1998). Starvation prior to slaughter in Atlantic salmon (*Salmo salar*) I. Effects on weight loss, body shape, slaughter- and fillet-yield, proximate and fatty acid composition. *Aquaculture* 166, 85-104.

Einen, O., y Thomassen, M.S. (1998). Starvation prior to slaughter in Atlantic salmon (*Salmo salar*) II. White muscle composition and evaluation of freshness, texture and colour characteristics in raw and cooked fillets. *Aquaculture* 169, 37-53.

Erikson, U., Sigholt, T., y Seland, A. (1997). Handling stress and water quality during live transportation and slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 149, 243-252.

Espe, M., Ruohonen, K., Bjørnevik, M., Frøylanda, L., Nortvedt, R., y Kiessling, A. (2004). Interactions between ice storage time, collagen composition, gaping and textural properties in farmed salmon muscle harvested at different times of the year. *Aquaculture* 240, 489-504.

F

Fauconneau, B., Alami-Durante, H., Laroche, M., Marcel, J., y Vallot, D. (1995). Growth and meat quality relations in carp. *Aquaculture* 129, 265-297.

Fennema, O. R. (1993). *Química de los alimentos*. Zaragoza, Spain: Acribia S.A.

Fernández, J., Pérez-Álvarez, J.A., y Fernández-López, J.A. (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry* 59, 345-353.

Fernández Souto, B. y Rodríguez Villanueva, X.L. (2002). *Guía de la piscicultura Europea*. Xunta de Galicia, Consellería de pesca e asuntos marítimos.

Ferreira-Pinto, J., Nunes, M.L., y Cardoso, C. (2007). Feeding interruption and quality of cultured gilthead sea bream. *Food Chemistry* 100, 1504-1510.

Figueiredo-Garutti, M.L., Navarro, I., Capilla, E., Souza, R.H.S., Moraes, G., Gutiérrez, J., y Vicentini-Paulino, M.L.M. (2002). Metabolic changes in *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae) during post-feeding and fasting. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 132, 467-476.

- Flos, R., Reig, L., Oca, J., y Ginovart, M. (2002). Influence of marketing and different land-based systems on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) quality. *Aquaculture International* 10, 189-206.
- Foegeding E.A., Lanier T.C., y Hultin H.O. (1996). Characteristics of edible muscle tissues. En: O.R. Fennema (Ed.), *Food Chemistry* (3ª ed., pp. 879–942). New York, USA: Marcel Dekker Inc.
- Foley, J.D., van Dam, A., y Hughes, J.F. (2000). Achromatic and colored light, *Computer Graphics Principles and Practice*, 2nd edition. Addison-Wesley, Boston, pp. 563–604.
- Fountoulaki, E., Vasilaki, A., Hurtado, R., Grigorakis, K., Karacostas, I., Nengas, I., Rigos, G., Kotzamanis, Y., Venos, B., y Alexis, M.N. (2009). Fish oil substitution by vegetable oils in commercial diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.); effects on growth performance, flesh quality and fillet fatty acid profile. Recovery of fatty acid profiles by a fish oil finishing diet under fluctuating water temperatures. *Aquaculture* 289, 317-326.
- Frankel, E.N., Huang, S., Aeschbach, R., y Prior, E. (1996). Antioxidant activity of Rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 131-135.
- Frankel, E. N. (1998). Antioxidants. En *Lipid oxidation* (1ª ed.). Dundee, Scotland: The Oily Press.
- Fraser, O., y Sumar, S. (1998). Compositional changes and spoilage in fish – an introduction. *Nutrition & Food Science* 5, 275-279.
- Fraser, O.P., y Sumar, S. (1998). Compositional changes and spoilage in fish (part II) parte II – microbiological induced deterioration. *Nutrition and Food Science* 6, 325-329.
- Fondo de Regulación y Organización del Mercado de los productos de la pesca y cultivos marinos (FROM, 2011). *Hábitos de consumo y compra de los productos pesqueros en la población española*. España: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
- Fuentes, A., Fernández-Segovia, I., Serra, J.A., y Barat, J.M. (2010). Comparison of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) quality. *Food Chemistry* 119, 1514-1518.

G

- Gatlin III, D., Barrows, F., Bellis, D., Brown, P., Campen, J., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E.M., Hu, G., Krogdahl, A., Nelson, R., Overturf, K.E., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., y Wilson, R.F. (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research* 38, 551-579.
- Georgantelis, D., Blekas, G., Katikou, P., Ambrosiadis, I., y Fletouris, D. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on lipid oxidation and colour stability during frozen storage of beef burgers. *Meat Science* 75, 256-264.
- Giannakourou, M.C., Koutsoumanis, K., Nychas, G.J.E., y Taoukis, P.S. (2005). Field evaluation of the application of time temperature integrators for monitoring fish quality in the chill chain. *International Journal of Food Microbiology* 102, 323- 336.

- Gill, T.A., Thompson, J.W., Gould, S., y Sherwood, D. (1987). Characterization of quality deterioration in yellowfin tuna. *Journal of Food Science* 52, 580-583. En: H.H. Huss (Ed.), *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO Fisheries Technical Paper No. 348. FAO, Rome, Italy.
- Gil, A. (2010). Pescados y mariscos. En *Tratado de Nutrición* (2ª ed., Tomo II). Madrid, España: Editorial Medica Panamericana.
- Ginés, R., Valdimarsdottir, T., Sveinsdottir, K., y Thorarensen, H. (2004). Effects of rearing temperature and strain on sensory characteristics, texture, colour and fat of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Food Quality and Preference* 15, 177-185.
- Gökçe, M.A., Taşbozan, O., Çelik, M., y Tabakoğlu, Ş.S. (2004). Seasonal variations in proximate and fatty acid compositions of female common sole (*Solea solea*). *Food Chemistry* 88, 419-423.
- Gomes, E., Dias, J., Silva, P., Valente, L., Empis, J., Gouveia, L., Bowen, J., y Young, A. (2002). Utilization of natural and synthetic sources of carotenoids in the skin pigmentation of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *European Food Research and Technology* 214, 287-293.
- González-Fandos, E., García-Linares, M.C., Villarino-Rodríguez, A., García-Arias, M.T., y García-Fernández, M.C. (2004). Evaluation of the microbiological safety and sensory quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processed by the sous vide method. *Food Microbiology* 21, 193-201.
- Gordon, M.H. (2001). The development of oxidative rancidity in foods. En J. Pokorny, N. Yanishlieva, y M. Gordon (Eds.), *Antioxidants in foods-Practical Applications* (p. 288). Cambridge, England: CRC Press, Woodhead Publishing Limited.
- Goulas, A.E., y Kontominas, M.G. (2007). Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry* 100, 287-296.
- Gouveia, L., Choubert, G., Pereira, N., Santinha, J., Empis, J., y Gomes, E. (2002). Pigmentation of gilthead seabream, *Sparus aurata* (L.1875), using *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Volvocales) microalga. *Aquaculture Research* 33, 987-993. □
- Glencross, B.D., Hawkins, W.E., y Curnow, J.G. (2003). Evaluation of canola oils as alternative lipid resources in diets for juvenile red seabream, *Pagrus auratus*. *Aquaculture Nutrition* 9, 305-315.
- Gram, L. (1990). Spoilage of three Senegalese fish species stored in ice and at ambient temperature. Paper presented at SEAFOOD 2000 in Halifax, Canada, 12-16 May 1990. En: H.H. Huss (Ed.), *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO Fisheries Technical Paper No. 348. FAO, Rome, Italy.
- Gram, L., y Huss, H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 121-137.
- Gram, L., y Daalgard, P. (2002). Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 262-266.
- Grigorakis, K., Alexis, M.N., Taylor, K.D.A., y Hole, M. (2002). Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*); composition, appearance and seasonal variations. *International Journal of Food Science and Technology* 37, 477-484.

- Grigorakis, K., Taylor, K.D.A., y Alexis, M.N. (2003a). Organoleptic and volatile aroma compounds comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*): sensory differences and possible chemical basis. *Aquaculture* 225, 109-119.
- Grigorakis, K., Taylor, K.D.A., y Alexis, M.N. (2003b). Seasonal patterns of spoilage of ice-stored cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chemistry* 81, 263-268.
- Grigorakis, K., Alexis, M., Gialamas, I., y Nikolopoulou, D. (2004). Sensory, microbiological, and chemical spoilage of cultured common sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice: a seasonal differentiation. *European Food Research and Technology* 219, 584-587.
- Grigorakis, K., y Alexis, M.N. (2005). Effects of fasting on the meat quality and fat deposition of commercial-size farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed different dietary regimes. *Aquaculture Nutrition* 11, 341-344.
- Grigorakis, K. (2007). Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture* 272, 55-75.
- Gruszecki, W.I., y Strzayka, K. (2005). Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 1740, 108-115.
- Guillou, A., Soucy, P., Khalil, M., y Adambounou, L. (1995). Effects of dietary vegetable and marine lipid on growth, muscle fatty acid composition and organoleptic quality of flesh of brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture* 136, 351-362.

H

- Haard, N.F. (1992). Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Research International* 25, 289-307.
- Halász, A., Baráth, A., Simon-Sarkadi, L., y Holzapfel, W. (1994). Biogenic amine and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology* 5, 42-49.
- Hamm, R. (1972). *Kolloidchemie des Fleisches*. Parey, Berlin. En Hamm, R. (1986). Functional properties of the myofibrillar system and their measurements. En P.J. Bechtel (Ed.), *Muscle as food*. Orlando, EEUU: Academic Press.
- Hamm, R. (1975). En D.J.A. Cole y R.A. Lawrie (Eds.), *Meat* (p. 321). Butterworth, London. En Hamm, R. (1986). Functional properties of the myofibrillar system and their measurements. En P.J. Bechtel (Ed.), *Muscle as food*. Orlando, EEUU: Academic Press.
- Hamm, R. (1986). Functional properties of the myofibrillar system and their measurements. En P.J. Bechtel (Ed.), *Muscle as food*. Orlando, EEUU: Academic Press.
- Hamre, K., Lie, Ø., y Sandnes, K. (2003). Seasonal development of nutrient composition, lipid oxidation and colour of fillets from Norwegian spring-spawning herring (*Clupea harengus* L.). *Food Chemistry* 82, 441-446.
- Handeland, S.O., Imsland, A.K., y Stefansson, S.O. (2008). The effect of temperature and fish size on growth, feed intake, food conversion efficiency and stomach evacuation rate of Atlantic salmon post-smolts. *Aquaculture* 283, 36-42.

- Hansen y col., 1996 es de Food Research International, buscar (creo que en Olsson 2003)
- Hansen, L.T, Gill, T., Røntved, S.D., y Huss, H.H. (1996). Importance of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon. *Food Research International* 29(2), 181-188.
- Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V., y Gelman, A. (2003). Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *Journal of Food Protection* 66, 410-417.
- Harris, P., y Tall, J. (1994). Rancidity in fish. En J. Allen, y R. Hamilton (Eds.), *Rancidity in foods* (pp. 256–272). London, UK: Chapman & Hall.
- Hebard, C. E., Flick, G. J., y Martin, R. E. (1982). Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shellfish. En R. E. Martin, G.J. Flick, C.E. Hebard, y D.R. Ward (Eds.), *Chemistry and biochemistry of marine food products* (pp. 149–304). Westport, CT, EEUU: Avi. En Gram, L., y Huss, H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 121-137.
- Heikkinen, J., Vielma, J., Kemiläinen, O., Tirola, M., Eskelinen, P., Kiuru, T., Navia-Paldanius, D., y Wright, A. (2006). Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 261, 259-265.
- Henmi, H., Hata, M., y Hata, M. (1990). Studies on the carotenoids in the muscle of salmon. III. Combination of astaxanthin and canthaxanthin with fish muscle actomyosins associated with their surface hydrophobicity. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 56, 1821-1823.
- Hsieh, R. J., & Kinsella, J. E. (1989). Oxidation of polyunsaturated fatty acids: Mechanisms, products and inhibition with emphasis on fish. *Advances in Food and Nutrition Research*, 33, 233-241.
- Houben, J.H., van Dijkstra, A., Eikelenboom, G., y Hoving-Bolink, A.H. (2000). Effect of dietary vitamin E supplementation, fat level and packaging on colour stability and lipid oxidation in minced beef. *Meat Science* 55, 331-336.
- Hoving-Bolink, A.H., Eikelenboom, G., van Diepen, J.Th.M., y Jongbloed, A.W., y Houben, J.H. (1998). Effect of dietary vitamin E supplementation on pork quality. *Meat Science* 49, 205-212.
- Howgate, P., Johnston, A., y Whittle, K.J. (1992). *Multilingual guide to EC freshness grades for fishery products*. Torry Research Station. Aberdeen, Escocia.
- Hoyland, D.V., y Taylor, A.J. (1991). A review of the methodology of the 2-thiobarbituric acid test. *Food Chemistry*, 40, 271–291.
- Huidobro, A., Pastor, A., y Tejada, M. (2000). Quality index method developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *JFS: Sensory and Nutritive Qualities of Food* 65, 1202-1205.
- Hunter, R.S., y Harold, R.W. (1987). Instruments for the Chromatic Attributes of Object Appearance. En *The measurement of appearance* (2ª ed., pp. 296-302) New York: Wiley.

- Huss, H.H. (1976). Konsumfisk-biologi, teknologi, kvalitet og holdbarhed. Dansk Veterinary Tidsskrift 59, 165-175. En: H.H. Huss (Ed.), *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO Fisheries Technical Paper No. 348. FAO, Rome, Italy.
- Huss, H.H. (1995). *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO Fisheries Technical Paper, No. 348. FAO, Rome, Italy.
- Hyldig, G., y Green-Petersen, D.M.B. (2004). Quality Index Method—An objective tool for determination of sensory quality. *Aquatic Food Product Technology* 13, 71-80.
- Hyldig, G., Bremner, A., Martinsdóttir, E., y Schelvis, R. (2007). Quality Index Methods. En L.M.L. Nollet (Ed.), *Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality*. Published Online: Willey-Online Library.
- I**
- Ibáñez, F.C., y Barcina, Y. (2001). *Análisis sensorial de los alimentos. Métodos y aplicaciones*. Barcelona: Springer-Verlag Ibérica.
- Ibáñez, E., Cifuentes, A., Crego, A.L., Señoráns, F.J., Cavero, S., y Reglero, G. (2000). Combined use of supercritical fluid extraction, micellar electrokinetic chromatography, and reverse phase high performance liquid chromatography for the análisis of antioxidants from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 4060-4065.
- Ibáñez, E., Kubátová, A., Crego, A.L., Señoráns, F.J., Cavero, S., Reglero, G., y Hawthorne, S.B. (2003). Subcritical water extraction of antioxidants compounds from Rosemary plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 375-382.
- Instituto Nacional del Consumo (INC). *Las tendencias del consumo y del consumidor en el siglo XXI*. España: Ministerio de Sanidad y Consumo.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1986. Sampling plans for fish and shellfish. In: ICMSF, *Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications*, 2nd Edition, Vol. 2. University of Toronto Press, Toronto, Canada, pp. 181-196.
- International Commission on Illumination (CIE, 1978). Recommendations on uniform color spaces, color difference equations, psychometric color terms. Supplement No 2 to CIE Publication No 15, Colorimetry, Bureau Central de la CIE, Paris.
- Internacional Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL, 1999). <http://www.issfal.org/statements/pufa-recommendations>.
- Isdell, E., Allen, P., Doherty, A., y Butler, F. (2003). Effect of packaging cycle on the colour stability of six beef muscles stored in a modified atmosphere mother pack system with oxygen scavengers. *International Journal of Food Science and Technology* 38(5), 623-632.
- Izquierdo, M.S., Obach, A., Arantzamendi, L., Montero, D., Robaina, L., y Rosenlund, G. (2003). Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquaculture Nutrition* 9, 397-407.

- Izquierdo, M.S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J., Rosenlund, G., y Ginés, R. (2005). Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture* 250, 431-444.
- Izquierdo-Pulido, M.L., Hatae, K., y Haard, N.F. (1992). Nucleotide catabolism and changes in texture indices during ice storage of cultured sturgeon *Acipenser transmontanus*. *Journal of Food Biochemistry* 16, 173-192.

J

- Jellinek, G. (1985). *Sensory Evaluation of Food-Theory and Practice*. En Ellis Horwood, Ltd. (Ed.). Chichester, England.
- Jeyasekaran, G., Ganesan, P., Jeya Shakila, R., Maheswari, K., y Sukumar, D. (2004). Dry ice as a novel chilling medium along with water ice for short-term preservation of fish Emperor breams, lehrinus (*Lethrinus miniatus*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5, 485-493.
- Jiang, S.T. (2000). Effect of proteinases on the meat texture and seafood quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2, 55-74.
- Jiménez, I., y Speisky, H. (2000). Radicales libres y antioxidantes en la prevención de enfermedades: (II) Mecanismos de defensa antioxidante. *Revista Chilena de Nutrición* 27, 210-219.
- Jonsdottir, S. (1992). Quality index method and TQM system. En R. Olafsson y A.H. Ingthorsson (Eds.), *Quality issues in the fish Industry*. Islandia: The Research Liaison Office, University of Iceland. En: H.H. Huss (Ed.), *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO Fisheries Technical Paper No. 348. FAO, Rome, Italy.

K

- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Heikki, J.V., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., y Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 7, 3954-3962.
- Kamal-Eldin, A. (2006). Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 58, 1051-1061
- Kanner, J., y Rosenthal, I. (1992). An assessment of lipid oxidation in foods – Technical Report. *Pure and Applied Chemistry* 64, 1959-1964.
- Kawai, T. (1996). Fish flavor. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 257-298.
- Kiessling, A., Espe, M., Ruohonen, K., y Mørkøre, T. (2004). Texture, gaping and colour of fresh and frozen Atlantic salmon flesh as affected by pre-slaughter iso-eugenol or CO₂ anaesthesia. *Aquaculture* 236, 645-657.
- Kilinc, B., Cakli, S., Cadun, A., Dincer, T., y Tolasa, S. (2007). Comparison of effects of slurry ice and flake ice pretreatments on the quality of aquacultured sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored at 4°C. *Food Chemistry* 104, 1611-1617.

- Knowles, T.G., Brown, S.N., Warriss, P.D., Lines, J., Tinarwo, A., Bravo, A., Carvalho, H., y Gonçalves, A. (2007). Effect of electrical stunning at slaughter on the carcass, flesh and eating quality of farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Research* 38, 1732-1741.
- Kostaki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, N.I., y Kontominas, M.G. (2009). Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiology* 26, 475-482.
- Kosugi, H., Kato, T., y Kikugawa, K. (1988). Formation of red pigment by a two step 2-thiobarbituric acid reaction of alka-2,4-dienals. Potential products of lipidoxidation. *Lipids* 23, 1024-1031.
- Kris-Etherton, P.M., Grieger, J.A., y Etherton, T.D. (2009). Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 81, 99-104.
- Kyrana, V.R., Lougovois, V.P., y Valsamis, D.S. (1997). Assessment of shelf-life of maricultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology* 32, 339-347.
- Kyrana, V.R., y Lougovois, V.P. (2002). Sensory, chemical, microbiological assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. *International Journal of Food Science and Technology* 37, 319-328.

L

- Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noël, J., y Fleurence, J. (2003). In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects of cathepsins B, D and L. *Food Chemistry* 81, 517-525.
- Lakshmanan, R., Parkinson, J.A., y Piggott, J. (2007). High-pressure processing and water-holding capacity of fresh and cold-smoked salmon (*Salmo salar*). *LWT - Food Science and Technology* 40, 544-551.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., y Nychas, G.-J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91, 453-462.
- Lee, S.-M., Hwang, U.-G., y Cho, S.C. (2000). Effects of feeding frequency and dietary moisture content on growth, body composition and gastric evacuation of juvenile Korean rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Aquaculture* 187, 399-409.
- Leisner, J.J., y Gram, L. (1999). Spoilage of fish. En R.K. Robinson, C.A. Batt, y P.D. Patel (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 813-820). San Diego: Academic Press.
- Leroi, F. (2011). Cambios en el pescado desde la captura y la producción acuícola a la mesa. Cambios microbiológicos relacionados con la calidad y la vida útil de los productos del mar. En curso avanzado *Evaluación de la calidad y seguridad del pescado y de los productos de la pesca (17-21 octubre 2011)*. Derio, Bilbao, España.
- Lie, Ø. (2001). Flesh quality – the role of nutrition. *Aquaculture Research* 32, 341-348.

