

N°d'ordre : 964

50376
1992
240-2

50376
1992
240-2

ANNEXES

à la

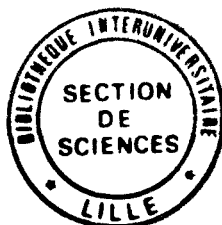
THESE DE DOCTORAT

présentée à

**L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE**

par

Pierre MALLE



**MICROBIOLOGIE DES POISSONS MARINS
EVALUATION EXPERIMENTALE DE L'ALTERATION**

TABLE DES MATIERES

- annexe 1 : Caractéristiques du "fish soluble".
- annexe 2 : Mise au point d'une "nouvelle méthode" de dosage des amines biogènes en HPLC : figures I à IX.
- annexe 3 : Résultats du dosage des amines biogènes par la "nouvelle méthode" : tableaux I à IV .

publications personnelles :

- annexe 4 : Etude expérimentale de l'action antiseptique de la fumée sur *Escherichia coli*. (1981)
Revue des Ind. Alim. Agric. 98, 3, 175-180.
- annexe 5 : Le fumage du saumon : influence de la qualité de la matière première sur l'action antiseptique de la fumée. (1981)
RTVA. 172 : 25-31.
- annexe 6 : Determination of the quality of fish by measuring trimethylamine oxide reduction. (1986)
Int.J.Food Microbiol. 3 : 225-235.
- annexe 7 : Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation. (1987)
J.Food Prot. 50 : 756-760.
- annexe 8 : Teneur en azote basique volatil total du tissu musculaire des poissons marins. (1989)
Rec. Méd. Vét. 165 : 395-402.
- annexe 9 : A new chemical criterion for the quality control of fish : trimethylamine / Total Volatile Basic Nitrogen (%). (1989)
J.Food Prot. 52 : 419-423.
- annexe 10 : Rapid determination of fish freshness by evaluation of ATP degradation reflected in K value. (1992)
Sci.Aliments. 12 : 257-269.

FISH SOLUBLE

Oxyde de triméthylamine..... 68,5 mg/100 g de produit brut

CARACTERISTIQUES**A. Physiques**

pH (à 10 % dans l'eau)..... 5,9
 Solubilité (à 50°C)..... 99,9 %
 densité..... 1160 Kg/m3

B. Chimiques

Matières sèches..... 65,0 %
 Azote total..... 9,7 %
 Azote aminé / Azote total..... 30,0 %
 Azote basique volatil..... 0,2 %
 Matières minérales..... 4,9 %
 Matières grasses..... 1,0 %
 Polysaccharides..... 0,0 %
 Cellulose..... 0,0 %
 A. aminés libres / A. aminés totaux..... 15,7 %

C. Répartition des poids moléculaires de la fraction azotée

Entre 10.000 et 15.000..... 20 %
 Inférieur à 10.000..... 65 %
 Acides aminés libres..... 15 %

D. Vitamines (en ppm)

B1..... 4,6
 B2..... 21,5
 B6..... 2,4
 B12..... 0,06
 Niacine..... 70
 Acide folique..... 0,82
 Acide pantothénique..... 18,5