- Lougovois, V.P., Kyranas, E.R., Kyranas, V.R., (2003). Comparasion of selected methods of assessing freshness quality and remaining storage life of iced gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Research International* 36, 551-560.
- Lowe, T.E., Ryder, J.M., Carragher, J.F. y Wells, R.M.G. (1993). Flesh quality in snapper, *Pagrus auratus*, affected by captura stress. *Journal of Food Science* 58, 770-773.
- Lozano Soldevilla, G. (2005). Características biológicas de las especies *Dicentrarchus labrax* (lubina) y *Sparus aurata* (dorada). En *Acuicultura marina mediterránea* (pp. 8-11). Madrid, España: Fundación Alfonso Martín Escudero.
- M**
- Macagnano, A., Careche, M., Herrero, A., Paolesse, R., Martinelli, E., Pennazza, G., Carmona, P., D'Amico, A., y Di Natale, C. (2005). A model to predict fish quality from instrumental features. *Sensors and Actuators B* 111-112, 293-298.
- Madrid, A., Vicente, J.M., y Madrid, R. (1999). *El pescado y sus productos derivados*. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa.
- Mahmoud, B.S.M., Yamazaki, K., Miyashita, K., Shin, II., y Suzuki, T. (2006). A new technology for fish preservation by combined treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds. *Food Chemistry* 99, 656-662.
- Martinsdóttir, E., Sveinsdóttir, K., Lutén, J., Schelvis-Smit, R., y Hyldig, G. (2001, 2004). Sensory evaluation of fish freshness. A reference manual for the fish industry. QIM-Eurofish. Disponible en www.qim-eurofish.com.
- Matos, E., Gonçalves, A., Nunes, M.L., Dinis, M.T., y Dias, J. (2010). Effect of harvesting stress and slaughter conditions on selected flesh quality criteria of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 305, 66-72.
- Mancini, R.A., y Hunt, M.C. (2005). Current research in meat colour. *Meat Science* 71(1), 100-121.
- Méndez, E., y González, R.M. (1997). Seasonal changes in the chemical and lipid composition of filltes of the Southwest Atlantic hake (*Merluccius hubbsi*). *Food Chemistry* 59, 213-217.
- Menoyo, D., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Ginés, R., Lopez-Bote, C.J., y Bautista, J.M. (2004). Adaptation of lipid metabolism, tissue composition and flesh quality in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to the replacement of dietary fish oil by linseed and soyabean oils. *British Journal of Nutrition* 92, 41-52.
- Metón, I., Fernández, F., y Baanante, I.V. (2003). Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glicólisis-gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 225, 99-107.
- Mnari, A., Bouhlel, I., Chraief, I., Hammami, M., Romdhane, M.S., El Cafsi, M., y Chaouch, A. (2007). Fatty acids in muscles and liver of Tunisian wild and farmed gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Food Chemistry* 100, 1393-1397.
- Moeseke, W.V., y De Smet, S. (1999). Effect of time of deboning and sample size on drip loss of pork. *Meat Science* 52, 151-156.

- Mohr, V. (1987). Control of nutritional and sensory quality of cultured fish. En D. Kramer, y J. Liston (Eds.), *Seafood quality determination* (pp. 487-496). Amsterdam: Elsevier.
- Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J., Ginés, R., y Izquierdo, M.S. (2005). Growth, feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils: A time-course study on the effect of a re-feeding period with a 100% fish oil diet. *Aquaculture* 248, 121-134.
- Mørkøre, T., Netteberg, C., Johnsson, L., y Pickova, J. (2007). Impact of dietary oil source on product quality of farmed Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture* 267, 236-247.
- Mourente, G., Good, J., y Bell, J.G. (2005). Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E2 and E2a immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquaculture Nutrition* 11, 25-40.
- Moustard, J. (1957). Laerebog i Husdyrenes Fysiologi os Ernceringsfysiologi, A/S C.Fr. Mortensen, Copenhagen (In Danish). En: H.H. Huss (Ed.), *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO Fisheries Technical Paper No. 348. FAO, Rome, Italy.

N

- Nakayama, T., Liu, D.-J., y Ooi, A. (1992). Tension change of stressed and unstressed carp muscles in isometric rigor contraction and resolution. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58 (8), 1517-1522.
- Nakayama, T., Tyoda, y T., Ooi, A. (1994). Physical property of carp muscle during rigor tension generation. *Fisheries Science* 60 (6), 717-721.
- Nam, K.T., Lee, H.A., Min, B.S., y C. W. (1997). Influence of dietary supplementation with linseed and vitamin E on fatty acids, α -tocopherol and lipid peroxidation in muscles of broiler chicks. *Animal Feed Science Technology* 66, 149-158.
- Nasopoulou, C., y Zabetakis, I. (2012). Benefits of fish oil replacement by plant originated oils in compounded fish feeds. A review. *LWT - Food Science and Technology* 47, 217-224.
- Ng, W.-K., Wang, Y., Ketchimenin, P., y Yuen, K.-H. (2004). Replacement of dietary fish oil with palm fatty acid distillate elevates tocopherol and tocotrienol concentrations and increases oxidative stability in the muscle of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* 233, 423-437.
- Ng, W.-K., Tocher, D. R., y Bell, J. G. (2007). The use of palm oil in aquaculture feeds for salmonid species. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 394-399.
- Ng, W.-K., y Bahurmiz, O.M. (2009). The impact of dietary oil source and frozen storage on the physical, Chemicals and sensorial quality of fillets from market-size red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp. *Food Chemistry* 113, 1041-1048.
- Nieto, G., Díaz, P., Bañón, S., y Garrido, M.D. (2010). Dietary administration of ewe diets with a distillate from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.): Influence on lamb meat quality. *Meat Science* 84, 23-29.
- Nieto, G., Díaz, P., Bañón, S., y Garrido, M.D. (2010). Effect on lamb meat quality of including thyme (*Thymus zygis* ssp. *gracilis*) leaves in ewes' diet. *Meat Science* 85, 82-88.

Nikolopoulou, D., Moutou, K.A., Fountoulaki, E., Venou, B., Adamidou, S., y Alexis, M.N. (2011). Patterns of gastric evacuation, digesta characteristics and pH changes along the gastrointestinal tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 158, 406-414.

O

Oehlenschläger, J. (2011). Cambios en el pescado desde la captura y la producción acuícola a la mesa. Del estado fresco al alterado. En curso avanzado *Evaluación de la calidad y seguridad del pescado y de los productos de la pesca (17-21 octubre 2011)*. Derio, Bilbao, España.

Ogata, H., Aranishi, F., Hara, K., Osatomi, K., y Ishihara, T. (1998). Proteolytic degradation of myofibrillar components by carp cathepsin L. *Journal of the Science of Food Agriculture* 76:499-504.

Ofstad, R., Egelanddal, B., Kidman, S., Myklebust, R., Olsen, R. L., y Hermansson, A. M. (1996). Liquid loss as effected by post mortem ultrastructural changes in fish muscle: cod (*Gadus morhua* L) and salmon (*Salmo salar*). *Journal of the Science of Food Agriculture* 71, 301-312.

O'Grady, M.N., Maher, M., Troy, D.J., Moloney, A.P., y Kerry, J.P. (2006). An assessment of dietary supplementation with tea catechins and rosemary extract on the quality of fresh beef. *Meat Science* 73, 132-143.

Olafsdottir, G., Martinsdottir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., Mackie, I., Henehan, G., y Nielsen, H. (1997). Multisensors for fish quality determination. *Trends in Food Science and Technology* 8, 258-265.

Olafsdottir, G., Nesvadba, P., Natale, C.D., Careche, M., Oehlenschläger, J., Tryggvadóttir, S.V., Schubring, R., Kroeger, M., Heia, K., Esaiassen, M., Macagnano, A., y Jørgenseng, B. M. (2004). Multisensor for fish quality determination. *Trends in Food Science and Technology* 15, 86-93.

Olsson, G.B., Ofstad, R., Lødemel, J.B., y Olsen, R.L. (2003a). Changes in water-holding capacity of halibut muscle during cold storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 36, 771-778.

Olsson, G.B., Olsen, R.L., y Ofstad, R. (2003 b). Post-mortem structural characteristics and water-holding capacity in Atlantic halibut muscle. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 36, 125-133.

Olsson, G.B., Olsen, R.L., Carlehög, M., y Ofstad, R. (2003c). Seasonal variations in chemical and sensory characteristics of farmed and wild Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 217, 191-205.

Okuma, H., Takahashi, H., Yazawa, S., y Sekimukai, S. (1992). Development of system with double enzyme reactors for the determination of fish freshness. *Analytica Chimica Acta* 93.

Orban, E., Sinesio, F., Paoletti, F., Nicoli, S., Casini, I., Caproni, R., y Moneta, E. (1996). Nutritional and organoleptic characteristics of aquacultured sea bream (*Sparus aurata*):

- influence of different culturing techniques on fish quality. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione* 25, 27-36.
- Orban, E., Sinesio, F., y Paoletti, F. (1997). The functional properties of the proteins, texture and the sensory characteristics of frozen sea bream fillets (*Sparus aurata*) from different farming systems. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 30, 214-217.
- Orban, E., Di Lena, G., Ricelli, F., Paoletti, F., Casini, I., Gambelli, L., y Caproni, R. (2000). Quality characteristics of sharpnose sea bream (*Diplodus puntazzo*) from different intensive rearing systems. *Food Chemistry* 70, 27-32.
- O. 2/8/1991, B.O.E 15/8/91: Orden de 2/8/1991, publicada en el Boletín Oficial del Estado el 15/8/91.
- Ordóñez Pereda, J.A. (1998). Características generales del pescado. En *Tecnología de los alimentos* (1ª ed, Vol.II). Vallehermoso, Madrid: Editorial Síntesis.
- Ortega, A. (2008). En J. Espinosa de los Monteros (Ed.), *Cuadernos de Acuicultura 1. Cultivo de dorada (Sparus aurata)*. Madrid, España.
- Ortiz, J., Larraín, A., Vivanco, J.P., y Aubourg, S.P. (2009). Rancidity development during the frozen storage of farmed coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): Effect of antioxidant composition supplied in the diet. *Food Chemistry* 115, 143-148.
- Ottera, H., Roth, B., y Torrissen, O.J. (2001). Do killing methods affect the quality of Atlantic Salmon?. En: S.C. Kestin, y P.D. Warriss (Eds.), *Farmed Fish Quality* (pp. 398-399). Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.
- Özogul, F., Polat, Y., y Özogul, Y. (2004). The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry* 85, 49-57.
- Özogul, Y., Özogul, F., Kuley, E., Özkutuk, A.S., Gökbulut, C., y Köse, S. (2006). Biochemical, sensory and microbiological attributes of wild turbot (*Scophthalmus maximus*), from the Black Sea, during chilled storage. *Food Chemistry* 99, 752-758.
- Özogul, F., Kuley, E., y Özogul, Y. (2007). Sensory, chemical and microbiological quality parameters in sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice or wrapped in cling film or in aluminium foil at $2 \pm 1^\circ\text{C}$. *International Journal of Food Science and Technology* 42, 903-909.
- Özogul, F., Özogul, Y., y Kuley, E. (2008). Nucleotide degradation and biogenic amine formation of wild white grouper (*Epinephelus aeneus*) stored in ice and at chill temperature (4°C). *Food Chemistry* 108, 933-941.
- Ozyurt, G., Polat, A., y Özkütük, S. (2005). Seasonal changes in the fatty acids of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and white sea bream (*Diplodus sargus*) captured in Iskenderun Bay, eastern Mediterranean coast of Turkey. *European Food Research and Technology* 220, 120-124.
- Ozyurt, G., y Polat, A. (2006). Amino acid and fatty acid composition of wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a seasonal differentiation. *European Food Research and Technology* 222, 316-320.

P

- Pääkkönen, J.-P.J., Myyrä, y Marjomäki, T.J. (1999). The effect of meal size on the rate of gastric evacuation of burbot, *Lota lota* (L.). *Ecology of Freshwater Fish* 8, 19-54.
- Paleologos, E.K., Savvaidis, I.N., y 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 Microbiology* 21, 549-557.
- Papa, I., Taylor, R.G., Astier, C., Ventre, F., Lebart, M.C., Roustan, C., Ouali, A., y Benyamin, Y. (1997). Dystrophin cleavage and sarcolemma detachment are early post mortem changes on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) white muscle. *Journal of Food Science* 62, 917-921.
- Papadopoulos, V., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I.N., y Kontominas, M.G. (2003). Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiology* 20, 411-420.
- Pascual-Anderson, M.R., y Calderón-Pascual, V. (2000). *Microbiología alimentaria. Metodología para alimentos y bebidas* (2ª ed.). Madrid, España: Díaz de Santos S.A.
- Paterson, B., Goodrick, B., y Frost, S. (1997). Controlling the quality of aquacultured food products. *Trends in Food Science and Technology* 8, 253-257.
- Pavlidis, M., Papandroulakis, N., y Divanach, P. (2006). A method for the comparison of chromaticity parameters in fish skin: Preliminary results for coloration pattern of red skin Sparidae. *Aquaculture* 258, 211-219.
- Peng, S., Chen, L., Qin, J.G., Hou, J., Yu, N., Long, Z., Ye, J., y Sun, X. (2008). Effects of replacement of dietary fish oil by soybean oil on growth performance and liver biochemical composition in juvenile black seabream, *Acanthopagrus schlegelii*. *Aquaculture* 276, 154-161.
- Pérez-Llamas, F., López-Jiménez, J.A., Marín, J.F., y Zamora, S. (1998). Características de la grasa de algunos alimentos del grupo de las carnes y su relación con la salud. *Nutrición Hospitalaria* XIII, 95-98.
- Pickova, J., y Mørkøre, T. (2007). Alternate oils in fish feeds. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 256-263.
- Poli y col., 2001 Poli, B.M., Parisi, G., Zampacavallo, G., Mecatti, M., Lupi, P., Gualtieri, M., y Franci, O. (2001). Quality outline of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared in Italy: shelf life, edible yield, nutritional and dietetic traits. *Aquaculture* 202, 303-315.
- Poli, B.M., Parisi, G., Scappini, F., y Zampacavallo, G. (2005). Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture Int.* 13, 29-49.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., y Klein, D.A. (1999). *Microbiología* (4ª ed., pp.128-129). Madrid, España: McGraw-Hill – Interamericana de España.
- Prost, C., Sérot, T., y Demaimay, M. (1998). Identification of the most potent odorants in wild and farmed cooked turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3214-3219.

R

- Raharjo, S., y Sofos, J.N. (1993). Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: A review. *Meat Science* 35, 145-169.
- Rasmussen, R.S., Ostenfeld, T.H., Rønsholdt, B., y McLean, E. (2000). Manipulation of end-product quality of rainbow trout with finishing diets. *Aquaculture Nutrition* 6, 17-23.
- Refstie, S., Landsverk, T., Bakke-McKellep, A.M., Ringø, E., Sundby, A., Shearer, K. D., y Krogdahl, Å. (2006). Digestive capacity, intestinal morphology, and microflora of 1-year and 2-year old Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed standard or bioprocessed soybean meal. *Aquaculture* 261, 269-284.
- Regost, C., Arzel, J., Robin, J., Rosenlund, G., y Kaushik, S.J. (2003). Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*) 1. Growth performance, flesh fatty acid profile, and lipid metabolism. *Aquaculture* 217, 465-482.
- Regost, C., Jakobsen, J.V., y Røra, A.M.B. (2004). Flesh quality of raw and smoked fillets of Atlantic salmon as influenced by dietary oil sources and frozen storage. *Food Research International* 37, 259-271.
- Renaud, S., Morazain, R., Godsey, F., Thevenon, C., Martin, J.L., y Mendy, F. (1986). Nutrients, platelet function and composition in nine groups of French and British farmers. *Atherosclerosis* 60, 37-48.
- Rey, A.I., Hopia, A., Kivikari, R., y Kahkonen, M. (2005). Use of natural food/plant extracts: Cloudberry (*Rubus chamaemorus*), beetroot (*Beta vulgaris* 'Vulgaris') or willow herb (*Epilobium angustifolium*) to reduce lipid oxidation of cooked pork patties. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 38, 363-370.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., y Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plants Science* 2, 152-159.
- Ringø, E., Lødemel, J.B., Myklebust, R., Jensen, L., Lund, V., Mayhew, T. M., y Olsen, R.E. (2002). The effects of soybean, linseed and marine oils on aerobic gut microbiota of Arctic charr *Salvelinus alpinus* L. before and after challenge with *Aeromonas salmonicida* ssp. *Salmonicida*. *Aquaculture Research* 33, 591-606.
- Robb, D.H.F. (2001). The relationship between killing methods and quality. En S.C. Kestin, y P.D. Warris (Eds.), *Farmed Fish Quality* (pp. 220– 233). London: Fishing News Books, Blackwell Science.
- Robin, J.H., Regost, C., Arzel, J., y Kaushik, S.J. (2003). Fatty acid profile of fish following a change in dietary fatty acid source: model of fatty acid composition with a dilution hypothesis. *Aquaculture* 225, 283-293.
- Rodríguez, C., Masoud, T., y Huerta, M.D. (1997). Study of the principal degradation products of trimethylamine oxide in 4 refrigerated species of fish. *Alimentaria* 288, 131-135.
- Rodríguez, O., Losada, V., Aubourg, S.P., y Barros-Velázquez, J. (2004). Enhanced shelf-life of chilled European hake (*Merluccius merluccius*) stored in slurry ice as determined by sensory analysis and assessment of microbiological activity. *Food Research International* 37, 749–757.

- Rodríguez O., Barros-Velázquez, J., Piñeiro, C., Gallardo, J.M., y Aubourg, S.P. (2006). Effects of storage in slurry ice on the microbial, chemical and sensory quality and on the shelf life of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Food Chemistry* 95, 270–278.
- Røra, A.M.B., Birkeland, S., Hultmann, L., Rustad, T., Skåra, T., y Bjerkeng, B. (2005). Quality characteristics of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets high in soybean or fish oil as affected by cold-smoking temperature. *LWT* 38, 201-211.
- Rueda, F.M. (2002) Estudio del ayuno como desencadenante del crecimiento compensatorio en el *Pagrus pagrus* (L.). Universidad de Murcia. Tesis doctoral.
- Ruff, N., Fitzgerald, R.D., Cross, T.F., Teurtrie, G., y Kerry, J.P. (2002). Slaughtering method and dietary α -tocopheryl acetate supplementation affect rigor mortis and fillet shelf-life of turbot *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture Research*, 33, 703-714.
- Ruff, N., Fitzgerald, R.D., Cross, T.F., Hamre, K., y Kerry, J.P. (2003). The effect of dietary vitamin E and C level on market-size turbot (*Scophthalmus maximus*) fillet quality. *Aquaculture Nutrition*, 9, 91-103.
- Ruiz de Huidobro, F., Miguel, E., Onega, E., y Blázquez, B. (2003). Changes in meat quality characteristics of bovine meat during the first 6 days postmortem. *Meat Science* 65(4), 1439-1446.
- Ruiz-Capillas, C., y Moral, A. (2001). Correlation between biochemical and sensory quality indices in hake stored in ice. *Food Research International* 34, 441-447.
- Ryder, J., Fletcher, G., Stec, M., y Seelye, R. (1993). Sensory, microbiological and chemical changes in hoki stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology* 18, 169-180.

S

- Saito, T., Arai, K., y Matsuyoshi, M. (1959). A new method for estimating the freshness of fish. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* 24, 749-750. En: H.H. Huss (Ed.), *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO Fisheries Technical Paper No. 348. FAO, Rome, Italy.
- Sánchez-Alonso, I., y Borderías, A.J. (2008). Technological effect of red grade antioxidant dietary fibre added to minced fish muscle. *International Journal of Food Science & Technology* 43 (6), 1009-1018.
- Santulli, A., Modica, A., Cusenza, L., Curatolo, A., y D'amelio, V. (1993). Effects of temperature on gastric evacuation rate and absorption and transport of dietary lipids in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 105A, 363-367.
- Sargent, J., Tocher, D.R., y Bell, J.G. (2002). The lipids. En: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition* (3ª ed.). San Diego, CA: Academic Press.
- Sau, S.K., Paul, B.N., Mohanta, K.N., y Mohanty, S.N. (2004). Dietary vitamin E requirement, fish performance and carcass composition of rohu (*Labeo rohita*) fry. *Aquaculture* 240, 359-368.

- Scaife, J.R., Onibi, G.E., Murray, I., Fletcher, T.C., y Houlihan, D.F. (2000). Influence of α -tocopherol acetate on the short- and long-term storage properties of fillets from Atlantic salmon *Salmo salar* fed a high lipid diet. *Aquaculture Nutrition* 6, 65-71.
- Schäfer, A., Rosenlund, K., Purslow, P.P., Andersen, H.J., y Henckel, P. (2002). Physiological and structural events post mortem of importance for drip loss in pork. *Meat Science*, 61, 355-366.
- Scott, D.N., Fletcher, D.C., Charles, D.C., y Wong, R.J. (1992). Spoilage changes in deep water fish, smooth oreo dory during storage in ice. *International Journal of Food Science and Technology* 27, 577-587.
- Serdaroğlu, M., y Felekoğlu, E. (2005). Effects of using Rosemary extract and onion juice on oxidative stability of sardine (*Sardina pilchardus*) mince. *Journal of Food Quality* 28, 109-120.
- Sérot, T., Regost, C., Prost, C., Robin, J., y Arzel, J. (2001). Effect of dietary lipid sources on odour-active compounds in muscle of turbot (*Psetta maxima*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 1339-1346.
- Shahidi, F., Janitha, P.K., y Wanasundara, P.D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 32, 67-103.
- Shamberger, R., Andreone, T., y Willis, C. (1974). Antioxidants and cancer. IV. Initiating activity of malonaldehyde as a carcinogen. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 53, 1771-1773. En Botsoglou, N.A., Fletouris, D.J., Papageorgiou, G.E., Vassilopoulos, V.N., Mantis, A.J., y Trakatellis, A.G. (1994). Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 1931-1937.
- Shamberger, R.J., Shamberger, B.A., y Willis, C.E. (1977). Malonaldehyde content of food. *Journal of Nutrition* 107, 1404-1409. En Botsoglou, N.A., Fletouris, D.J., Papageorgiou, G.E., Vassilopoulos, V.N., Mantis, A.J., y Trakatellis, A.G. (1994). Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 1931-1937.
- Shearer, K.D., Aasgaard, T., Andorsdottir, G., y Aas, G.H. (1994). Whole body element and proximate composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during the life cycle. *Journal of Fish Biology* 44, 785-797.
- Shewan, J.M., Macintosh, R.G., Tucker, C.G., y 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. *Journal of the Science of Food Agriculture* 4, 283-298. En Hyldig, G., Bremner, A., Martinsdóttir, E., y Schelvis, R. (2007). *Quality Index Methods*. En L.M.L. Nollet (Ed.), *Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality*. Published Online: Wiley-Online Library.
- Shewan, J.M. (1962). The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes. En J. Hawthorn y J. Muil Leitch (Eds.), *Recent advances in food science* (pp. 1167-1193). Butterworth, London. En: H.H. Huss (Ed.), *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO Fisheries Technical Paper No. 348. FAO, Rome, Italy.
- Shewan, J.M. (1977). The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. En *Proceedings of the Conference on Handling, Processing and marketing of tropical fish* (pp. 51-66). London: Tropical Products Institute. En: H.H.

- Huss (Ed.), *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO Fisheries Technical Paper No. 348. FAO, Rome, Italy.
- Schmedes, A., y Holmes, G. (1989). A new thiobarbituric acid (TBA) method for determining free malondialdehyde (MDA) and hydroperoxides selectively as a measure of lipid peroxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 66, 813-817. En Botsoglou, N.A., Fletouris, D.J., Papageorgiou, G.E., Vassilopoulos, V.N., Mantis, A.J., y Trakatellis, A.G. (1994). Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 1931-1937.
- Sikorski, Z.E., Kolakowska, A., y Burt, J.R. (1990). Postharvest biochemical and microbial changes. In Z.E. Sikorski (Ed.), *Seafood: Resources, nutritional composition, and preservation* (pp. 55-72). Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.
- Simeonidou, S., Govaris, A., y Varelziz, K. (1998). Quality assesement of seven Mediterranean fish species during storage on ice. *Food Resesearch International* 30, 479-484.
- Simitzis, P.E., Deligeorgis, S.G., Bizelis, J.A., Dardamani, A., Theodosiou, I., y Fegeros, K. (2008). Effect of dietary oregano oil supplementation on lamb meat characteristics. *Meat Science* 79, 217-223.
- Simitzis, P.E., Symeon, G.K., Charismiadou, M.A., Bizelis, J.A., y Deligeorgis, S.G. (2010). The effects of dietary oregano oil supplementation on pig meat characteristics. *Meat Science* 84, 670-676.
- Simopoulos, A.P. (2005). Omega-3 polyunsaturated fatty acids. En B. Caballero, L. Allen, y A. Prentice (Eds.), *Encyclopedia of Human Nutrition* (2ª ed., Vol. 1, pp. 205-219). Oxford: Elsevier.
- Simopoulos, A.P. (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 60, 502-507.
- Slotte, A. (1999). Differential utilization of energy during wintering and spawning migration in Norwegian spring-spawning herring. *Journal of Fish Biology* 54, 338-355.
- Storebakken, T., Kvien, I.S., Shearer, K.D., Grisdale-Helland, B., y Helland, S.J. (1999). Estimation of gastrointestinal evacuation rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using inert markers and collection of faeces by sieving: evacuation of diets with fish meal, soybean meal or bacterial meal. *Aquaculture* 172, 291-299.
- Stubhaug I, Lie, Ø., y Torstensen B.E. (2007). Fatty acid productive value and b-oxidation capacity in Atlantic salmon tissues (*Salmo salar* L.) fed on different lipid sources along the whole growth period. *Aquaculture Nutrition* 13, 145-155.
- Suárez Medina, M.D. (2006). Calidad nutricional en peces cultivados: influencia de las condiciones del cultivo. En S. Zamora Navarro, F.J. Martínez López, y V.C. Rubio Fernández (Eds.), *Acuicultura III: cultivo y alimentación de peces*. Murcia, España: Universidad de Murcia.
- Suzuki, T. (1987). Características del músculo de pescado y de las proteínas de pescado. En *Tecnología de las proteínas de pescado y Krill*. Zaragoza, España: Acribia, S.A.

- Sveier, H., Wathne, E., y Lied, E. (1999). Growth, feed and nutrient utilisation and gastrointestinal evacuation time in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): the effect of dietary fish meal particle size and protein concentration. *Aquaculture* 180, 265-282.
- Sveinsdóttir, K., Martinsdóttir, E., Hyldig, G., Jørgensen, B., y Kristbergsson, K., (2002). Application of Quality Index Method (QIM) scheme in shelf life study of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Science* 67, 1570-1579.
- Sveinsdóttir, K., Hyldig, G., Martinsdóttir, E., Jørgensen, B., y Kristbergsson, K., (2003). Development of Quality Index Method (QIM) scheme for farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Food Quality and Preferences* 14, 237-245.
- Sveinsdóttir, K., Martinsdóttir, E., Green-Petersen, D., Hyldig, G., Schelvis, R., y Delahunty, C. (2009). Sensory characteristics of different cod products related to consumer preferences and attitudes. *Food Quality and Preference* 20, 120-132.
- Szczesniak, S.A. (1963). Classification of textural characteristics. *Journal of Food Science* 28, 385-389.

T

- Tacon, A.G.J., Hasan, M.R., y Subasinghe, R.P. (2006). *Use of fishery resources as feed inputs to aquaculture development: trends and policy implications*. FAO Fisheries Circular, No. 1018. FAO, Rome, Italy.
- Tacon, A.G.J., y Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* 285, 146-158.
- Taliadourou, D., Papadopoulos, V., Domvridou, E., Savvaidis, I.N., y Kontominas, M.G. (2003). Microbiological, chemical and sensory changes of whole and filleted Mediterranean aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Journal of the Science of Food Agriculture* 83, 1373-1379.
- Tang, S., Sheehan, D., Buckley, D.J., Morrissey, P.A., y Kerry, J.P. (2001). Antioxidant activity of added tea catechins on lipid oxidation of raw minced red meat, poultry and fish muscle. *International Journal of Food Science and Technology* 36, 685-692.
- Taskaya, L., Çakli, S., y Çelik, U. (2003). A study on the quality changes of cultured gilthead seabream (*Sparus aurata* L., 1758) and seabass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) under the Market Conditions. *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences* 20, 313-320.
- Taylor, R.G., Fjaera, S.O., y Skjervold, P.O. (2002). Salmon fillet texture is determined by myofiber-myofiber and myofiber-myocommata attachment. *Food and Chemical Toxicology* 67, 2067-2071.
- Tejada, M. y Huidobro, A. (2002). Quality of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage related to the slaughter method and gutting. *European Food Research and Technology* 215, 1-7.
- Tejada, M., De las Heras, C., y Kent, M. (2007). Changes in the quality indices during ice storage of farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *European Food Research and Technology* 225, 225-232.

- Temming, A., y Herrmann, J.-P. (2003). Gastric evacuation in cod prey-specific evacuation rates for use in North Sea, Baltic Sea and Barents Sea multi-species models. *Fisheries Research* 63, 21-41.
- Testi, S., Bonaldo, A., Gatta, P.P., y Badiani, A. (2006). Nutritional traits of dorsal and ventral fillets from three farmed fish species. *Food Chemistry* 98, 104-111.
- Thomas, P.M., Pankhurst, N.W., y Bremner, H.A. (1999). The effect of stress and exercise on post-mortem biochemistry of Atlantic salmon and rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 54, 1177-1196.
- Tironi, V.A., Tomás, M.C., y Añón, M.C. (2010). Quality loss during the frozen storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. *LWT-Food Science and Technology* 43, 263-272.
- Torrissen, O.J. (1989). Pigmentation of salmonids – Interactions of astaxanthin and cantaxanthin on pigment deposition in rainbow trout. *Aquaculture* 79, 363-374.
- Torstensen, B.E., Frøyland, L., y Lie, Ø. (2004a). Replacing dietary fish oil with increasing levels of rapeseed oil and olive oil – effects on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) tissue and lipoprotein composition and lipogenic enzyme activities. *Aquaculture Nutrition* 10, 175-192.
- Torstensen, B.E., Frøyland, L., Ørnsrud, R., y Lie, Ø. (2004b) Tailoring of a cardioprotective muscle fatty acid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed vegetable oils. *Food Chemistry* 87, 567-580.
- Torstensen, B.E., Bell, J.G., Rosenlund, G., Henderson, R. J., Graff, I.E., Tocher, D.R., Lie, Ø., y Sargent, J.R. (2005). Tailoring of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) flesh lipid composition and sensory quality by replacing fish oil with a vegetable oil blend. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 10166-10178.
- Turchini, G.M., Mentasti, T., Frøyland, L., Orban, E., Caprino, F., y Moretti, V.M. (2003). Effects of alternative dietary lipid sources on performance, tissue chemical composition, mitochondrial fatty acid oxidation capabilities and sensory characteristics in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture*, 225, 251-267.
- Turchini, G.M., Moretti, V.M., Mentasti, T., Orban, E., y Valfrè, F. (2007). Effects of dietary lipid source on fillet chemical composition, flavour volatile compounds and sensory characteristics in the freshwater fish tench (*Tinca tinca* L.). *Food Chemistry* 102, 1144-1155.
- Turchini, G. M., Torstensen, B. E., y Ng, W. K. (2009). Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture* 1, 10-57.
- Tzikas, Z., Ambrosiadis, I., Soultos, N., y Georgakis, Sp. (2007). Quality assessment of Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) and blue jack mackerel (*Trachurus picturatus*) during storage in ice. *Food Control* 18, 1172-1179.

U

- Ulbricht, T.L.V., y Wheelock, J.V. (1989). Dietary fat and coronary heart disease. Bradford: Horton Publishing.

Ulbricht, T.L.V., y Southgate, D.A.T. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. Review article. *The Lancet* 338, 985-992.

UNE 87-001-94 (ISO 5492:1992). Análisis sensorial. Vocabulario. Asociación española de Normalización y Certificación (AENOR).

V

Valente, L.M.P., Cornet, J., Donnay-Moreno, C., Gouygou, J.P., Bergé, J.P., Bacelar, M., Escórcio, C., Rocha, E., Malhão, F., y Cardinal, M. (2011). Quality differences of gilthead sea bream from distinct production systems in Southern Europe: Intensive, integrated, semi-intensive or extensive systems. *Food Control* 22, 708-717.

Valenzuela, A., y Nieto, S. (1996). Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y Aceites* 47, 186-196.

W

Waagbø, R., Sandnes, K., Torrisen, O.J., Sandvin, A., y Lie, Ø. (1993). Chemical and sensory evaluation of fillets from Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed three levels of n-3 polyunsaturated fatty acids at two levels of vitamin E. *Food Chemistry* 46, 361-366.

Wang, Y., Yuen, K.-H., y Ng, W.-K. (2006). Deposition of tocotrienols and tocopherols in the tissues of red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp., fed a tocotrienol-rich fraction extracted from crude palm oil and its effect on lipid peroxidation. *Aquaculture* 253, 583-591.

Wendelaar Bonga, S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77, 591-625.

Wilkinson, R.J., Paton, N., y Porter, M.J.R. (2008). The effects of pre-harvest stress and harvest method on the stress response, rigor onset, muscle pH and drip loss in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 282, 26-32.

Wilsson, G.G., III, y van Lack, R.L.J.M. (1999). Sarcoplasmic proteins influence water-holding capacity of pork myofibrils. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 1939-1942.

Z

Zamora Navarro, S., y Rubio Fernández, V.C. (2006). La acuicultura en la alimentación humana. En S. Zamora Navarro, F.J. Martínez López, y V.C. Rubio Fernández (Eds.), *Acuicultura III: cultivo y alimentación de peces*. Murcia, España: Universidad de Murcia.

Zheng, W., y Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5165-5170.

ANEXOS

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Vida útil de doradas (*Sparus aurata*) de tamaño comercial almacenadas en hielo.

Álvarez, A.⁽¹⁾, García García, B.⁽¹⁾, Garrido, M.D.⁽²⁾, Hernández, M.D.^{(1)*}

(1) IMIDA-Acuicultura. Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia. Apdo. 65. 30740. San Pedro del Pinatar. Murcia.*e-mail:mdolores.hernandez6@carm.es

(2) Departamento de Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. 30071. Murcia.

El ayuno durante unos días antes del sacrificio permite obtener un pescado con los digestivos sin restos de alimento. La menor cantidad de heces en el intestino retrasa el deterioro.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de la duración del período de ayuno previo al sacrificio (24, 48 y 72 h) sobre la vida útil de doradas de tamaño comercial almacenadas en hielo.

Los animales se almacenaron a 4°C con hielo durante 0, 7, 14, y 21 días. Se llevaron a cabo análisis físico-químicos (pH, TBA, TVBN, color y textura), microbiológicos (aerobios mesófilos y psicrófilos, *Pseudomonas*, enterobacterias y coniformes) y un sensorial de apariencia para determinar el grado de deterioro de las doradas.

El pH mostró valores más altos en animales ayunados 24 o 48 horas con respecto a los que ayunaron 72 horas, y en los días 14 y 21. Las variaciones de TBA no fueron significativas con ninguno de los tratamientos. El TVBN incrementó con los días de almacén en hielo. Se produjo una decoloración y un ablandamiento de la carne de las doradas con el tiempo de almacenamiento.

Los recuentos de aerobios totales y *Pseudomonas*, y el índice de calidad mostraron muy significativamente el deterioro de las doradas con el tiempo de almacén y al prolongar el periodo de ayuno.

La vida útil se estimó en 16 días de almacén para las doradas ayunadas 24 h, 15 días para las ayunadas 48 h y 14 días para las de 72 h.

Palabras clave: Dorada, *Sparus aurata*, ayuno, almacenamiento, calidad, vida útil.

Title:

Sensory assessment of seabream (*Sparus aurata*) fed with a diet containing thyme essential oil during ice storage

Authors & affiliations:

A. Álvarez, B. García-García, C. Martínez, M. D. Hernández

¹ IMIDA-Acuicultura-Recursos Naturales. Box 65. 30740 San Pedro del Pinatar. Murcia. Spain

Abstract: (Your abstract must use **Normal style** and must fit in this box. Your abstract should be no longer than 300 words. The box will 'expand' over 2 pages as you add text/diagrams into it.)

The antioxidant activity of herbal oils is highly known. The use of herbal essential oils as preservatives against the process of spoilage during the storage period of fillets and whole fish has been studied by many authors. However, there are very few studies about their effect when these preservatives are contained in diets.

To determine the effect of feeding with a diet containing thyme (*Thymus zygis*) essential oil on the quality of seabream (*Sparus aurata*) during storage in ice, fish (200 g initial body weight) were fed for 18 weeks with diets containing either thyme added at 500 mg/kg, BHT at 200 mg/kg or a control diet without treatment. After of feeding period, fish were slaughtered and whole fish were stored on ice at 4°C for 0, 7, 14 and 21 days. At each sampling point, sensory analyses were performed. Seven experienced panellists evaluated the external appearance (shiny skin, slime and colour), the muscular condition (springiness, firmness and surface roughness), body odour and the appearance of the eyes (shape and clarity) and gills (colour and odour). A continuous scale of 1 to 5 demerit points was used. The sum of the scores given for each parameter is the final quality index, which uses a score of one for very fresh fish, increasing as the fish deteriorate.

The Quality Index values varied between minimum values of 11.74 (control), 11.72 (BHT), and 11.76 (thyme) on day 0, and maximum values of 47.43, 41.97 and 42.96 respectively on day 21. The Quality Index increased with storage time, with higher values for control diet. On the basis of the sensory test results, the addition of thyme essential oil has a similar effect to the addition of BHT.

Title:

Sensory assessment of seabream (*Sparus aurata*) fed with a diet containing thyme essential oil during ice storage

Authors & affiliations:

A. Álvarez, B. García-García, C. Martínez, M. D. Hernández

¹ IMIDA-Acuicultura-Recursos Naturales. Box 65. 30740 San Pedro del Pinatar. Murcia. Spain

Abstract: (Your abstract must use **Normal style** and must fit in this box. Your abstract should be no longer than 300 words. The box will 'expand' over 2 pages as you add text/diagrams into it.)

The antioxidant activity of herbal oils is highly known. The use of herbal essential oils as preservatives against the process of spoilage during the storage period of fillets and whole fish has been studied by many authors. However, there are very few studies about their effect when these preservatives are contained in diets.

To determine the effect of feeding with a diet containing thyme (*Thymus zygis*) essential oil on the quality of seabream (*Sparus aurata*) during storage in ice, fish (200 g initial body weight) were fed for 18 weeks with diets containing either thyme added at 500 mg/kg, BHT at 200 mg/kg or a control diet without treatment. After of feeding period, fish were slaughtered and whole fish were stored on ice at 4°C for 0, 7, 14 and 21 days. At each sampling point, sensory analyses were performed. Seven experienced panellists evaluated the external appearance (shiny skin, slime and colour), the muscular condition (springiness, firmness and surface roughness), body odour and the appearance of the eyes (shape and clarity) and gills (colour and odour). A continuous scale of 1 to 5 demerit points was used. The sum of the scores given for each parameter is the final quality index, which uses a score of one for very fresh fish, increasing as the fish deteriorate.

The Quality Index values varied between minimum values of 11.74 (control), 11.72 (BHT), and 11.76 (thyme) on day 0, and maximum values of 47.43, 41.97 and 42.96 respectively on day 21. The Quality Index increased with storage time, with higher values for control diet. On the basis of the sensory test results, the addition of thyme essential oil has a similar effect to the addition of BHT.

PHYSICOCHEMICAL, SENSORY AND MICROBIOLOGICAL EVALUATIONS ON SEA BREAM (*SPARUS AURATA*) FED DIETS CONTAINING ROSEMARY EXTRACT AND THYME ESSENTIAL OILS DURING ICE STORAGE

A. Álvarez^{1*}, M.J. Jordán², C. Martínez², B. García-García¹, M.D. Hernández¹

¹IMIDA-Acuicultura. Box 65. 30740 San Pedro del Pinatar. Murcia. Spain. *e-mail: anam.alvarez2@carm.es

²IMIDA-Recursos Naturales. C/ Mayor s/n. 30150 La Alberca. Murcia. Spain.

Introduction

The antioxidant activity of different natural compounds has been researched on food during last years. In this regard, use of these compounds as a dietary supplement for fish could delay the process of deterioration in fish during the storage. Perhaps, microbiology and sensory analyses are the most used methods to assess the degree of spoilage in fish.

This study aimed to determine the effect of dietary supplementation with rosemary extract and thyme essential oils- *Thymbra capitata* (chemotype carvacrol) and *Thymus zygis* subsp. *gracilis* (chemotype thymol)- on the *postmortem* deterioration of sea bream during ice storage.