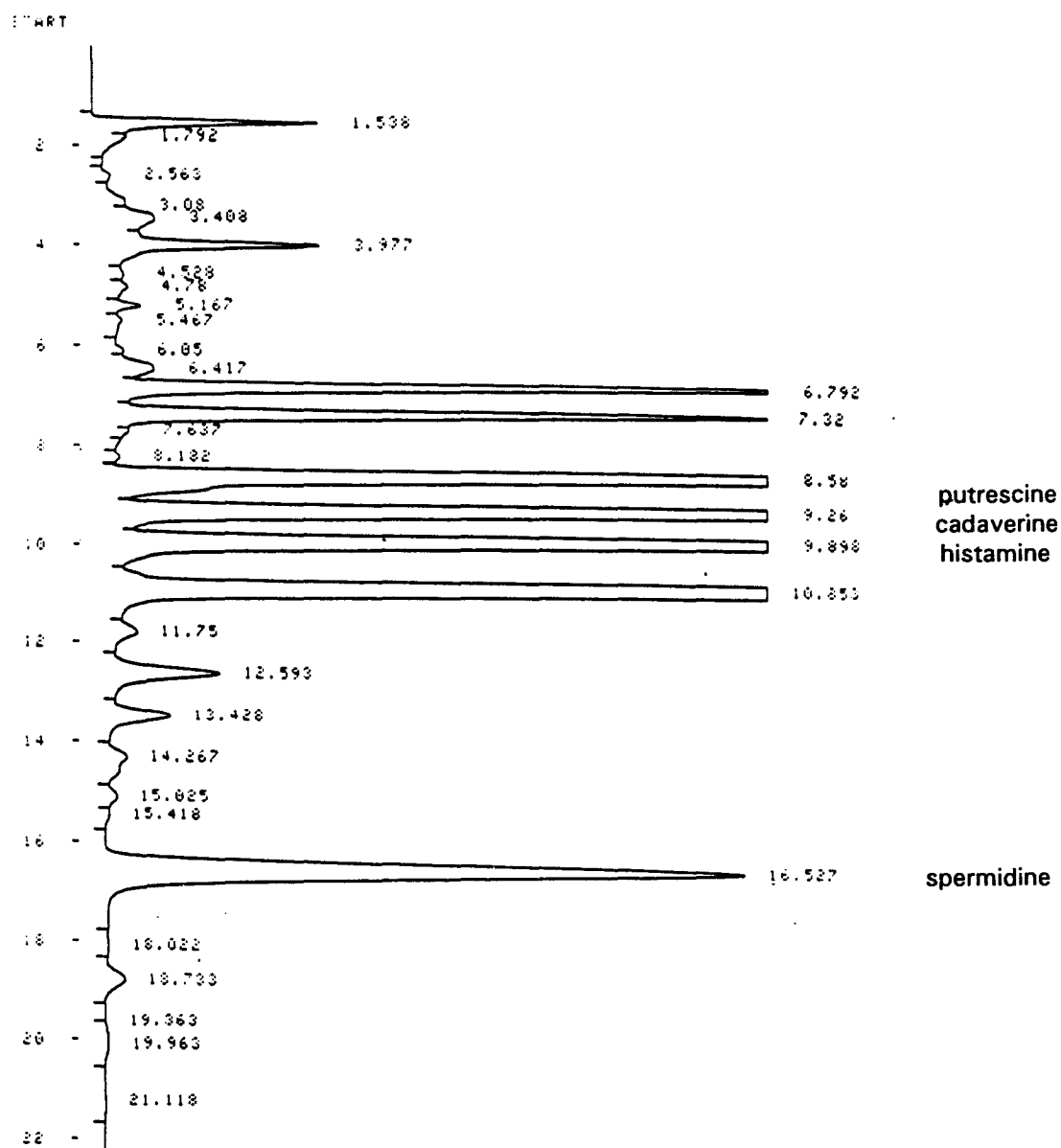


Figure I : Chromatogramme d'une solution des 5 amines standards obtenu sans gradient avec une phase mobile : 75 % acetonitrile - 25 % eau.