Materials and methods

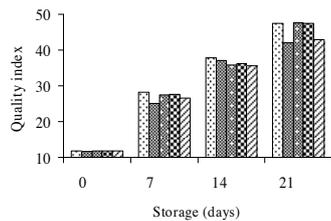
Fish (200 g initial body weight) were fed for 18 weeks with different diets containing thymol added at 500 mg/kg, carvacrol at 500 mg/kg, rosemary extract at 600 mg/kg, butylated hydroxytoluene (BHT) at 200 mg/kg and a untreated control diet. After of feeding period, fish were slaughtered and whole ungutted fish were stored on ice at 4°C for 0, 7, 14 and 21 days.

At each point during the sampling, sensory evaluations, 2- thiobarbituric acid (TBA) of muscle and microbiological analyses were performed. A total of eleven sensory parameters of appearance were evaluated, with each sensory characteristic that was modified during storage being scored on a continuous scale of 1 (very fresh fish) to 5 (very deteriorated fish) demerit points. The sum of the scores given for each parameter is the final quality index. TBA (mg malonaldehyde/kg of sample) was determined according to the method used by Botsoglou (1994). Total viable bacterial (mesophilic and psychophilic) and *Pseudomonas* counts were determined in the muscle and data were transformed into logarithms for the number of colony-forming units (cfu/g).

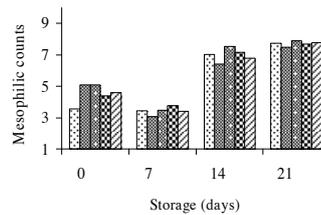
Results and discussion

The results of TBA obtained showed significant variations with storage time on ice ($P<0.01$) and with the different treatments ($P<0.05$). The values of TBA were higher during the last 2 weeks. Although these values were not very high in any of the groups (ranged between 0.05 and 0.37 mg malonaldehyde/kg). According to Cakli et al. (2007), values of 0.36-0.96 mg malonaldehyde/kg obtained in sea bream stored in similar conditions could indicate that no oxidation spoilage occurred. With regards to the different treatments, the groups of carvacrol and BHT showed lower values than the other groups.

The Quality index increased ($P<0.001$) during the period of storage and showed significant differences between the different diets ($P<0.001$). The groups supplemented with BHT, rosemary, carvacrol and thymol showed lower deterioration than the control group (Figure 1). Differences was seen in the deterioration of the eyes on sea bream that were fed with BHT and thymol diets, with their shape receiving a score lower than the other groups, especially on day 21. This attribute is one of the most used by the consumer for estimating the freshness of the fish.



□ Control ■ BHT ▨ Rosemary ▩ Carvacrol ▪ Thymol



□ Control ■ BHT ▨ Rosemary ▩ Carvacrol ▪ Thymol

Figure 1: Quality index during ice storage for each diet.

Figure 2: Total mesophilic count (log cfu/g) of muscle during ice storage for each diet.

Microbial growth was very significant for time in ice storage and with the different treatments ($P < 0.001$). Aerobic counts for both mesophiles and psychrophiles, as well as *Pseudomonas*, increased along with the days spent in ice storage. All diets groups, except BHT and thymol, reached (Figure 2) the maximum limit of acceptability used to count the aerobic mesophile microorganisms (7 log cfu/g) on day 14 (ICMSF, 1986). Similar results obtained Kostaki et al. (2009) in sea bass fillets stored with thyme oil used as a preservative.

There is not any evidence about the antioxidant effect, so that no spoilage oxidation occurred in any group during the period of storage time. Nevertheless, the analysis of TBA shows traces of the antioxidant effect of carvacrol, which maybe could be comparable with the effect of BHT. Apart from the antioxidant activity, extract and essential oils of aromatic plants can exhibit a wide range of properties. In this study, the thymol could be worked as anti-microbial.

Acknowledges

This work has been financed by INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria) (RTA 2009-00145).

References

- Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J., Papageorgiou, G. E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A. J., Trakatellis, A. G. (1994). Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1931-1937.
- 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.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1986). *Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific*, vol. 2. Toronto, Canada.
- Kostaki, M., Giatrakou, V., Sawaidis, I. N., Kontominas, M. G. (2009). Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiology* 26, 475-482.

Influencia del ayuno previo al sacrificio sobre la vida útil de doradas (*Sparus aurata*) de tamaño comercial almacenadas en hielo

A. Álvarez^{(1)*}, B. García García⁽¹⁾, M. D. Garrido⁽²⁾, y M. D. Hernández⁽¹⁾

(1) IMIDA-Acuicultura. Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia. Apdo. 65. 30740. San Pedro del Pinatar. Murcia.*e-mail:anam.alvarez2@carm.es

(2) Departamento de Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. 30071. Murcia.

Abstract

Farmed commercial-sized gilthead seabream were subjected to different periods of starvation (24, 48 and 72 h) before being slaughtered in order to study the effect this had on post mortem quality and shelf-life. The animals were stored on ice at 4 °C for 0, 7, 14, and 21 days. At each point during the sampling, physical-chemical (pH, TBA, TVBN, color and texture), microbiological and sensory analyses were performed to determine the spoilage that had occurred in the fish. Higher pH values were found in animals that were starved for 24 or 48 h. These values were the highest on days 14 and 21. Variations in TBA were not significant in any of the treatments. The TVBN increased with the number of days stored on ice. A discoloration occurred as the days went by in ice storage. The texture analysis revealed a certain softening of the flesh with time spent in storage. The microbiological analysis (total aerobic and *Pseudomonas* counts) and the quality index showed very significantly the deterioration in gilthead seabream as the on-ice storage time and the starvation time increased. The shelf-life was estimated to be 16 days for seabream starved for 24 h, 15 days for those starved for 48 h and 14 days for those starved for 72 h.

Justificación

El incremento en la demanda de dorada en el Mediterráneo y norte de Europa hace necesaria la obtención de productos acuícolas de alta calidad. La investigación sobre los cambios de calidad de la dorada que ocurren durante su manejo, distribución y almacenamiento en hielo cobran interés para las industrias acuícolas, comerciantes y consumidores (Alasalvar y col., 2001).

El ayuno durante unos días antes del sacrificio es una práctica habitual en acuicultura, que permite obtener un pescado con los digestivos sin restos de alimento. Considerando el procesado, por ejemplo el fileteado y el congelado, la interrupción de la alimentación debe ser un determinante de la vida útil del producto (Huidobro y Tejada, 2004).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de la duración del período de ayuno previo al sacrificio (24, 48 y 72 h) sobre la vida útil de doradas de tamaño comercial almacenadas en hielo.

Material y Métodos

Doradas de cultivo de tamaño comercial (436,8±87,3g) fueron sometidas a distintos periodos de ayuno (24, 48, y 72 h) antes de ser sacrificadas. Los animales se almacenaron a 4°C con hielo durante 0, 7, 14, y 21 días. Se llevaron a cabo análisis físico-químicos (pH, TBA, TVBN, color y textura), microbiológicos (aerobios mesófilos y psicrófilos, *Pseudomonas*, enterobacterias y coliformes) y un sensorial de apariencia para determinar el grado de deterioro de las doradas. El análisis sensorial se llevó a cabo tomando como referencia el Método del Índice de Calidad (QIM) específico para dorada de Huidobro *et al.* (2000) y el esquema seguido por González Cortés *et al.* (2000) de acuerdo con la legislación vigente (96/2406/CE).

Resultados y Discusión

Las variaciones de los parámetros medidos en cada análisis fueron más significativas con los días de almacén en hielo. No obstante, en cada uno de los días de muestreo se observaron diferencias significativas de algunas variables entre los distintos grupos de ayuno, poniendo en evidencia su efecto. El pH mostró valores más altos en animales ayunados 24 o 48 horas con respecto a los que ayunaron 72 horas, y en los días 14 y 21. Las variaciones de TBA no fueron significativas con ninguno de los tratamientos. El TVBN incrementó con los días de almacén en hielo. Se produjo una decoloración y un ablandamiento de la carne de las doradas con el tiempo de almacenamiento. Los recuentos de aerobios totales y *Pseudomonas*, y el

índice de calidad mostraron muy significativamente ($P < 0.01$) el deterioro de las doradas con el tiempo de almacén y al prolongar el periodo de ayuno.

El análisis microbiológico determina en última instancia la vida útil del pescado fresco. El límite máximo de aceptabilidad considerado para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos es de 7 log cfu/g (ICMSF, 1986). La ecuación obtenida para este parámetro estima que este valor se alcanzaría a los 14, 15 y 16 días en función de que el ayuno sea de 72, 48 o 24 horas, y el índice de calidad estimado con la ecuación correspondiente sería de 38 (Figura 1).

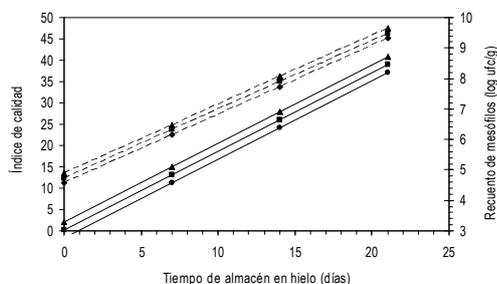


Figura 1. Regresión lineal del índice de calidad (líneas discontinuas) y recuento de mesófilos (líneas continuas) frente al tiempo de almacenamiento para los periodos de ayuno de 24 (●), 48 (■) y 72 (▲) horas. Índice de calidad = $10,010 + 0,049t + 1,619d$ y recuento de mesófilos = $2,497 + 0,011t + 0,259d$.

Bibliografía

- Alasalvar, C., K.D.A. Taylor, A. Öksüz, T. Garthwaite, M.N. Alexis, y K. Grigorakis. 2001. Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods. *Food Chemistry*. 72: 33-40.
- EEC, 1996. Laying Down Common Marketing Standards for Certain Fishery Products. Council Regulation (EC) No 2406/96 of 26 November 1996 Official Journal of European Communities, L 334, 1-15.
- Huidobro, A., A. Pastor, y M. Tejada. 2000. Quality Index Method developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Food Science*. 65: 1202-1205.
- Huidobro, A., y M. Tejada. 2004. Gilthead seabream (*Sparus aurata*): suitability for freezing and commercial alternatives. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 84:1405-1413.
- González Cortés, M. A., J. C. Penedo, R. Millán, E. Sanjuán, y S. Estupiñán. 2000. Cambios en la vida útil de dorada acuacultivada en Canarias (*Sparus aurata*) conservada en hielo. *Alimentaria*. Marzao: 61-64.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 1986. Sampling plans for fish and shellfish. In: ICMSF, Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications, 2nd Edition, Vol. 2. University of Toronto Press. Toronto; Canadá: 181-196 pp.

Agradecimientos

Proyecto (POI-0701) de la "Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia" financiado por la fundación FEDER. Animales donados por Culmarex S. A. (Águilas, Murcia, España).

Selección y entrenamiento de un panel de catadores para pescado

A. Álvarez^{(1)*}, B. García García⁽¹⁾, M. D. Garrido⁽²⁾, M. B. López⁽²⁾, E. Ferrandini⁽²⁾ y M. D. Hernández⁽¹⁾

(1) IMIDA-Acuicultura. Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia. Apdo. 65. 30740. San Pedro del Pinatar. Murcia. *e-mail: anam.alvarez2@carm.es

(2) Departamento de Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. 30071. Murcia.

Abstract

Sensory analysis permits to define the changes produced in the organoleptic characteristics of food. In fish farming, any change in the conditions of farming can affect the nutritional quality and organoleptic properties of the final product. In this respect, the quality of fish is a major concern to the industry and consumers. The aim of this work consists of the selection and training of a group of subjects in order to form a taste panel for fish. The recruitment, selection and general training were conducted according to international standard ISO 8586-1:1993. Then the specific training for fish was performed. This consisted of the familiarization with attributes of appearance, colour, flavour and texture which can find in fish. In addition to work the development and use of descriptive profilings and the generation of the reference scores.

Introducción

Existen varios factores que pueden influir en la calidad del pescado de crianza, tanto en su calidad nutricional como en sus propiedades organolépticas. En este sentido, la evaluación sensorial permite detectar y definir los cambios producidos en las características organolépticas. El presente trabajo consistió en la selección y entrenamiento de un grupo de candidatos, cuya finalidad fue disponer de un panel entrenado de catadores de pescado.

Material y métodos

El reclutamiento, selección previa y entrenamiento general se llevó a cabo según la Norma Internacional ISO 8586-1:1993. Se reclutaron 38 candidatos del personal de administración, técnicos, investigadores, etc del IMIDA de edades comprendidas mayoritariamente entre 30 y 50 años, y consumidores habituales de pescado. Un total de 30 preseleccionados se sometieron a pruebas de reconocimiento y emparejamiento y de detección de sabores y olores, pruebas de descripción de olores y texturas, y pruebas de ordenación de estímulos para color, sabor, olor y textura. Posteriormente 24 seleccionados (16 mujeres y 8 hombres) realizaron el entrenamiento general, durante el cual se llevaron a cabo pruebas de emparejamiento, ordenación y detección con sabores básicos. Realizaron pruebas de ordenación con escalas normalizadas de textura (dureza, jugosidad, carácter graso, fibrosidad, y masticabilidad) y se iniciaron en el uso de descriptores para elaborar un perfil descriptivo con productos simples.

Tras el entrenamiento general 15 catadores (9 mujeres y 7 hombres) se sometieron a un entrenamiento específico de pescado. Para familiarizarse con olores relativos a mar se les presentó una serie de productos con dichas características (agua de mar, arena de playa, cangrejos, conchas, algas, gambas cocidas y percebes cocidos). También se les presentó muestras de algunos de los ingredientes utilizados en la elaboración de piensos (aceite de pescado, aceite de hígado de bacalao y harina de pescado) con olores que pueden detectarse en pescados de acuicultura. Se realizaron pruebas de reconocimiento de sabores básicos (dulce, salado, ácido y amargo), a alta y baja intensidad, y de olores (a mar, a rancio, ácido y amoniacal) en pescado.

Debido a que el panel debía entrenarse para la valoración de pescados blancos, se les preparó una prueba de discriminación de niveles de intensidad de distintas tonalidades de blanco. A partir de disoluciones acuosas con distintos productos que eran mezcladas con leche, se obtuvieron escalas de color blanco con tonos verdoso, marrón, gris y amarillento.

Para iniciar al panel en el uso de perfiles descriptivos se les presentó muestras de tres pescados distintos (merluza, salmón y atún) para que desarrollaran una relación de términos que describieran a cada especie en particular, así como aquellos términos que permitieran diferenciar una de otra. Se les proporcionó una lista de vocabulario que fue seleccionado tras una revisión bibliográfica. Posteriormente, con el objetivo de entrenar al panel en la elaboración de escalas y el desarrollo de perfiles descriptivos, valoraron y

describieron una serie de muestras de distintos pescados (fletán, lenguado, dorada, emperador, mújol, merluza, rodaballo, lubina, besugo, rape, y bacalao).

Las últimas sesiones se dedicaron al entrenamiento específico de dorada. Los catadores seleccionaron y consensuaron los atributos de mayor relevancia para esta especie. Para ello cataron doradas de diferente origen (salvaje, cultivada), método de conservación (refrigerada, congelada) y manejo previo al sacrificio (ayunada). Para comprobar la fiabilidad del panel se representaron los datos de las puntuaciones medias de cada lote dadas por cada catador y las puntuaciones dadas a cada una de las muestras en las distintas sesiones según Fortín y Desplancke (2001).

Resultados y discusión

Las valoraciones sensoriales realizadas por el panel pueden variar de un individuo a otro, y dentro de una misma persona en distintas sesiones (Ibáñez y Barcina, 2001). En la Figura 1 se muestra el rendimiento de cada catador para los dos tipos de muestra durante la valoración del atributo “firmeza”. Existe una concordancia entre los asesores del panel, ya que, excepto los catadores 9 y 12, las puntuaciones dadas para cada lote son similares (3-5 el lote *a* y 4-6 el lote *b*). En cuanto al rendimiento de un juez para las distintas repeticiones, en el ejemplo de la Figura 2 puede apreciarse como este catador da puntuaciones similares a las distintas muestras de cada origen (3-4 el lote *a* y 5-6 el lote *b*) valoradas en distintas sesiones. Llegado a este punto el panel estaría preparado para llevar a cabo un análisis sensorial descriptivo de dorada.

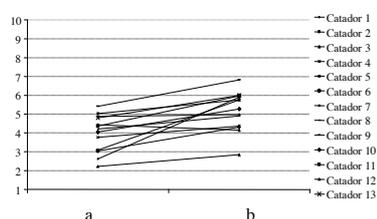


Figura 1. Medida de la concordancia entre los catadores del panel para el atributo “firmeza”.

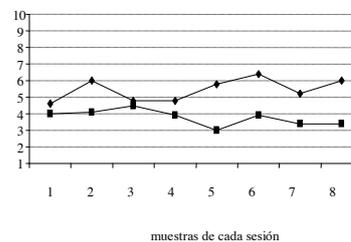


Figura 2. Medida de la repetibilidad individual de un catador para el atributo “carácter graso” del lote *a* (♦) y *b* (■).

Bibliografía

- ISO 8586:1993. Sensory analysis. General guidance for the selection, training and monitoring of assessors. Part 1: Selected assessors.
- Fortín, J. y C. Desplancke. 2001. *Guía de selección y entrenamiento de un panel de catadores*. Acribia, S. A. Zaragoza; España.
- Ibáñez, F. C. y Y. Barcina. 2001. *Análisis sensorial de alimentos. Métodos y aplicaciones*. Springer-Verlag Ibérica. Barcelona; España: 84 pp.

Agradecimientos

Este proyecto ha sido financiado por los Planes Nacionales de Acuicultura (Jacumar).

Influencia de la temperatura en el tiempo de evacuación gastrointestinal en dorada (*Sparus aurata*)

A. Álvarez*, B. García García, y M. D. Hernández

IMIDA-Acuicultura. Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia. Apdo. 65. 30740. San Pedro del Pinatar. Murcia. *e-mail: anam.alvarez2@carm.es

Abstract

Starvation before slaughter is a very common practice in aquaculture, the purpose of which is to obtain fish with clean digestive tracts. The time needed to empty the digestive tract depends on the evacuation rate. This varies according to the temperature, among other factors. In the current study, the time required to empty the gastrointestinal tract in gilthead seabream (*Sparus aurata*) was estimated for the normal average temperatures that occur during the different seasons of the year in the Mediterranean (15°C, 20°C and 25°C). The evacuation speed was shown to increase with the temperature. Food intake was much higher for the experimental group kept at 25°C. Evacuation times were similar at 25°C and 20°C, and lower than at 15°C.

Justificación

Con el fin de obtener un pescado con un digestivo sin restos de alimento, se suele mantener a los peces en ayuno antes del sacrificio. El tiempo mínimo necesario de ayuno depende principalmente de la tasa de evacuación gastrointestinal. El objetivo de nuestro estudio era estimar el tiempo necesario para completar la evacuación del tracto gastrointestinal en doradas de tamaño comercial a las temperaturas medias que se dan en las distintas estaciones del año en el Mediterráneo (15° en invierno, 20° en primavera y otoño, y 25° en verano). Estos datos permitirían conocer la duración del ayuno al que deben someterse los peces antes de ser sacrificados, según la estación del año en que se proceda al despesque.

Material y métodos

Los animales fueron mantenidos en ayuno durante 72 horas para asegurar la completa evacuación del digestivo, y posteriormente fueron alimentados *ad libitum*. Tras la ingesta fueron sacrificados a las 0'5, 3, 6, 12, 24, 36, 48 y 72 horas. Posteriormente fueron diseccionados para obtener los digestivos y extraer el contenido del estómago e intestino. Se estimó el peso seco de los contenidos de cada parte.

Se calcularon las medias geométricas y las desviaciones estándar de los datos. Las tasas de evacuación (TE) para cada temperatura se estimaron mediante un análisis de regresión basado en la relación entre el tiempo de evacuación (t) y el contenido gastrointestinal (CG) (Ecuación 1); donde la pendiente de la recta de regresión es la TE (g/h).

$$CG = n + mt \quad (1)$$

El efecto de la temperatura (T) en la tasa de evacuación, así como la interacción entre t y T , fue analizada mediante un análisis de regresión múltiple (Ecuación 2).

$$CG = a + bT + ct + dTt \quad (2)$$

La Ecuación 2 puede expresarse como $DC = a + bT + (c+dT)t$, de manera que t tiene una relación lineal con T cuando los coeficientes b , c , y d sean significativamente distintos de 0. Entonces el tiempo de evacuación se calcula a partir de la Ecuación 2, cuando $CG = 0$.