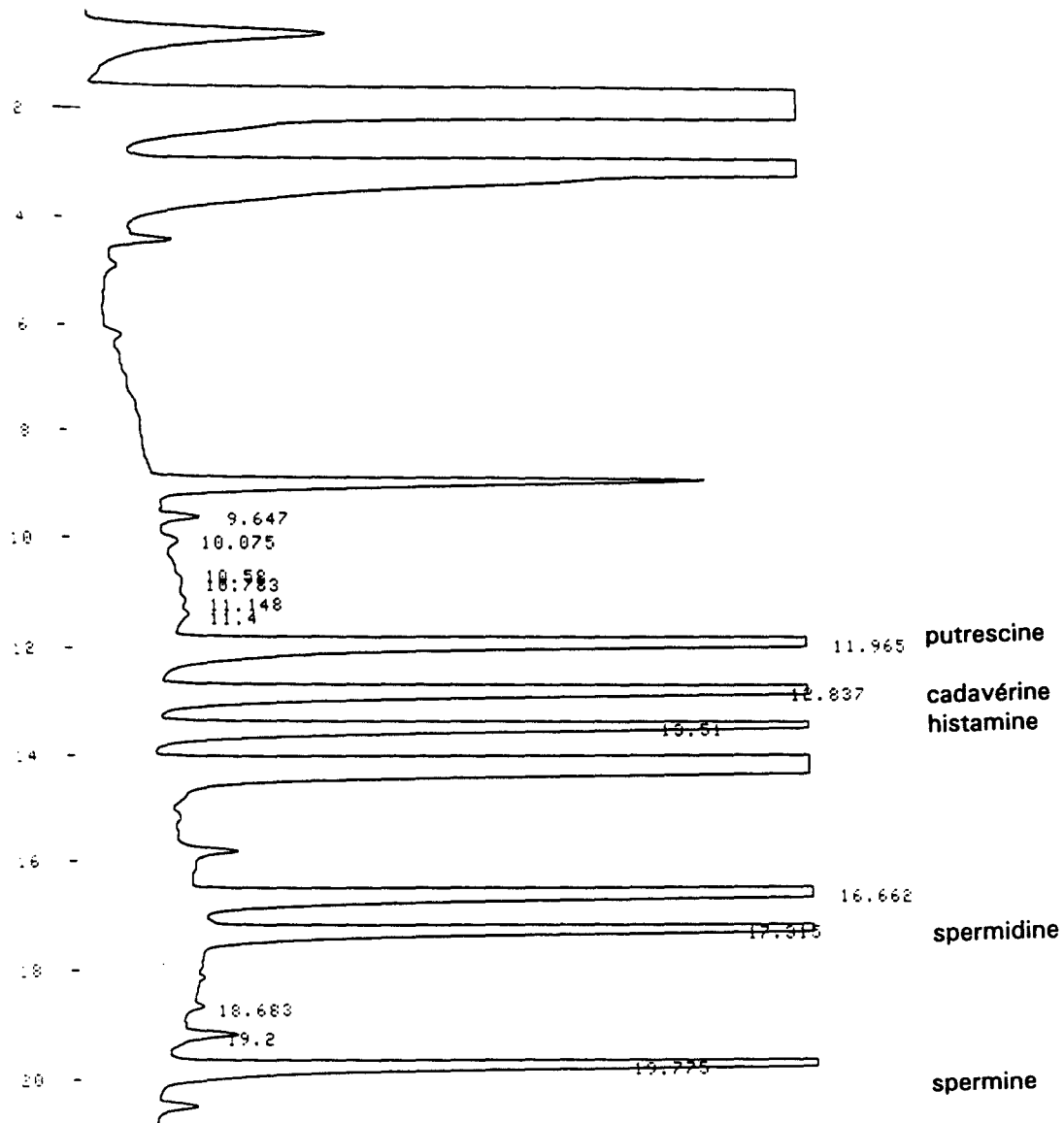


Figure II : Chromatogramme d'une solution des 5 amines standards obtenu avec le gradient mis au point.