Resultados y discusión

La tasa de evacuación incrementó con la temperatura (Figura 1). El punto de intersección con el eje Y (n) refleja el nivel de ingesta antes del sacrificio, de manera que éste incrementa con la temperatura, siendo muy superior en el grupo de 25°C (0,652). Los tiempos de evacuación, indicados por la intercepción de la recta de regresión con el eje X (Santulli *et al.*, 1993), fueron de 23,6 h a 25°C, 26,5 h a 20°C y 43,3 h a 15°C.

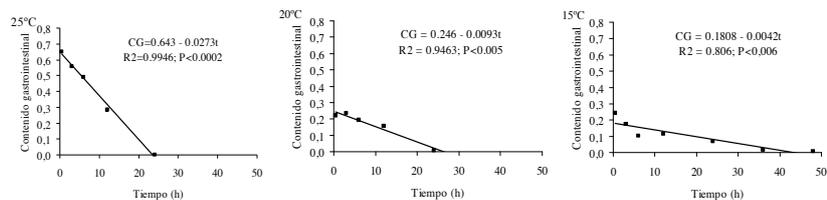


Figura 1. Tasa de evacuación gastrointestinal, calculada como gramos de material seco en tanto por ciento del peso corporal, en dorada cultivada a 25°C, 20°C y 15°C. $GC = n + mt$ ($TE = 0$).

Los coeficientes del análisis de regresión múltiple (Figura 2) que describe la relación entre t y T fueron significativamente distintos de 0 ($P < 0.0001$), de manera que la pendiente de t varía linealmente con la temperatura ($b' = 0.0307 + 0.0022T$) y t para $CG = 0$ en función de T se calcula a partir de la Ecuación 2. Esta estimación nos permite calcular valores de t para todo el rango de temperaturas de 15°C a 25°C (Figura 2). Según estos resultados se puede concluir que en condiciones de alimentación *al libitum*, el consumo de alimento y la tasa de evacuación gastrointestinal en dorada incrementan con el aumento de temperatura. De manera que, cuando el rango de temperatura media es 20-25°C un periodo de 24 h de ayuno debería ser suficiente obtener animales con los digestivos vacíos. Sin embargo, a 15°C el ayuno no debe ser menor a 40h. A efectos prácticos, los tiempos de ayuno podrían aproximarse a los reflejados en la figura.

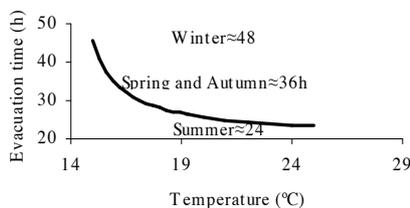


Figura 2. Relación entre el tiempo de evacuación y la temperatura, descrita por la ecuación: $t = (-0,5570 + 0,0460T) / (0,0307 - 0,0022T)$, $R = 0.9489$; $R^2_{adj} = 0.8773$; $P < 0.0001$; donde t es el tiempo de evacuación y T es la temperatura.

Bibliografía

Santulli, A., A. Modica, L. Cusenza, A. Curatolo y V. D'Amelio. 1993. Effects of temperatura on gastric evacuation rate and absorption and transport of dietary lipids in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 105A: 363-367.

Agradecimientos

Proyecto (POI-0701) de la "Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia" financiado por la fundación FEDER. Animales donados por Culmarex S. A. (Águilas, Murcia, España).

Perfil descriptivo de besugo (*Pagellus bogaraveo*). Comparativa entre salvaje y cultivado por tres paneles de catadores entrenados.

M.D. Hernández¹, A. Álvarez¹, J.B. Peleteiro², A. Claret³, L. Guerrero³, L. Rincón⁴ y R. Ginés⁴.

¹IMIDA-Acuicultura. Apdo. 65. 30740 San Pedro del Pinatar. Murcia.

mdolores.hernandez6@carm.es

²IEO Vigo. Cabo Estay – Canido. 36280 Vigo

³IRTA. IRTA, Finca Camps i Armet, 17121 Monells.

⁴ULPGC-GIA. Trasmontaña, s/n. 35413 Arucas. Las Palmas de Gran Canaria.

Abstract

Quality attributes of fish are measurable both with instrumental and sensory methods. However, the results of both kind of test are not always correlated. In sensory tests there is an interaction between the food and the person that doesn't exist when an instrument is used. The objective of this work was to evaluate possible sensory differences between blackspot seabream obtained by fishing and those cultured. In order to get this, three panels of independent tasters (IRTA, ULPGC, IMIDA) were trained in the specific characteristics of this species. Significant differences have been found ($p < 0.05$) depending of the origin for intensity of characteristics odor and shellfish odor, oily odor, color, shine, integrity of laminar structure, intensity of characteristic flavor and shellfish flavor, oily flavor, sweetness, roughness, persistence, juiciness, chewiness, fatness and adherence. The origin of the blackspot seabream seems to have an important effect on its organoleptic characteristics.

Justificación

La calidad del pescado cultivado puede verse influenciada por multitud de factores: fisiológicos (edad, maduración sexual, etc.), ambientales (temperatura, salinidad, presión, etc.) y por la dieta (ayuno, composición de la dieta, etc.) (Haard, 1992). Los atributos de calidad que posee el pescado son medibles tanto de forma instrumental como sensorial. Sin embargo, no siempre existe una correlación entre ambos tipos de pruebas. La razón fundamental es que en las pruebas sensoriales hay una interacción individuo-alimento que no valora el instrumento y que da como resultado una percepción del parámetro a medir diferente. La valoración sensorial de un alimento es un aspecto clave en la percepción de calidad del mismo. El objetivo de este trabajo fue evaluar las posibles diferencias sensoriales de doradas procedentes de la pesca y de crianza.

Material y Métodos

Para ello tres paneles de catadores independientes (IRTA, ULPGC, IMIDA) fueron entrenados en las características propias de la especie (ISO 8586-1, 1993). Los besugos utilizados en el estudio provenían de una misma localización geográfica, de una empresa gallega los cultivados y de las Islas Azores los salvajes.

Para la elaboración del perfil descriptivo del besugo, se partió de una propuesta de posibles descriptores que fueron consensuados por los panelistas de los tres paneles. El perfil estaba compuesto por tres atributos de olor, tres de apariencia, seis de sabor y seis de textura. Se utilizó una escala no estructurada de 10 cm con anclajes en los extremos. Como referencia, se trabajó con distintos tipos de pescados (fletán, panga, emperador, mújol, salmón, merluza, lenguado, rape, hurta) para definir los extremos de las escalas para cada uno de los atributos.

También se consensó entre los tres paneles el protocolo experimental para que las pruebas se desarrollaran de igual manera para los tres grupos. Los peces fueron descamados, eviscerados y fileteados. De cada filete se extraían tres porciones de la parte dorsal de unos dos centímetros de ancho por tres de alto. Cada trozo se colocaba en una cajetilla de aluminio y se tapaban para su

cocinado en horno a 115°C durante 10 minutos. Las muestras fueron identificadas con un código con tres dígitos. Cada catador realizó 8 catas de besugo de cada uno de los orígenes (8 réplicas) en cuatro días diferentes para evitar la fatiga sensorial.

Resultados y Discusión

Se han detectado diferencias significativas ($p < 0.05$) según el origen para la intensidad del olor propio, la del olor a marisco y la del olor aceitoso, el color, el brillo, la integridad de la estructura laminar, la intensidad del sabor propio, la del sabor a marisco, la del sabor aceitoso, el dulzor, la aspereza, la persistencia del gusto residual, la jugosidad, la masticabilidad, el carácter grasoso y la adherencia (Figura 1).

El origen del besugo parece tener una importante influencia sobre sus características organolépticas. El besugo salvaje presenta una mayor intensidad de olor y sabor a marisco, es más blanco y más jugoso. Mientras que besugo cultivado tiene un carácter grasoso más marcado que le confiere una mayor intensidad de olor y sabor aceitoso y una cierta adherencia. El besugo cultivado también presenta una mayor intensidad tanto de olor como de sabor propios.

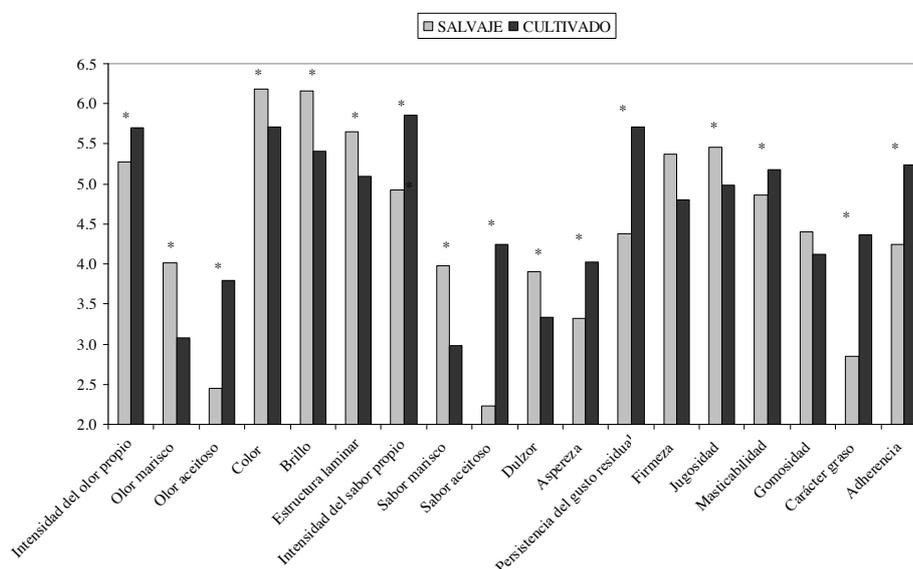


Figura 1. Valores medios obtenidos para cada atributo para el besugo salvaje y cultivado. Diferencias entre los mismos (* = $p < 0.005$).

Bibliografía

- Haard, N. 1992. Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Research International* 25:289-307.
- ISO 8586-1 (1993). Sensory analysis. General guidance for the selection, training and monitoring of assessors. Part 1: Selected assessors.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los “Planes Nacionales de Acuicultura (JACUMAR)”.

Perfil descriptivo de dorada (*Sparus aurata*). Comparativa entre salvaje y cultivada por tres paneles de catadores entrenados.

M.D. Hernández¹, A. Álvarez¹, B. García García¹, A. Claret², L. Guerrero², L. Rincón³ y R. Ginés³.

¹IMIDA-Acuicultura. Apdo. 65. 30740 San Pedro del Pinatar. Murcia.

mdolores.hernandez6@carm.es

²IRTA. IRTA, Finca Camps i Armet, 17121 Monells.

³ULPGC-GIA. Trasmontaña, s/n. 35413 Arucas. Las Palmas de Gran Canaria.

Abstract

Organoleptic characteristics are a fundamental aspect in the quality of a food. Its perception, despite being very variable among the potential purchasers, may become measurable and as well modified or at least controlled during production and commercialization. The objective of this work was to evaluate possible sensory differences between seabream obtained by fishing and those cultured. In order to get this, three panels of independent tasters (IRTA, ULPGC, IMIDA) were trained in the specific characteristics of this species. Significant differences have been found ($p < 0.05$) depending of the origin for marine odor intensity, oily odor, color, shine, exuded color, intensity of characteristic flavor and marine flavor, oily flavor, firmness, juiciness, chewiness and fatness. The differences detected for the different attributes among the panels are quite homogeneous, with a relatively high degree of coherence among the three panels. It would be convenient to make tests to find out if the differences are detectable without training, doing tests among consumers.

Justificación

El Plan Nacional de Acuicultura “Caracterización de la calidad del pescado de crianza” (2008-2011, JACUMAR) persigue dotar de herramientas que posibiliten llegar a un mayor número de consumidores. Un aspecto fundamental en la calidad de un alimento son sus características organolépticas. Su percepción aun siendo muy variable entre potenciales compradores, pueden llegar a ser mensurables y además modificables o al menos controlables durante la producción y comercialización. El objetivo de este trabajo fue evaluar las posibles diferencias sensoriales de doradas procedentes de la pesca y de crianza.

Material y Métodos

Para ello tres paneles de catadores independientes (IRTA, ULPGC, IMIDA) fueron entrenados en las características propias de la especie (ISO 8586-1, 1993). Las doradas de tamaño comercial utilizadas en el estudio provenían de una misma localización geográfica (Murcia).

Para la elaboración del perfil descriptivo de la dorada, se partió de una propuesta de posibles descriptores que fueron consensuados por los panelistas de los tres paneles. El perfil estaba compuesto por tres atributos de olor, cuatro de apariencia, cuatro de sabor y cinco de textura. Se utilizó una escala no estructurada de 10 cm con anclajes en los extremos. Como referencia, se trabajó con distintos tipos de pescados (fletán, panga, emperador, mújol, salmón, merluza, lenguado) para definir los extremos de las escalas para cada uno de los atributos. Las especies se seleccionaron de modo que la dorada se encontrase, para ese atributo, en una posición intermedia.

También se consensó entre los tres paneles el protocolo experimental para que las pruebas se desarrollaran de igual manera para los tres grupos. Los peces fueron descamados, eviscerados y fileteados. De cada filete se extraían tres porciones de la parte dorsal de unos dos centímetros de ancho por tres de alto. Cada trozo se colocaba en una cajetilla de aluminio y se tapaban para su cocinado en horno a 115°C durante 10 minutos. Las muestras fueron identificadas con un código con tres dígitos. Cada catador realizó 8 catas de doradas de cada uno de los orígenes (8 réplicas) en cuatro días diferentes para evitar la fatiga sensorial.

Resultados y Discusión

Se han detectado diferencias significativas ($p < 0.05$) según el origen para la intensidad del olor marino, la del olor aceitoso, el color, el brillo, el color del exudado, la intensidad del sabor propio, la del sabor marino, la del sabor aceitoso, la firmeza, la jugosidad, la masticabilidad y el carácter graso (Figura 1).

Las diferencias detectadas para los diferentes atributos entre los distintos paneles son bastante homogéneas. Apreciándose un relativamente alto grado de coherencia entre los tres paneles.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con los aportados por otros autores (ver Grigorakis, 2007), mostrando los peces salvajes una textura más firme, más sabor y un color más oscuro. Mientras que los cultivados tienen un carácter graso más intenso con mayor olor y sabor aceitoso. En cualquier caso, la magnitud de las diferencias encontradas es bastante pequeña. Sería conveniente comprobar si estas diferencias son detectables si no se está entrenado para ello; realizando pruebas de diferencia entre consumidores.

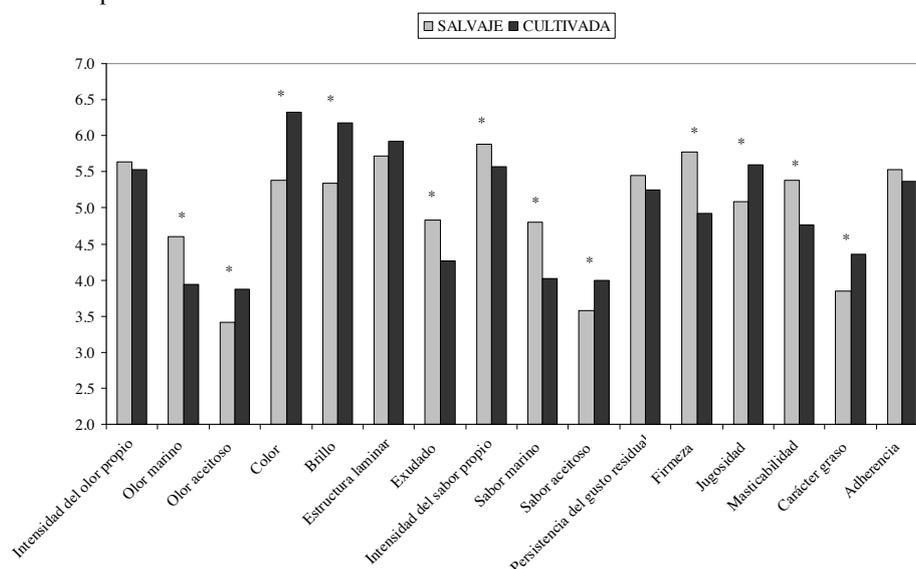


Figura 1. Valores medios obtenidos para cada atributo para la dorada salvaje y cultivada. Diferencias entre los mismos (* = $p < 0.005$).

Bibliografía

Grigorakis, K. 2007. Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture* 272, 55–75.

ISO 8586-1 (1993). Sensory analysis. General guidance for the selection, training and monitoring of assessors. Part 1: Selected assessors.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los “Planes Nacionales de Acuicultura (JACUMAR)”.

Diferencias organolépticas entre la lubina de crianza y la de pesca extractiva

L. Rincón¹, E. Aguirre², R. Ginés¹, A. Claret³, L. Guerrero³, M.D. Hernández⁴ y A. Álvarez⁴,

¹ ICCM-ULPGC. Trasmontaña, s/n. 35413 Arucas. larima@hotmail.com

²DAP. Plaza Madrid s/n. 11009 Cádiz

³IRTA. Finca Camps i Armet. 17121 Monells.

⁴IMIDA-Acuicultura. Box 65. 30740 San Pedro del Pinatar.

Abstract

Although European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) has an important production level in the Mediterranean area, few information is available about organoleptic differences between wild and farmed fish. For that, three trained panels have compared fish from both origins. The sensory profile used had 15 descriptors: three of odour, three of appearance, five of texture, three of flavour and one more of aftertaste. Fillets of farmed sea bass showed less global odour intensity and also less intensity of marine odour and marine flavour. On the other hand, adhesiveness of fillets in the teeth after chewing was less intensity in wild fish.

Justificación

Si bien pueden encontrarse en la literatura algunos trabajos que establezcan diferencias entre lubinas procedentes de pesca extractiva frente a las obtenidas mediante producción controlada (Periago *et al.*, 2005; Ozyurt y Polat, 2006), éstos hacen referencia a aspectos relacionados con las características bioquímicas del filete u otros análisis instrumentales que contribuyen a plasmar dichas diferencias. Sin embargo, un aspecto fundamental para la aceptación por parte de los consumidores de los productos de acuicultura, como son las propiedades organolépticas, no ha sido analizado con igual profundidad.

Así, el objetivo del presente trabajo es evaluar las diferencias sensoriales en lubina según su origen, definiendo mediante el estudio de un perfil sensorial específico los atributos que las determinan.

Material y Métodos

El material animal utilizado para las pruebas sensoriales procedió por un lado de capturas realizadas en el litoral gaditano durante los meses de febrero y marzo del año 2009, y por otro de instalaciones de jaulas flotantes de la misma zona. De manera simultánea, las valoraciones fueron llevadas a cabo por tres paneles de evaluadores entrenados radicados en diferentes centros de investigación (ICCM, IMIDA e IRTA). Un total de 12 evaluadores por panel realizaron cuatro sesiones de cata, aportándose cuatro muestras en cada una de ellas.

Las muestras fueron preparadas separando ambos filetes de cada pieza y, sin retirar la piel, cortando de la parte central de cada uno tres porciones rectangulares de 3 cm de anchura y 3 cm de longitud aproximadamente. Dichas porciones fueron cocinadas en cajas de aluminio con su correspondiente tapa en un horno de convección a 115 °C durante 10 minutos, siendo inmediatamente ofrecidas a los jueces para su evaluación.

Cada evaluador contó con una plantilla en la que se incluyeron 15 descriptores, indicando su puntuación sobre una escala no estructurada de 10 cm con anclajes en los extremos. Los descriptores fueron agrupados en cinco bloques atendiendo al tipo de percepción sensorial: tres atributos de olor, tres de apariencia, cinco de textura, tres de flavor y uno de gusto residual tras la deglución. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante un modelo lineal general

univariante en el que se incluyeron como factores el origen del pescado y el panel de evaluadores. También se hizo un análisis de componentes principales.