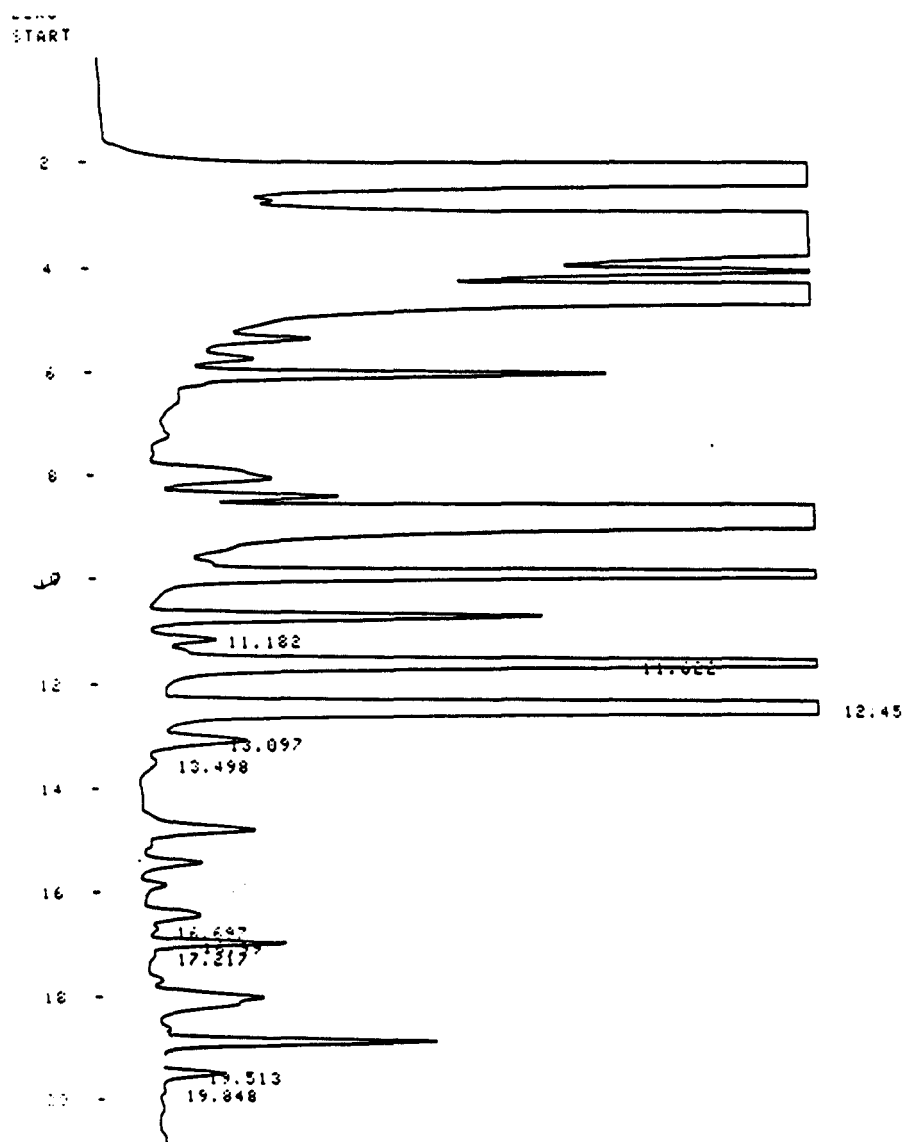


Figure III. Chromatogramme obtenu sans purification à l'éther éthylique, correspondant à un échantillon de merlan (ABVT = 37 mg N/100 g).

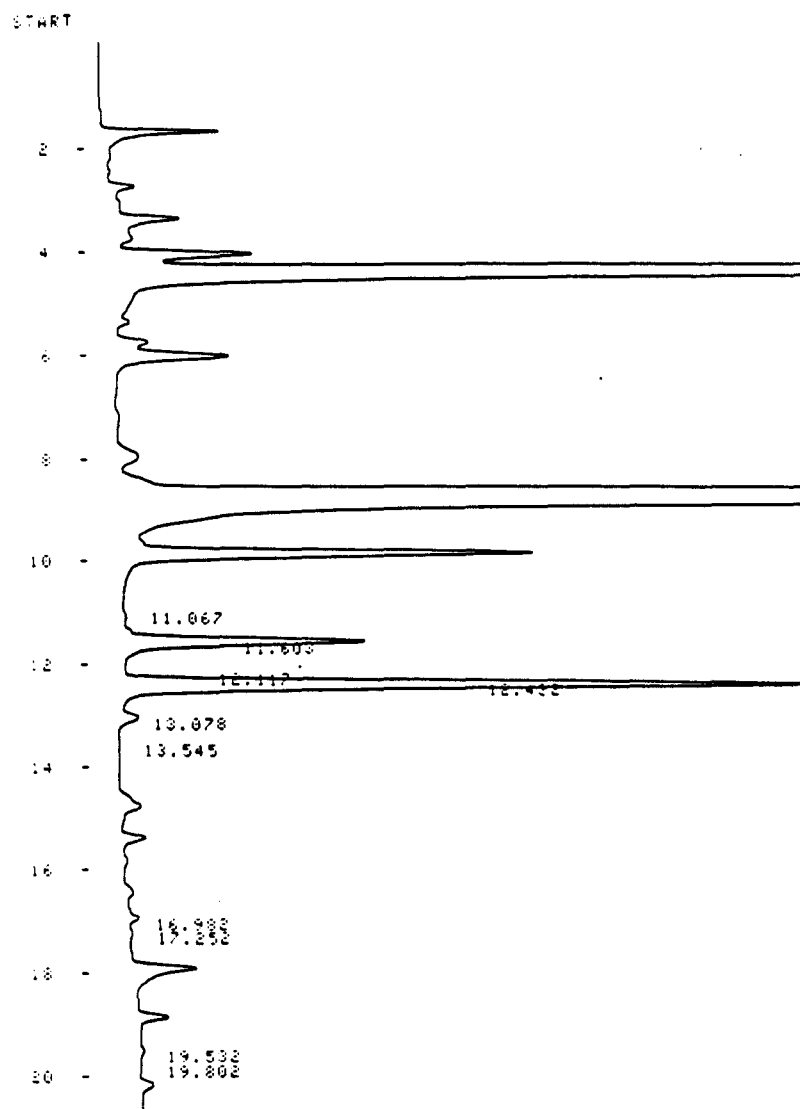


Figure IV. Chromatogramme obtenu avec purification à l'éther éthylique, correspondant à un échantillon de merlan (ABVT = 37 mg N/100 g).

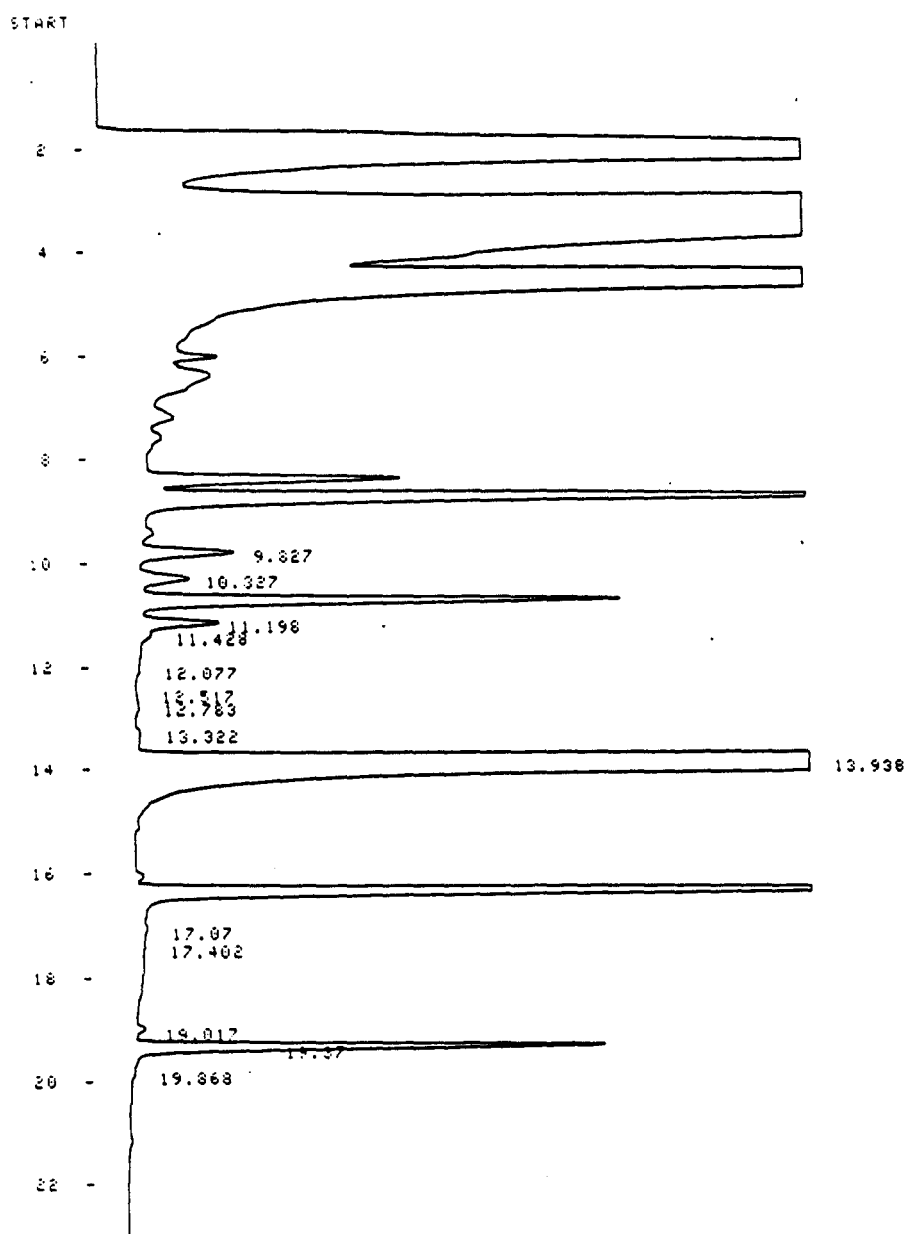


Figure V. Chromatogramme d'un extrait blanc obtenu sans purification à l'éther éthylique.