Resultados y Discusión

De los 15 atributos incluidos en el perfil sensorial, sólo se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en cuatro, la intensidad global de olor, la intensidad de olor y de sabor a mar y la textura adherente del filete al pegarse a las piezas dentales durante la masticación. En los tres primeros la mayor intensidad fue para los individuos procedentes de pesca extractiva mientras que para el último la mayor adherencia la presentaron los filetes del pescado de crianza. En experiencias realizadas con lubina en las que se probaron diferentes dietas, Montero et al. (2005) no obtuvieron diferencias en adherencia ligadas a la dieta, aunque en todas ellas el porcentaje de lípidos en el músculo tampoco fue diferente. Precisamente este componente muscular puede influir en los cambios de textura más debido a la cantidad presente que a la composición. En la figura 1 se muestra la distribución de los distintos atributos atendiendo a su trascendencia para explicar la varianza de los resultados. Son precisamente características de textura así como olor y sabor marino las responsables de la diferencia entre los orígenes.

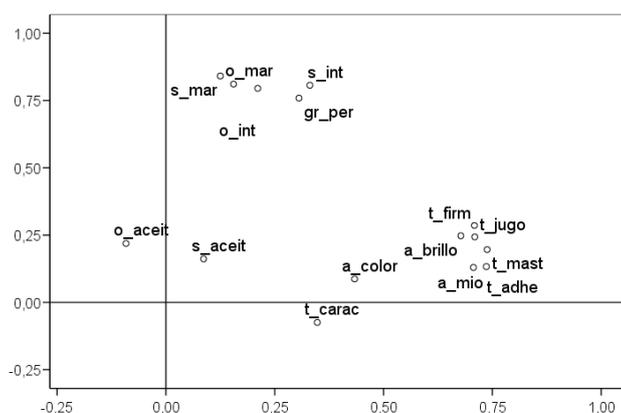


Figura 1. Análisis factorial de los descriptores del perfil sensorial de lubina

Bibliografía

- Montero, D., L. Robaina, M.J. Caballero, R. Ginés y M.S. Izquierdo. 2005. Growth, feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils. A time –course study on the effect of a refeeding period with a 100% fish oil diet. *Aquaculture*, 248:121-134.
- Ozyurt G., y A. Polat. 2006. Amino acid and fatty acid composition of wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a seasonal differentiation. *European Food Research and Technology*, 222:316-320.
- Periago M.J., M.D. Ayala, O. Lopez-Albors, I. Abdel, C. Martinez, A. Garcia-Alcazar, G. Ros y F. Gil. 2005. Muscle cellularity and flesh quality of wild and farmed sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*, 249:175-188.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los Planes Nacionales de Acuicultura de JACUMAR.

Desarrollo de perfiles sensoriales para la caracterización de tres especies de crianza: dorada, lubina y besugo

L. Rincón¹, R. Ginés¹, M.D. Hernández², A. Álvarez², A. Claret³ y L. Guerrero³

¹ ICCM-ULPGC. Trasmontaña, s/n. 35413 Arucas. larima@hotmail.com

²IMIDA-Acuicultura. Box 65. 30740 San Pedro del Pinatar

³IRTA. Finca Camps i Armet. 17121 Monells

Abstract

The quality perception of consumers to aquaculture products is the expression of an intention to consume them. In this sense, descriptive analysis is a sensory methodology that provides a basis for determining those sensory attributes that are important to acceptance. And the first step to compare the organoleptic characteristics of wild and cultured species is to develop and validate a sensory profile. For that, three sensory profiles are proposed to work with three different species: gilthead sea bream *Sparus aurata*, European sea bass *Dicentrarchus labrax* and blackspot sea bream *Pagellus bogaraveo*.

Justificación

El principal motivo esgrimido para que el pescado de crianza sea rechazado en nuestro mercado por parte de aquellos consumidores que no lo consideran como una opción de compra es su deficiente calidad al compararlo con el de pesca extractiva (Luna *et al.*, 2004). Y aun siendo la percepción de calidad de un producto como el pescado de crianza una amalgama compleja de factores, uno de los aspectos quizá más importantes para su aceptación tiene que ver con las características organolépticas. En este sentido, un análisis descriptivo cuantitativo que proporcione una completa descripción sensorial, permitirá establecer similitudes y diferencias dentro de especies según su origen, así como determinar cuales de esos atributos son preponderantes para favorecer el acceso de los consumidores más reticentes.

Con el presente trabajo se describe la realización y validación de perfiles sensoriales para tres especies de pescado de crianza como paso previo para su caracterización sensorial y la cuantificación de las diferencias que se puedan apreciar frente a individuos de la misma especie pero provenientes de pesca extractiva.

Material y Métodos

Las especies sobre las que se ha trabajado han sido dorada *Sparus aurata*, lubina *Dicentrarchus labrax* y besugo *Pagellus bogaraveo*, tanto con individuos procedentes de pesca extractiva como de crianza. En el desarrollo de los perfiles sensoriales han intervenido tres paneles de evaluadores entrenados que están radicados en diferentes centros de investigación (ICCM, IMIDA e IRTA). Cada uno de los paneles ha trabajado de manera independiente, siendo consensuados al final del proceso aquellos descriptores más adecuados para definir las características sensoriales de cada una de las especies en estudio. La selección de los descriptores propuestos por cada panel se estableció mediante la discusión entre los evaluadores dentro del panel. Uno a uno fueron describiendo las sensaciones percibidas y de manera global se concretaron y definieron los descriptores que se confirmaron como más apropiados y uniformes, entendidos y aceptados por todos, y que además fueran suficientemente discriminantes para diferenciar, en este caso, el origen del pescado en las especies bajo estudio.

Una vez establecidos los descriptores, se diseñaron las correspondientes escalas para el entrenamiento específico del panel. Se seleccionaron especies de pescado en función de que presentaran una intensidad alta o baja para algunos de los atributos seleccionados, siendo en definitiva los propios integrantes el panel los que decidieron cuales eran los más convenientes para cada característica a evaluar. Las valoraciones se realizaron utilizando una escala no estructurada de 10 cm con anclajes en los extremos.

Resultados y Discusión

En la tabla 1 se presentan los descriptores utilizados para los perfiles sensoriales de las tres especies así como sus definiciones, algunos de los cuales ya han sido previamente utilizados probando diferentes dietas

con las mismas especies (Izquierdo *et al.*, 2005; Montero *et al.*, 2005). Aunque el total de descriptores es 21, no todos han sido incluidos para todas las especies, siendo el perfil con mayor número el del besugo (18 descriptores) y la lubina el de menor (15). Estos han sido agrupados en cinco bloques atendiendo al tipo de percepción sensorial: olor, apariencia, textura, sabor y gusto residual tras la deglución.

Tabla 1. Definición de los descriptores usados para estudios de perfiles en dorada, lubina y besugo

Atributos	Definiciones
Olor	
Intensidad global	Intensidad del olor, su persistencia
Marino***	Intensidad de olor a mar, a algas
A marisco**	Intensidad de olor a marisco, a crustáceos
Aceitoso	Intensidad de olor a aceite de pescado
Apariencia	
Color	Intensidad de color blanco al corte
Brillo	Intensidad de luz reflejada al corte
Exudado*	Cantidad de líquido expelido por el filete
Integridad del miómero	Facilidad para disgregar los miómeros musculares
Textura	
Firmeza	Firmeza de la carne al presionar contra el paladar
Jugosidad	Líquido liberado durante la masticación
Gomosidad**	Grado de cohesión durante la masticación
Masticabilidad	Numero de masticaciones necesarias deglutir
Adherencia	Grado en que el filete disgregado se adhiere a los dientes
Carácter graso	Percepción de una película grasa en la boca
Sabor	
Intensidad global	
Marino ***	Intensidad del sabor, su persistencia
A marisco**	Intensidad de sabor a mar, a algas
Aceitoso	Intensidad de sabor a marisco, a crustáceos
Dulce**	Intensidad de sabor a aceite de pescado
Áspero**	Intensidad de sabor dulce
Gusto residual	Intensidad de sabor áspero
	Persistencia del sabor tras la deglución

* sólo en el perfil de la dorada; ** sólo en el perfil del besugo; *** no utilizados para el besugo

Para las escalas, las especies empleadas han sido merluza, salmón, fletan, lenguado, sama roquera, rape, mújol, panga y emperador. Al igual que con los descriptores, no todas se han considerado en los tres perfiles, siendo incluidas atendiendo al atributo específico a calibrar con cada una.

Bibliografía

Izquierdo, M.S., D. Montero, L. Robaina, M.J. Caballero, G. Rosenlund y R. Ginés. 2005. Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture*, 250:431-444.

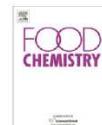
Luna, L., J.M. Fernández, M. Incera y C. Duque. 2004. *Hábitos de Consumo de Dorada y Lubina en España en el Periodo 2003-2004*. Ed. MAPA, Madrid, 2004, 64 pp.

Montero, D., L. Robaina, M.J. Caballero, R. Ginés y M.S. Izquierdo. 2005. Growth, feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils. A time-course study on the effect of a refeeding period with a 100% fish oil diet. *Aquaculture*, 248:121-134.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los Planes Nacionales de Acuicultura de JACUMAR.

OTRAS PUBLICACIONES



Sensory, physical, chemical and microbiological changes in aquacultured meagre (*Argyrosomus regius*) filets during ice storage

M.D. Hernández^{a,*}, M.B. López^b, A. Álvarez^a, E. Ferrandini^b, B. García García^a, M.D. Garrido^b

^aIMIDA Acuicultura, Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia, P.O. Box 65, 30740 San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain

^bTecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30071 Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 June 2008

Received in revised form 31 July 2008

Accepted 17 September 2008

Keywords:

Meagre
Argyrosomus regius
Filets
Ice storage
Fish quality
Shelf-life

ABSTRACT

Commercial-sized meagre filets were stored on ice at 4 °C for 18 days, in order to evaluate the loss of quality and freshness that occurs over this period of time. Physicochemical (pH, thiobarbituric acid (TBA), total volatile basic nitrogen (TVBN), trimethylamine (TMA), water activity, water-holding capacity, colour, texture and fatty acid profile), sensory and microbiological analyses were carried out at 0, 4, 7, 11, 14 and 18 days of storage. As part of the sensory analysis, attributes associated with fillet appearance, odour and texture were examined. Variations in pH, TBA, TVBN and TMA were observed throughout the storage period, although only TBA displayed a significant correlation with time ($r = 0.96$). L^* and b^* values increased, and the chroma and hue values decreased, reflecting the colour changes experienced by the filets over time. With regards to the texture profile, hardness was significantly correlated with time ($r = -0.68$). All the sensory analysis attributes exhibited significant variations and correlations close to 1.00 with storage time, which is a reflection of the filets' loss of freshness. The correlation coefficients between aerobic mesophilic and psychrophilic bacteria, enterobacteria and coliform counts on the one hand and storage time on the other were also very high (0.99–1.00). A regression analysis using the acceptability limit set by the ICMSF standard (1986) for total aerobic mesophilic counts (7 log cfu/g) yielded a shelf-life for meagre filets of 9 days. The TBA, sensory and microbiological analyses displayed very strong correlations with storage time, and they may be considered suitable indicators for evaluating meagre fillet spoilage during refrigerated storage.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The introduction of new cultured species over the last decade has contributed to making aquaculture more profitable in Spain. In this sense, meagre has been shown to be an interesting species for commercial production, aiding in the diversification of marine aquaculture. Endowed with excellent biological characteristics for rearing, its farming in Europe is currently increasing. Meagre is a species commonly found throughout the Mediterranean and the Black Sea, as well as on the Atlantic European and East African coasts. It is a coastal species that can be found both close to the bottom of the continental shelf and near the surface, within a depth range of 15–200 m. It may also be found in estuaries and coastal lakes (Griffiths & Heemstra, 1995). It can reach a weight of more than 50 kg in the wild. Being a euryhaline species, it can adapt to very diverse environments, making even land based cultivation possible in brackish water media. It withstands tank captivity perfectly well, reaching high growth rates during on-growing, with good feed conversion rates (Jiménez et al., 2005; Pastor, Grau,

Massutí, & Sánchez-Madrid, 2002). Furthermore, it exhibits high fertility rates, and so far it has not shown any significant pathological manifestations.

Many fish species have been consumed for quite some time in the form of filets (salmon, perch, sole, cod, trout, halibut, ling, hake and swordfish), whilst others, such as sea bass and sea bream, have been consumed whole up until now, but are starting to be marketed as filets. Specifically in the case of Spain, the format with the greatest future seems to be filleted fish. According to professionals in fish sales, the consumption of filets will continue to increase in the future, due to new lifestyle habits as people have less time to cook, and the younger generations' increasing habit of consuming prepared products (GIAUC, 2006). In this sense, meagre shows good marketing potential, as both its size and its body shape allow for optimal filleting. Some studies have shown that the shelf-life of filleted fish is shorter than that of whole fish (Chytiri, Chouliara, Savvaïdis, & Kontominas, 2004; Paleologos, Savvaïdis, & Kontominas, 2004; Taliadouros, Papadopoulos, Domvridou, Savvaïdis, & Kontominas, 2003). Whilst this may be true, meagre raised in captivity develop lower amounts of muscular fat than other aquacultural species, which permits their preservation under refrigeration for longer periods of time (Poli et al., 2003).

* Corresponding author. Tel./fax: +34 968 184518.
E-mail address: mdolores.hernandez6@carm.es (M.D. Hernández).

The high levels of moisture, nutrient content, and high pH render fish an easily perishable product, often going bad within a short period of time under refrigerated conditions. Microbial activity is the main culprit behind the changes that occur in fish during the last stages of spoilage. The extension of its shelf-life by means of refrigeration is essential due to a reduction in the growth rate and metabolic activity of the microorganisms that cause the deterioration (Cakli, Kilinc, Cadun, Dincer, & Tolasa, 2007). Freshness is the most important attribute when evaluating the quality of fish, depending mainly on the procedures followed during handling, processing and storage, from the moment it is caught until it reaches the consumer. Both the processes of filleting and gutting, as well as cross-contamination amongst fish and/or a large surface area exposed to environmental microbial contamination reduce the shelf-life of fish (Poli et al., 2006).

Microbiological, biochemical and sensory methods are used to evaluate the freshness and quality of fish during handling and storage, with appearance, odour, taste and texture being the main attributes of freshness (Koutsoumanis, Giannakourou, Taoukis, & Nychas, 2002). Given the fact that the results of these analyses do not always correlate well, it is important to use all three methods when the purpose is to adequately define the freshness of a particular species of fish (Paleologos et al., 2004).

For these reasons, the objective of our study was to estimate the shelf-life of commercial-sized meagre fillets held in ice storage. Fish fillet spoilage was evaluated by means of sensory, microbiological and physicochemical analyses over a period of 18 days. All evaluated parameters were used to identify those factors that are the most sensitive to postmortem changes, in order to use them as indicators of fillet deterioration.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of fish samples and storage conditions

The fish (2370 ± 129 g) were obtained from a fish farm located in south-eastern Spain, where they had been raised in floating cages, feeding on a commercial feed (44–50% protein, 20–22% lipids, 8.5–11% ash, and 0.4–1.5% fibre). Twenty-four hours after slaughter (by immersion in a water/ice mixture), they arrived packaged in polystyrene boxes, covered with a layer of flake ice, at the Marine Aquaculture Station at San Pedro del Pinatar, which forms part of the Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA). Once in the laboratory, they were filleted with their skin left on. The fillets (925 ± 69 g) were wrapped in a thin polyethylene film and placed in polystyrene boxes, then covered with flake ice. The polystyrene boxes, provided

with holes for water drainage, were stored refrigerated at 4 ± 0.5 °C for 18 days. The ice/fish ratio (2/1) was held constant throughout the entire experiment.

Samples were taken on day 0, 4, 7, 11, 14 and 18 of storage, corresponding to day 2, 6, 9, 13, 16 and 20 postmortem. The fillets were divided into four lots, and four fillets from each lot were taken on each sampling day to perform the different analyses. Two were used for physicochemical and microbiological analyses, and the other two for the sensory analysis. The sample collection for each analysis was carried out as shown in Fig. 1.

2.2. Physicochemical analyses

2.2.1. Proximate composition

A proximate analysis was performed on 8 fish on day 0 of storage. Proximate analyses of the filleted fish were based on the procedures set by the AOAC (1997). The skinless muscle was ground and homogenised. The muscle composition from individual fish was determined as follows: crude protein, using the Kjeldahl method with a 6.25 nitrogen-to-protein conversion factor; crude fat, by petroleum ether extraction using the Soxhlet method and a SOXTEC System HT6 extractor; moisture by drying to constant weight at 105 ± 1 °C; and total ash by incineration to constant weight at 450 ± 2 °C in a muffle furnace.

2.2.2. Fatty acids

In order to determine the fatty acid profile during storage, the fat from each sample was extracted using the method described by Folch, Lees, and Sloane-Stanley (1957). Fatty acids were methylated using the method of Stoffel, Chu, and Ahrens (1959), and then analysed using a Varian 3900 gas chromatograph (Varian Inc., Palo Alto, CA) equipped with a flame ionisation detector, and a CP-Sil 88 (50 m × 0.25 mm id) column (Varian). Chromatographic peaks were identified by comparison with a commercial 37 FAME Mix standard (Supelco, Bellefonte, PA).

2.2.3. pH, thiobarbituric acid, total volatile basic nitrogen, trimethylamine, water activity and water-holding capacity

Each portion of the two fillets designated for each analysis was homogenised separately. Five grams of each sample were blended with 10 ml distilled water. The pH of the fish homogenate was measured using a digital pH metre (Orion, Beverly, MA), standardised at pH 4.01 and 7.00. Thiobarbituric acid (TBA, mg malonaldehyde/kg fish flesh) was determined according to the method described by Botsoglou et al. (1994). Total volatile basic nitrogen (TVBN, mg N/100 g fish flesh) was measured using the modified method of Malle and Tao (1987), whilst the method used by Malle

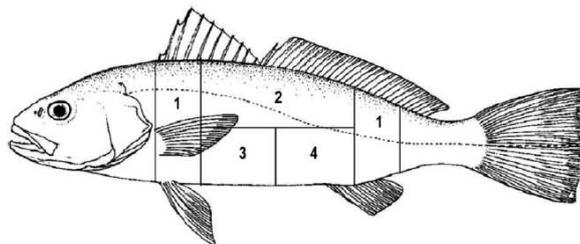


Fig. 1. Diagram of the fillet distribution on the meagre used for physicochemical and microbiological analyses. Each number indicates the part of the fillet used for the different analyses: (1) microbiological count; (2) texture; (3) fatty acid profile, pH, TVBN and TMA; (4) TBA, WHC and a_w . (Modification by Whitehead, Bauchot, Hureau, Nielsen, & Tortonese (1986)).

and Poumeyrol (1989) was followed for trimethylamine measurements (TMA, mg N/100 g fish flesh). Water activity (a_w) values were determined at 25 °C using a Novasina TH 200 instrument (Axair A6, Novasina, Pfäffikon, Switzerland). The water-holding capacity (WHC) analysis was based on the method described by Grau and Hamm (1953). pH, a_w and WHC measurements were taken from fresh samples, and the rest from frozen samples.

2.2.4. Colour measurements

A Minolta Chroma Meter CR400 (Minolta, Osaka, Japan) was used for colour measurements. Colours were expressed as CIELab coordinates. In this system, L^* represents the colour lightness on a 0–100 point scale from black to white; a^* is the position between red (+) and green (–); and b^* is the position between yellow (+) and blue (–). The colour intensity is expressed by a chroma value (C_{ab}^*), whilst hue (H_{ab}^*) corresponds to the name of the colour as found in its pure state on the spectrum. These values were calculated according to the formulae:

$$C_{ab}^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \text{ and } H_{ab}^* = \arctan(b^*/a^*)$$

Four measurements were taken for each fillet: three on the dorsal section, at an equal distance from one another, with the middle point being located at the level of the cut made in the dorsal fin groove, and the fourth one on the ventral part of the fillet next to the belly, at a point corresponding to the anus on a whole fish.

2.2.5. Texture measurements

Texture profile analyses (TPA) were performed using a QTS-25 texture analyser (Brookfield CNS Farnell, Borehamwood, Hertfordshire, UK) equipped with a 25 kg load cell and Texture Pro V. 2.1 software. The samples, measuring 3.5 × 3.5 × 0.7 cm, were compressed perpendicularly using a 20 mm diameter cylindrical probe. The testing conditions were two consecutive cycles at 25% compression, cross-head movement at a constant speed of 50 mm/min, and a trigger point of 0.05 N. Texture variables (hardness, gumminess, adhesiveness, cohesiveness, chewiness and springiness) were calculated as described by Bourne (1978).

2.3. Sensory evaluation

Whole, raw fillets with their skin were used for the sensory analysis, evaluated on both sides. A panel of seven judges were trained according to standard ISO 8586-1 (1993), to evaluate the appearance of the flesh and the skin, the odour and the texture of the fish. A total of 11 attributes were evaluated, each one receiving a score on a continuous scale of demerit points from 1–5, as changes occurred during storage (Table 1).

Table 1
Attributes assessed during the sensory evaluation of meagre fresh fillets

Parameter being assessed		Score	
Skin appearance	Colour	1: Intense	5: Weak
	Shine	1: Very shiny	5: Matte
Flesh appearance	Colour	1: Intense	5: Weak
	Shine	1: Very shiny	5: Matte
	Muscle	1: Hydrated, adhered myotomes	5: Dry, separated myotomes
Odour	Fresh fish	1: Strong	5: Weak
	Acidic	1: Strong	5: ND
	Rancid	1: Strong	5: ND
	Ammoniacal	1: Strong	5: ND
Texture	Springness	1: Very elastic	5: Not elastic
	Adhesiveness	1: Very adhesive	5: Not adhesive

ND, not detected.

2.4. Microbiological analysis

Microbiological counts were determined by placing a 10 g sample in 90 ml of 0.1% peptone–water (Oxoid code CM 9), and homogenising it with a stomacher (IUL-Instruments, Barcelona, Spain). From this dilution, other decimal dilutions were prepared and plated on the appropriate media. Total viable aerobic bacterial counts were determined by the pour plate method, using plate count agar (PCA, Oxoid code CM 325). The inoculated plates were incubated at 30 °C for 72 h for total viable mesophilic counts, and at 15 °C for 5 days for psychophilic counts. For enterobacteria counts, the sample was inoculated into 10 ml of molten (45 °C) violet red bile glucose agar (VRBGA, Oxoid code CM 485). After setting, a 10 ml overlay of molten medium was added, and the plates incubated at 37 °C for 24 h. Large colonies with purple haloes were counted. A chromogenic medium (Oxoid code CM 956) was used for culturing coliform/*Escherichia coli* bacteria, with incubation at 37 °C for 24 h.

In order to determine the presence of *Salmonella* and *Shigella*, a pre-enrichment process was performed. To that end, 25 g of sample were homogenised with 225 ml of nutrient broth in the stomacher, and then incubated for 18 h at 37 °C. Following this first incubation, an aliquot of 0.1 ml was taken and incubated in 10 ml of Rappaport Vassiliadis medium (RV, Oxoid code CM 669) for 24 h at 41.5 °C. A second aliquot of 1 ml was also incubated in selenite broth (Oxoid code CM 395) for 24 h at 37 °C. Samples from each of these broths were then isolated on plates, using an XLD medium (Oxoid code CM 469), incubating them at 37 °C for 24 h. This was then confirmed using API 20 (Oxoid code 20100).

Listeria monocytogenes counts were taken from two incubations: a pre-enrichment in half-Fraser broth at 37 °C for 24 h, and an enrichment in Fraser broth (Oxoid code CM 895) at 37 °C for 24 h, using a miniVidas system to confirm the presence/absence of these bacteria. Cefrimide fusidin cephaloridine agar (CFC, Oxoid code CM 559, supplemented with SR 102) incubated at 20 °C for 2 days was used to detect the presence of *Pseudomonas*.

The presence of *Shewanella* was determined by means of three separate cultures, each using a different medium. It was considered to be present only if the growth proved to be positive in all three cases. The conditions for each incubation were: MacConkey agar medium (Oxoid code CM 7) at 30 °C for 24 h; iron agar (IA, Oxoid code CM 867) at 20 °C for 4 days; and blood agar medium (Oxoid code CM 55) at 25 °C for 3 days.

Microbiological data were transformed into logarithms of the number of colony-forming units (cfu g⁻¹). All plates were visually examined for the typical colony types and morphological characteristics associated with each growth medium. All counts were performed in duplicate.

2.5. Statistical analysis

In order to detect statistically significant differences, experimental values were compared using a one-way analysis of variance and a correlation analysis, to evaluate the influence of storage time on the parameters measured. The significance level was set at $p < 0.05$. Values throughout the text are expressed as mean ± standard deviation. A regression analysis was used to determine the shelf-life of meagre fillets; the data were fitted by a linear model, $Y = a + bX$, where Y represents the mesophilic count and X is the time in storage. A factor analysis was used to determine which variables, independent as well as dependent, had greater factor loadings or weights, with those having a value greater than 0.7 being considered significant (Hair, Anderson, Tatham, & Black, 1999). All data were normalised ($Z_i = (X_i - S_i)/X_i$), and the factors were extracted using the principal components method. To facilitate the interpretation of the results, the axes were rotated according to the Varimax method.

3. Results

3.1. Physicochemical analyses

3.1.1. Proximate analysis

The macronutrient composition of meagre fillets was 19.8% protein, 2.49% fat, 76.3% moisture and 1.26% ash.

3.1.2. Fatty acids

Fig. 2 shows the total saturated, monounsaturated and unsaturated fatty acids found in meagre fillets on the different sampling days. The percentage of saturated fatty acids fell within a range of 31.1–33.0%, whereas the range for monounsaturated was 25.7–30.7% and for polyunsaturated 38.1–43.2%. No statistically significant differences were found in SFA, MUFA or PUFA over the 18 day storage period.

3.1.3. pH, TBA, TVBN, TMA, a_w and WHC

Table 2 summarises the average values and standard deviations for the physicochemical parameters analysed on each sampling day. Of all the parameters measured, only TBA exhibited a significant correlation with storage time ($r = 0.96$), gradually increasing with each sampling day. The initial TBA value was 0.10 mg MDA/kg (day 0), and the final value was 2.55 mg MDA/kg (day 18), the differences being statistically significant ($p < 0.05$) from day 7 on.

The pH varied between 6.43 and 6.71, with significant differences between days 4 and 11, which corresponded to the minimum and maximum value, respectively. However, they did not correlate significantly with time. The average TVBN (16.7–20.4 mg N/100 g) and TMA (12.7–14.9 mg N/100 g) values remained relatively constant throughout the storage period, in spite

of showing significant differences between certain days of the experiment. The a_w and WHC values showed no significant changes over the 18 days of storage (Table 2).

3.1.4. Colour measurements

With the exception of a^* , all parameters defining meagre fillet colour showed a significant correlation with storage time (Table 3). The minimum value for L^* (43.95) occurred on day 0, and the maximum on day 18 (47.08); this parameter increased throughout the storage time ($r = -0.49$), with significant differences being observed as of day 7. With regards to chromaticity parameters, only b^* showed significant changes, oscillating between -5.48 (day 0) and -4.08 (day 11) ($r = 0.59$) with a gradual increase. The chroma value decreased with time in storage ($r = -0.61$), varying between 5.58 (day 0) and 4.23 (day 11). No significant changes were seen for hue over storage time, but it did show a significant correlation ($r = -0.38$).

3.1.5. Texture measurements

The average values for hardness, cohesiveness and elasticity (Table 4) displayed significant variations ($p < 0.05$) on the different sampling days; however, only hardness correlated significantly with storage time ($r = -0.68$). This parameter decreased during storage, with values close to 27 up until day 7, and varying between 23 and 25 afterwards.

3.2. Sensory analysis

Table 5 shows the average scores given by the panelists to each of the attributes examined on each sampling day. All sensory parameters correlated with time. According to the scale used,

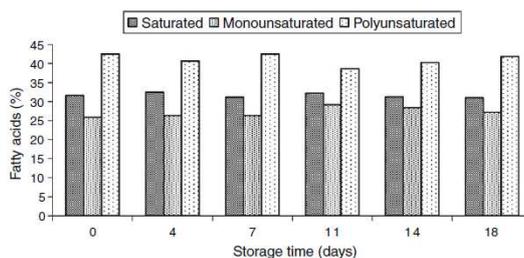


Fig. 2. Comparative evolution of fatty acid content in meagre fillets during ice storage.

Table 2
Meagre muscle chemical and physical parameter changes during ice storage

Days of storage	0	4	7	11	14	18	r
pH	6.49 ± 0.10 ^{ab}	6.43 ± 0.04 ^a	6.57 ± 0.10 ^{ab}	6.71 ± 0.13 ^b	6.49 ± 0.10 ^{ab}	6.63 ± 0.14 ^{ab}	0.29
TBA (mg MDA/kg muscle)	0.10 ± 0.04 ^a	0.24 ± 0.04 ^a	0.86 ± 0.10 ^b	0.82 ± 0.69 ^c	1.77 ± 0.57 ^c	2.55 ± 0.24 ^d	0.96 [*]
TVB-N (mg N/100 g muscle)	20.4 ± 0.97 ^a	18.2 ± 0.68 ^{bc}	17.3 ± 0.61 ^{bc}	16.7 ± 0.76 ^c	18.7 ± 0.82 ^{ab}	20.0 ± 0.48 ^a	0.26
TMA (mg N/100 g muscle)	14.3 ± 0.23 ^{ab}	14.4 ± 0.40 ^{ab}	12.7 ± 0.47 ^a	12.7 ± 0.78 ^a	14.3 ± 0.88 ^{ab}	14.9 ± 1.23 ^b	0.35
a_w	0.94 ± 0.005	0.94 ± 0.002	0.94 ± 0.002	0.94 ± 0.001	0.94 ± 0.002	0.95 ± 0.003	0.25
WHC	13.8 ± 1.99	13.0 ± 2.61	14.8 ± 4.36	13.1 ± 1.20	13.1 ± 5.49	11.8 ± 4.19	-0.14

Means ± standard deviation.

Data within the same row with different letters are significantly ($p < 0.05$) different.

r, Correlation value.

^{*} Indicates a significant correlation ($p < 0.05$).

Table 3
Colour measurements during ice storage of meagre fillets

Days of storage	0	4	7	11	14	18	r
L^*	44.0 ± 0.27 ^a	46.1 ± 0.94 ^{ab}	46.8 ± 1.09 ^b	46.7 ± 1.09 ^b	45.8 ± 0.48 ^{ab}	47.1 ± 1.31 ^b	0.49 [*]
a^*	-1.01 ± 0.25	-0.99 ± 0.24	-1.33 ± 0.31	-1.04 ± 0.38	-1.00 ± 0.22	-1.17 ± 0.31	-0.23
b^*	-5.48 ± 0.57 ^a	-5.14 ± 0.45 ^{ab}	-4.51 ± 0.38 ^{ab}	-4.08 ± 0.59 ^b	-4.86 ± 0.47 ^{ab}	-4.17 ± 0.75 ^b	0.59 [*]
(C_{75}^*)	5.58 ± 0.56 ^a	5.23 ± 0.46 ^{ab}	4.72 ± 0.30 ^{ab}	4.23 ± 0.51 ^b	4.97 ± 0.42 ^{ab}	4.35 ± 0.65 ^b	-0.61 [*]
(H_{75}^*)	1.39 ± 0.05	1.38 ± 0.04	1.28 ± 0.08	1.31 ± 0.11	1.36 ± 0.06	1.29 ± 0.12	-0.38 [*]

Means ± standard deviation.

Data within the same row with different letters are significantly ($p < 0.05$) different.

r, Correlation value.

* Indicates a significant correlation ($p < 0.05$).**Table 4**
Instrumental texture analyses during ice storage for meagre fillets

Days of storage	0	4	7	11	14	18	r
Hardness (N)	26.9 ± 1.86 ^a	27.0 ± 0.24 ^a	27.2 ± 0.82 ^a	23.2 ± 1.75 ^a	23.0 ± 1.75 ^a	25.0 ± 0.15 ^a	-0.68 [*]
Gumminess (N)	9.90 ± 0.61	9.78 ± 0.67	8.45 ± 0.87	8.95 ± 1.10	9.03 ± 1.23	9.00 ± 0.33	-0.42
Adhesiveness (Ns)	-1.40 ± 0.33	-1.26 ± 0.18	-1.47 ± 0.47	-1.09 ± 0.26	-1.33 ± 0.59	-1.07 ± 0.14	0.41
Cohesiveness	0.39 ± 0.02 ^a	0.37 ± 0.02 ^{ab}	0.31 ± 0.04 ^b	0.39 ± 0.03 ^a	0.38 ± 0.01 ^a	0.36 ± 0.01 ^{ab}	0.10
Chewiness (N mm)	42.3 ± 6.04	51.3 ± 6.48	48.0 ± 5.90	43.9 ± 6.38	47.4 ± 6.14	48.5 ± 3.22	0.00
Springiness (mm)	4.25 ± 0.38 ^a	4.87 ± 0.16 ^{ab}	5.67 ± 0.24 ^c	4.91 ± 0.10 ^{ab}	5.19 ± 0.23 ^{bc}	5.40 ± 0.48 ^{bc}	0.39

Means ± standard deviation.

Data within the same row with different letters are significantly ($p < 0.05$) different.

r, Correlation value.

* Indicates a significant correlation ($p < 0.05$).**Table 5**
Sensory evaluations of meagre fillets during the ice storage period

Days of storage	0	4	7	11	14	18	r
Skin colour	1.21 ± 0.42 ^a	1.15 ± 0.37 ^a	1.94 ± 0.58 ^b	2.14 ± 0.87 ^b	2.93 ± 0.56 ^c	3.20 ± 0.50 ^c	0.95 [*]
Skin shine	1.14 ± 0.36 ^a	1.45 ± 0.46 ^a	2.17 ± 0.95 ^{bc}	2.13 ± 0.72 ^b	2.82 ± 0.66 ^d	2.68 ± 0.71 ^c	0.87 [*]
Flesh colour	1.07 ± 0.26 ^a	1.00 ± 0.00 ^a	2.15 ± 1.02 ^b	2.52 ± 0.65 ^{bc}	2.86 ± 0.61 ^c	3.55 ± 0.63 ^d	0.93 [*]
Flesh shine	1.09 ± 0.39 ^a	1.20 ± 0.41 ^a	1.48 ± 0.62 ^a	2.14 ± 1.24 ^b	2.57 ± 0.69 ^b	3.43 ± 0.73 ^c	0.96 [*]
Muscle appearance	1.04 ± 0.19 ^a	1.08 ± 0.24 ^{ab}	1.54 ± 0.44 ^b	2.25 ± 0.79 ^c	2.61 ± 0.55 ^c	3.20 ± 0.70 ^d	0.97 [*]
Fresh odour	1.00 ± 0.00 ^a	1.10 ± 0.31 ^{ab}	1.58 ± 0.73 ^b	2.59 ± 0.64 ^c	3.25 ± 1.00 ^d	4.25 ± 0.87 ^e	0.97 [*]
Acidic odour	5.00 ± 0.00 ^a	5.00 ± 0.00 ^a	4.92 ± 0.32 ^a	4.71 ± 0.81 ^a	4.68 ± 0.72 ^a	4.13 ± 0.94 ^b	-0.85 [*]
Rancid odour	5.00 ± 0.00 ^a	5.00 ± 0.00 ^a	5.00 ± 0.00 ^a	4.75 ± 0.75 ^a	4.77 ± 0.65 ^a	4.04 ± 0.95 ^b	-0.79 [*]
Ammoniacal odour	5.00 ± 0.00 ^a	5.00 ± 0.00 ^a	5.00 ± 0.00 ^a	4.89 ± 0.31 ^a	4.91 ± 0.27 ^a	3.71 ± 1.37 ^b	-0.82 [*]
Springiness	1.11 ± 0.28 ^a	1.20 ± 0.41 ^a	1.69 ± 0.55 ^b	2.52 ± 0.74 ^c	2.68 ± 0.55 ^c	3.27 ± 0.63 ^d	0.98 [*]
Adhesiveness	4.95 ± 0.21 ^a	4.48 ± 0.41 ^{ab}	3.92 ± 0.90 ^c	3.98 ± 0.75 ^{bc}	3.23 ± 0.71 ^d	2.32 ± 0.46 ^e	-0.97 [*]

Means ± standard deviation.

Data within the same row with different letters are significantly ($p < 0.05$) different.

r, Correlation value.

* Indicates a significant correlation ($p < 0.05$).

acidic, rancid and ammoniacal odours were not detected until day 18. By contrast, the fresh odour, which was quite prominent on day 0, became increasingly weaker. The rest of the attributes showed significant differences after day 7, except for fillet shine, which began to fade after day 11 of storage.

3.3. Microbiological analysis

The mesophilic and psychrophilic aerobic, enterobacteria and coliform counts for the meagre fillets during the ice storage period correlated with time, yielding very high coefficients (0.99–1.00).

Table 6
Microbiological evaluation (log ufc/g muscle) of meagre muscle during ice storage

Days of storage	0	4	7	11	14	18	r
Total aerobic mesophilic	3.11 ± 0.27 ^a	4.87 ± 0.27 ^b	5.77 ± 0.26 ^c	7.10 ± 0.19 ^d	9.06 ± 0.18 ^e	11.2 ± 0.64 ^f	0.99 [*]
Total aerobic psychophilic	2.82 ± 0.41 ^a	4.69 ± 0.30 ^b	5.53 ± 0.32 ^c	7.07 ± 0.17 ^d	8.85 ± 0.18 ^e	10.8 ± 0.30 ^f	0.99 [*]
Enterobacteria	1.69 ± 0.21 ^a	4.80 ± 0.06 ^b	6.70 ± 0.06 ^c	8.74 ± 0.26 ^d	11.3 ± 0.19 ^e	14.3 ± 0.07 ^f	1.00 [*]
Coliforms	1.95 ± 0.38 ^a	4.78 ± 0.11 ^b	6.45 ± 0.08 ^c	8.58 ± 0.22 ^d	11.2 ± 0.18 ^e	14.2 ± 0.16 ^f	1.00 [*]

Means ± standard deviation.

Data within the same row with different letters are significantly ($p < 0.05$) different.

r, Correlation value.

<10, negative counts; ABS: absence.

* Indicates a significant correlation ($p < 0.05$).

Table 7
Rotated factor loading matrix (VARIMAX) for the commonality attributes and values and factor statistics

		Factor 1	Factor 2	Factor	Eigenvalue	(%) Total variance	Cumulative eigenvalue	(%) cumulative
Time of storage		0.9744*	0.1145	1	18.0569	54.7178	18.0569	54.7178
				2	4.9263	14.9282	22.9832	69.6459
Physicochemical analysis	pH	0.3891	-0.2084					
	TBA	0.9492*	0.1344					
	TVBN	0.3190	-0.0051					
	TMA	0.2575	-0.5149					
	a_w	-0.0218	0.1696					
	WHC	-0.2150	0.1847					
Colour	L^*	0.5161	0.5195					
	a^*	-0.0674	-0.7722*					
	b^*	0.5074	0.6731					
	C_{ab}	-0.5235	-0.6172					
	H^*_{ab}	-0.2735	-0.8534*					
Texture	Hardness	-0.1342	0.0052					
	Gumminess	0.0597	-0.1549					
	Adhesiveness	0.3227	-0.1495					
	Cohesiveness	0.0760	-0.3796					
	Chewiness	0.0658	0.1668					
	Springiness	0.4420	0.6518					
Sensory evaluation	Skin colour	0.9458*						
	Skin shine	0.8596*						
	Fresh odour	0.9819*	0.0195					
	Flesh colour	0.9196*	0.2305					
	Flesh shine	0.9788*	0.0398					
	Muscle appearance	0.9826*	0.0166					
	Springiness	0.9718*	0.0777					
	Adhesiveness	-0.9515*	-0.1303					
	Acidic odour	-0.8552*	-0.0927					
	Rancid odour	-0.8212*	-0.0595					
	Ammoniacal odour	-0.8326*	0.0532					
Microbiological analysis	Aerobic mesophilic	0.9811*	0.0632					
	Aerobic psychophilic	0.9790*	0.0696					
	Enterobacteriaceae	0.9728*	0.1240					
	Coliforms	0.9695*	0.1097					

* Indicates a loading > 0.7.

The overall aerobic counts resulted in values of nearly 3 log cfu/g on day 0 of storage, whilst enterobacteria and coliform counts failed to reach 2 log cfu/g on the same day. On day 4, however, the counts for all the groups of microorganisms studied produced very similar results, close to 5 log cfu/g. *Pseudomonas*, *E. coli* and *Shewanella* counts were below the method detection limit (1 log cfu/g). *Listeria* and *Salmonella/Shigella* were also absent (Table 6).

3.4. Factorial analysis

The factor analysis using the principal components method for extracting factors produced two factors that explain 70% of the variance (Table 7). Factor 1 explains 54.72% of the variance, whilst factor 2 represents 14.93%. The variables most closely associated with factor 1 are TBA, sensory attributes and microbiological counts, with factor loadings of 0.95, 0.82–0.98 and 0.96–0.98, respectively. The storage time variable is significantly associated with factor 1, with a factor loading of 0.97.

4. Discussion

Compared to other types of farmed fish such as sea bream (Özogul & Özogul, 2007) or sea bass (Poli et al., 2003), meagre is a fish with a very low fat content. Low levels of fat in fish flesh represent an important quality factor that is of great interest to the consumer (Poli et al., 2003). The muscle fat and moisture levels found in our study agree with the results obtained by Poli et al. (2003). The fatty acid composition of meagre flesh falls within the range described

for Mediterranean marine species, with total percentages of 25.5–38.7% for saturated fatty acids, 13.2–27.0% for monounsaturated fatty acids, and 24.8–46.4% for polyunsaturated fatty acids (Özogul & Özogul, 2007). Within this range, however, meagre demonstrates high values for overall polyunsaturated and monounsaturated fatty acids.

When evaluating fish quality, freshness is one of the most important attributes. The freshness and quality of the end-product depend on different biological and processing factors that have an influence on the fish changes that occur postmortem (Huss, 1995). Both storage time and temperature are key factors determining the ultimate quality of the product. In our study, the “storage time” variable exhibited a very high factor loading (0.97) for factor 1, which reveals the important effect that this variable has on spoilage. Similar results were obtained by Parisi, Franci, and Poli (2002) with regards to the sensory attributes. Freshness may be estimated by defining criteria related to changes in the sensory attributes, such as appearance, odour, colour and texture, which can be measured and quantified using sensory and instrumental methods (Olafsdottir et al., 2004). The methods used to determine these parameters include microbiological, physicochemical and sensory methods. Specifically, the sensory and microbiological analyses demonstrate the deterioration of meagre filets during refrigerated storage, with very high factor loadings (always above 0.8). However, the physicochemical changes observed for the parameters analysed, albeit statistically significant, were quite minor from a quantitative point of view; only the TBA index showed a high factor loading (Table 7). It may be assumed that the statistically sig-

nificant differences observed for pH, TVBN and TMA average values amongst different sampling points are the result of variability within the parameters themselves.

The glycolysis that occurs after death in fish causes a reduction in pH. Although the pH value may vary depending on the species, a lower pH limit of 6.2 has been established for species in a state of rest prior to sacrifice (Love, 1988). During later post-mortem stages, there is a pH increase, due to decomposition of nitrogenated compounds, caused primarily by microbial activity. The intensity of this pH change depends mainly on the storage temperature, with pH values above 7.1 being indicative of decomposition. The average pH values we have obtained (6.43–6.71) fall within the typical range for fish and agree with those observed by Poli et al. (2003) for whole meagre stored under similar conditions. The pH values observed in this study failed to exhibit major changes. However, a pH increase has been observed for other marine species stored under similar conditions, such as *Sardina pilchardus* (Rodríguez-Casado et al., 2007), *Sparus aurata* (Kilinc, Cakli, Cadun, Dincer, & Tolasa, 2007), *Psetta maxima* (Rodríguez, Barros-Velázquez, Piñero, Gallardo, & Aubourg, 2006), *Dicentrarchus labrax* (Kilinc et al., 2007; Özden, Inagur, & Erkan, 2007), and *Solea senegalensis* (Tejada, De las Heras, & Kent, 2007).

Lipid oxidation in fish depends on numerous factors (the species, storage temperature, fat composition, etc.). TBA values in meagre fillets are strongly correlated with storage time ($r = 0.96$). Our values are lower than those reported for fillets from fish with higher fat contents than meagre stored under similar conditions, such as sea bass (Taliadourou et al., 2003) and trout (Chytiri et al., 2004), indicating lower oxidative rancidity, probably due to the low fat content of meagre. In addition to fat content, oxidative rancidity may be affected by other factors, such as filleting. Since a fillet has a larger surface area exposed to oxygen, it is more prone to oxidation than whole fish. Based on the TBA differences observed throughout storage, we may consider this parameter as a good index of meagre fillet deterioration when the fish is kept in ice storage.

Lipid oxidation produces a number of substances, some of which have unpleasant flavours and odours. Some may also contribute to texture changes, by forming covalent bonds with muscular proteins (Huss, 1995). The TBA variations in our study showed a very significant correlation with both fillet hardness ($r = -0.61$) and all the attributes evaluated in the sensory analysis ($r = 0.82-0.98$). According to Connell (1995), TBA values of 1–2 mg MDA/kg in fish muscle are associated with the development of questionable flavours and odours. In our study, acidic, rancid and ammoniacal odours were not detected until day 18, when the TBA value was 2.55 mg MDA/kg fish muscle. A significant positive correlation was also observed for microbiological counts ($r = 0.94-0.96$), as the oxidative reactions can be catalysed not only by the digestive enzymes of the fish itself, but also by bacterial enzymes (Huss, 1995).

Both TVBN and TMA failed to demonstrate a clear tendency to increase over the storage period. Generally, these analyses only reflect advanced spoilage, and are not considered very reliable for measuring the deterioration of certain species (Castro, Penedo Padrón, Caballero Cansino, Sanjuán Velázquez, & Millán De Larriva, 2006; Tejada et al., 2007; Özogul, Kuley, & Özogul, 2007). Castro et al. (2006) did not observe any increase in volatile bases until after 20–22 days of storage, when the fish was already considered unfit for human consumption. However, increases in these parameters during storage have been observed in many studies (Cakli et al., 2007; Kilinc et al., 2007; Özden et al., 2007). Levels of 30–35 mg TVBN/100 g in muscle are generally considered to be the acceptable limit for cold-water fish stored on ice (Connell, 1995). The TMA level for fresh fish, above which it is rejected by a sensory panel, varies depending on the fish species. Dalgaard (2003) has

noted that even in TMAO-containing seafood, little TMA is produced until the specific spoilage organisms reach high numbers. Therefore, TMA can only be used as an index of spoilage, not as an index of freshness. The increase in nitrogenated bases (TVBN and TMA) produced by the activity of proteolytic bacteria would be accompanied by a pH increase (Rodríguez, Losada, Aubourg, & Barros-Velázquez, 2004). In our study, no statistically significant changes were observed for any of the three parameters.

A large percentage of TVBNs are the product of microbial catabolism, an example of which is the reduction of trimethylamine oxide (TMAO) to TMA. Trimethylamine oxide is an important osmoregulator that can be found in concentrations of up to 1% in some teleosts, such as salmon and cod (Fraser & Sumar, 1998). TMA values for meagre fillets are above those reported for other marine species (Kilinc et al., 2007; Rodríguez et al., 2004; Rodríguez et al., 2006; Tejada et al., 2007; Özden et al., 2007), possibly due to the high levels of TMAO in meagre muscle. TMAO reduction to TMA is a reaction typical of certain bacteria (*Aeromonas* spp., psychrotolerant enterobacteria, *S. putrefaciens* and *Vibrio* spp.) that are present in spoiling fish. *S. putrefaciens* has been identified as the specific bacteria responsible for the spoilage of warm-water fish stored aerobically on ice (Huss, 1995). In our study, the *Shewanella* count yielded negative results. Even though their correlation with TMA was not significant ($r = 0.27$), enterobacteria counts reached up to 14.3 log cfu/g of flesh. However, no further analyses were performed on other TMAO-reducing bacteria that could be responsible for TMA production in meagre fillets.

In our study, colour changes occurred in meagre fillets on as early as day four. Lightness (L^*) showed a slight increase as the storage time progressed, possibly due to greater water deposits on the fish surface, as the result of melting ice and liquid retention between the polyethylene film covering the fillets. The value of b^* displayed a significant correlation ($r = 0.59$) with storage time, reflecting an evolution toward grey–blue tones as the muscle aged. (C_{ab}) decreased with days spent on ice, indicating a reduction in colour intensity. Several authors have attributed colour loss in fish muscle during storage to the oxidation of proteins with haemo groups, such as haemoglobin and myoglobin (Chaijan, Benjakul, Visessanguan, & Faustman, 2005; Richards, Modra, & Li, 2002). Furthermore, TBA values were significantly correlated with b^* (0.63) and (C_{ab}) (–0.64). According to Richards et al. (2002), haemoglobin is a possible catalyst of lipid oxidation, due to its auto-oxidative capacity.

Fish muscle texture depends on a number of intrinsic biological factors that are related to muscle fibre density, and involving both fat and collagen content. The fish death triggers autolytic and microbiological processes that make the muscle softer and less elastic (Olafsdottir et al., 2004). In our study, hardness was significantly correlated with storage time ($r = -0.68$), and with all microbiological counts (r between –0.63 and –0.65). Whilst colour and texture measurements were not good indicators of deterioration, they may be used at certain times to support data obtained by physicochemical, microbiological and sensory methods.

Freshness is the most important attribute when evaluating the quality of fish. The loss of freshness changes the sensory parameters, which have a direct effect upon the product acceptance on the part of the consumer. The first sensory changes to occur in stored fish are related to appearance and texture (Huss, 1995). In agreement with this author's findings, the first change we observed in fresh meagre fillets was a deterioration in muscle appearance and adhesiveness on day 4 of storage. A slight reduction in fresh odour was also noticed on this day, as fish began to lose the typical sea odour that they give off as fresh fish products. In fact, this was one of the attributes that was most affected during storage. On the following sampling day, a reduction in colour intensity for both the flesh and the skin began to be noticeable, and the skin was less

shiny. Poli et al. (2006) obtained similar results for sea bass fillets prepared from whole fish stored in ice. However, no unpleasant acidic, rancid or ammoniacal odours were noted ($p < 0.05$) until the end of the storage period (day 18), although off odours began to be detected on day 11 of storage.

The results of the sensory analysis demonstrate that the attributes selected are good indicators of meagre fillet deterioration during storage on ice, all of them showing a correlation with time of greater than 0.79. Similar results have been obtained for other marine species (Paleologos et al., 2004; Poli et al., 2006; Taliadourou et al., 2003). If we consider the midpoint of the scale (3) as acceptable, the results indicate that ice storage maintains the quality of fillets until the end of the storage period. However, as is to be expected, a progressive loss of quality is observed as time passes. Nevertheless, the results of the sensory analysis must be confirmed by the microbiological analysis. This ultimately determines the fish shelf-life, which is based on microbiological standards specifically developed for fish and aquaculture products.

The microbiological analysis also showed a very strong significant correlation with storage time, above 0.99 for all counts. The initial (day 0) mesophilic count (3.11 log cfu/g) indicates that the meagre fillets were of a good quality. Paleologos et al. (2004) and Taliadourou et al. (2003) found similar initial mesophilic counts for whole sea bass (3.5 log cfu/g in both studies), and higher counts for fillets (4.9 and 5.2 log cfu/g, respectively) stored under the same conditions, attributing the relatively lower quality of the fillets to contamination during the filleting process.

During aerobic storage, specific spoilage bacteria levels of 8 to 9 log cfu/g must be present to produce significant amounts of the chemical compounds associated with spoilage (Huss, 1995). In our study, these counts were not reached until days 11 (for enterobacteria and coliforms) and 14 (for total aerobes). However, the specific bacteria that cause the spoilage of meagre fillets have not been identified. *Pseudomonas* spp. and *Shewanella* spp. are the main microorganisms specifically responsible for the distinctive spoilage experienced by fish preserved aerobically on ice (Gram & Huss, 1996). In our study, the counts for both genera yielded negative results.

The ICMSF (1986) has established an aerobic mesophilic count limit of 7 log cfu/g for fish that is fit for human consumption. This value (7.10) was reached on day 11 of storage, and fillet shelf-life was subsequently determined using a regression analysis (log cfu/g = 2.9009 + 0.4396 day). Based on the regression equation, the mesophilic count limit would be reached on day 9 of storage. Similar results were obtained by Paleologos et al. (2004) and Taliadourou et al. (2003), estimating the shelf-life of sea bass fillets to be 8–9 days and 7 days, respectively.

5. Conclusions

The parameters that proved to be most sensitive to variations over storage time were TBA concentration, aerobic mesophilic, psychrophilic, enterobacteria and coliform counts, and all attributes related to the sensory analysis. They may therefore be considered as good indicators for evaluating spoilage in meagre fillets stored on ice for 18 days. The results of these analyses showed optimal quality for meagre fillets stored under these conditions, and established a microbiological shelf-life of 9 days, although based on sensory criteria, the product's shelf-life may extend beyond this period.

Acknowledgement

This research was supported by grants from the "Planes Nacionales de Acuicultura (JACUMAR)".

References

- AOAC (1997). *Official methods of analysis* (16th ed.). Washington: Association of Official Analytical Chemists.
- Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J., Papageorgiou, G. E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A. J., & Trakatelis, A. G. (1994). Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1931–1937.
- Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32(7), 62–66.
- Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., Dincer, T., & Tolasa, S. (2007). Quality differences of whole ungutted sea bream (*S. aurata*) and sea bass (*D. labrax*) while stored in ice. *Food Chemistry*, 18, 391–397.
- Castro, P., Penedo Padrón, J. C., Caballero Cansino, M. J., Sanjuán Velázquez, E., & Millán De Lariva, R. (2006). Total volatile base nitrogen and its use to assess freshness in European sea bass stored in ice. *Food Control*, 17, 245–248.
- Chaijan, M., Benjakul, S., Viessanguan, W., & Faustman, C. (2005). Changes of pigments and colour in sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) muscle during iced storage. *Food Chemistry*, 93, 607–617.
- 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 Microbiology*, 21, 157–165.
- Connell, J. J. (1995). *Control of fish quality* (4th ed.). London: Fishing News Books Limited.
- Dalgaard, P. (2003). Fish/spoilage of seafood. *Encyclopedia of food science and nutrition*. Elsevier Science, pp. 2462–2471.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.
- Fraser, O. P., & Sumar, S. (1998). Compositional changes and spoilage in fish (part II)—microbiological induced deterioration. *Nutrition and Food Science*, 6, 325–329.
- GIAUC (Grupo de Investigación en Acuicultura en la Universidad de Cantabria) (2006). *Estudio de mercado: Demanda de filete de dorada en el mercado español*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 121–137.
- Grau, R., & Hamm, R. (1953). Eine einfache methode zur bestimmung der wasserbindung im muskel. *Naturwissenschaften*, 6, 29–30.
- Griffiths, M. H., & Heemstra, P. C. (1995). A contribution to the taxonomy of the marine fish genus *Argyrosomus* (Perciformes: Sciaenidae), with description of two new species from Southern Africa. *Ichthyological Bulletin*, 65, 1–40.
- Hair, J. F., Jr., Anderson, R. E., Tatham, R. L., & Black, W. C. (1999). *Analysis Multivariante* (fifth ed.). Madrid, Spain: Prentice Hall Iberia, 832 pp.
- Huss, H. H. (1995). *Quality and quality changes in fresh fish*. FAO fisheries technical paper (Vol. 348). Rome: FAO.
- ICMSF (1986). International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Sampling plans for fish and shellfish. In: *ICMSF, Microorganisms in foods. Sampling for microbiological analysis: Principles and scientific applications*, (2nd ed., vol. 2, pp. 181–196). University of Toronto Press: Toronto, Canada.
- ISO 8586-1 (1993). Sensory analysis. General guidance for the selection, training and monitoring of assessors. Part 1: Selected assessors.
- Jiménez, M. T., Pastor, E., Grau, A., Alconchel, J. I., Sánchez, R., & Cárdenas, S. (2005). Revisión del cultivo de esciéndidos en el mundo, con especial atención a la corvina *A. regius* (Asso, 1801). *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, 21, 1–4.
- Kilinc, B., Cakli, S., Cadun, A., Dincer, T., & Tolasa, S. (2007). Comparison of effects of slurry ice and flake ice pretreatments on the quality of aquacultured sea bream (*S. aurata*) and sea bass (*D. labrax*) stored at 4 °C. *Food Chemistry*, 104, 1611–1617.
- Koutsoumanis, K., Giannakourou, M. C., Taoukis, P. S., & Nychas, G. J. E. (2002). Application of shelf-life decision system (SLDS) to marine cultured fish quality. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 375–382.
- Love, R. M. (1988). *The food fishes. Their intrinsic variation and practical implications*. London: Farrand Press.
- Malle, P., & Tao, S. H. (1987). Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation. *Journal of Food Protection*, 50, 756–760.
- Malle, P., & Poumeyrol, M. (1989). A new chemical criterion for the quality control of fish: trimethylamine/total volatile basic nitrogen (%). *Journal of Food Protection*, 52, 419–423.
- Olafsdottir, G., Nesvadba, P., Di Natale, C., Careche, M., Oehlenschläger, J., Tryggvadottir, S. V., et al. (2004). Multisensors for fish quality determination. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 86–93.
- Özden, Ö., Inagur, M., & Erkan, N. (2007). Effect of different dose gamma radiation and refrigeration on the chemical and sensory properties and microbiological status of aquacultured sea bass (*D. labrax*). *Radiation Physics and Chemistry*, 76, 1169–1178.
- Özgül, F., Kuley, E., & Özgül, Y. (2007). Sensory, chemical and microbiological quality parameters in sea bream (*S. aurata*) stored in ice or wrapped in cling film or in aluminium foil at 2 ± 1 °C. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 903–909.
- Özgül, Y., & Özgül, F. (2007). Fatty acid profiles of commercially important fish species from the Mediterranean, Aegean and Black seas. *Food Chemistry*, 100, 1634–1638.
- Paleologos, E. K., Savvaidis, I. N., & Kontominas, M. G. (2004). Biogenic amine formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-

- stored whole, gutted and filleted Mediterranean Sea bass (*D. labrax*). *Food Microbiology*, 21, 549–557.
- Parisi, G., Franci, O., & Poli, B. M. (2002). Application of multivariate analysis to sensorial and instrumental parameters of freshness in refrigerated sea bass (*D. labrax*) during shelf-life. *Aquaculture*, 214, 153–167.
- Pastor, E., Grau, A., Massuti, E., & Sánchez-Madrid, A. (2002). Preliminary results on growth of meagre, *A. regius* (Asso, 1801) in sea cages and indoor tanks. *EAS Especial Publication*, 32, 422–423.
- Poli, B. M., Parisi, G., Zampacavallo, G., Iurzan, F., Mecatti, M., & Lupi, P. (2003). Preliminary results on quality and quality changes in reared meagre (*A. regius*): body and fillet traits and freshness changes in refrigerated commercial-size fish. *Aquaculture International*, 11, 301–311.
- Poli, B. M., Messini, A., Parisi, G., Scappini, F., Vigiani, V., & Giorgi, G. (2006). Sensory, physical, chemical and microbiological changes in European sea bass (*D. labrax*) fillets packed under modified atmosphere/air or prepared from whole fish stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 444–454.
- Richards, M. P., Modra, A. M., & Li, R. (2002). Role of deoxyhemoglobin in lipid oxidation of washed cod muscle mediated by trout, poultry and beef hemoglobins. *Meat Science*, 62, 157–163.
- Rodríguez, O., Losada, V., Aubourg, S. P., & Barros-Velázquez, J. (2004). Enhanced shelf-life of chilled European hake (*Merluccius merluccius*) stored in slurry ice as determined by sensory analysis and assessment of microbiological activity. *Food Research International*, 37, 749–757.
- Rodríguez, O., Barros-Velázquez, J., Piñeiro, C., Gallardo, J. M., & Aubourg, P. (2006). Effects of storage in slurry ice on the microbial, chemical and sensory quality and on the shelf-life of farmed turbot (*P. maxima*). *Food Chemistry*, 95, 270–278.
- Rodríguez-Casado, A., Carmona, P., Moreno, P., Sánchez-González, I., Macagnano, A., Di Natale, C., et al. (2007). Structural changes in sardine (*S. pilchardus*) muscle during iced storage: Investigation by DRIFT spectroscopy. *Food Chemistry*, 103, 1024–1030.
- Stoffel, W., Chu, F., & Ahrens, E. H. J. R. (1959). Analysis of long chain fatty acids by gas-liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 31, 307–308.
- Taliadourou, D., Papadopoulou, V., Domvridou, E., Savvaids, I. N., & Kontominas, K. G. (2003). Microbiological, chemical and sensory changes of whole and filleted Mediterranean aquacultured sea bass (*D. labrax*) stored in ice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1373–1379.
- Tejada, M., De las Heras, C., & Kent, M. (2007). Changes in the quality indices during ice storage of farmed Senegalese sole (*S. senegalensis*). *European Food Research and Technology*, 225, 225–232.
- Whitehead, P. J. P., Bauchot, M. L., Hureau, J. C., Nielsen, J., & Tortonese, E. (1986). *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*. United Kingdom: UNESCO.