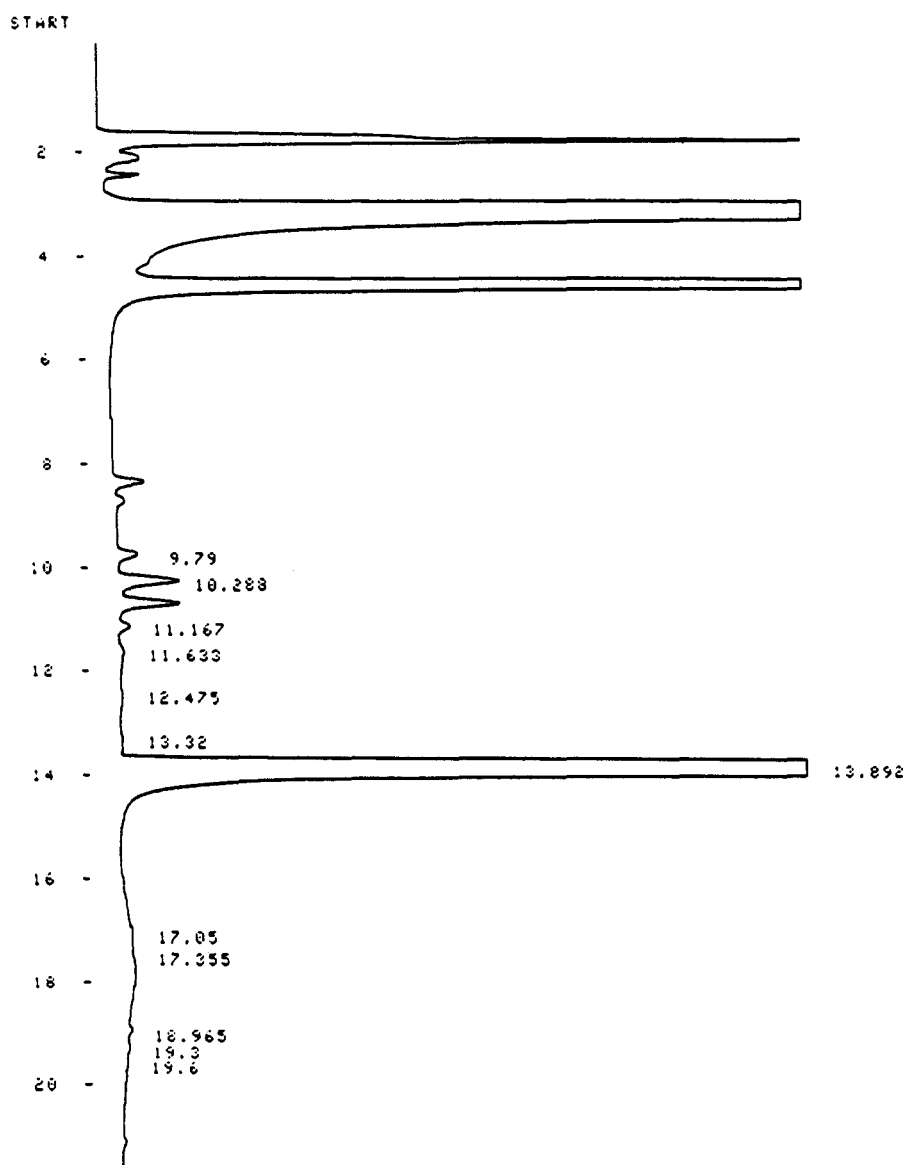


Figure VI. Chromatogramme d'une solution de chlorure de dansyl (0,5 ml dans 4 ml d'acétonitrile).

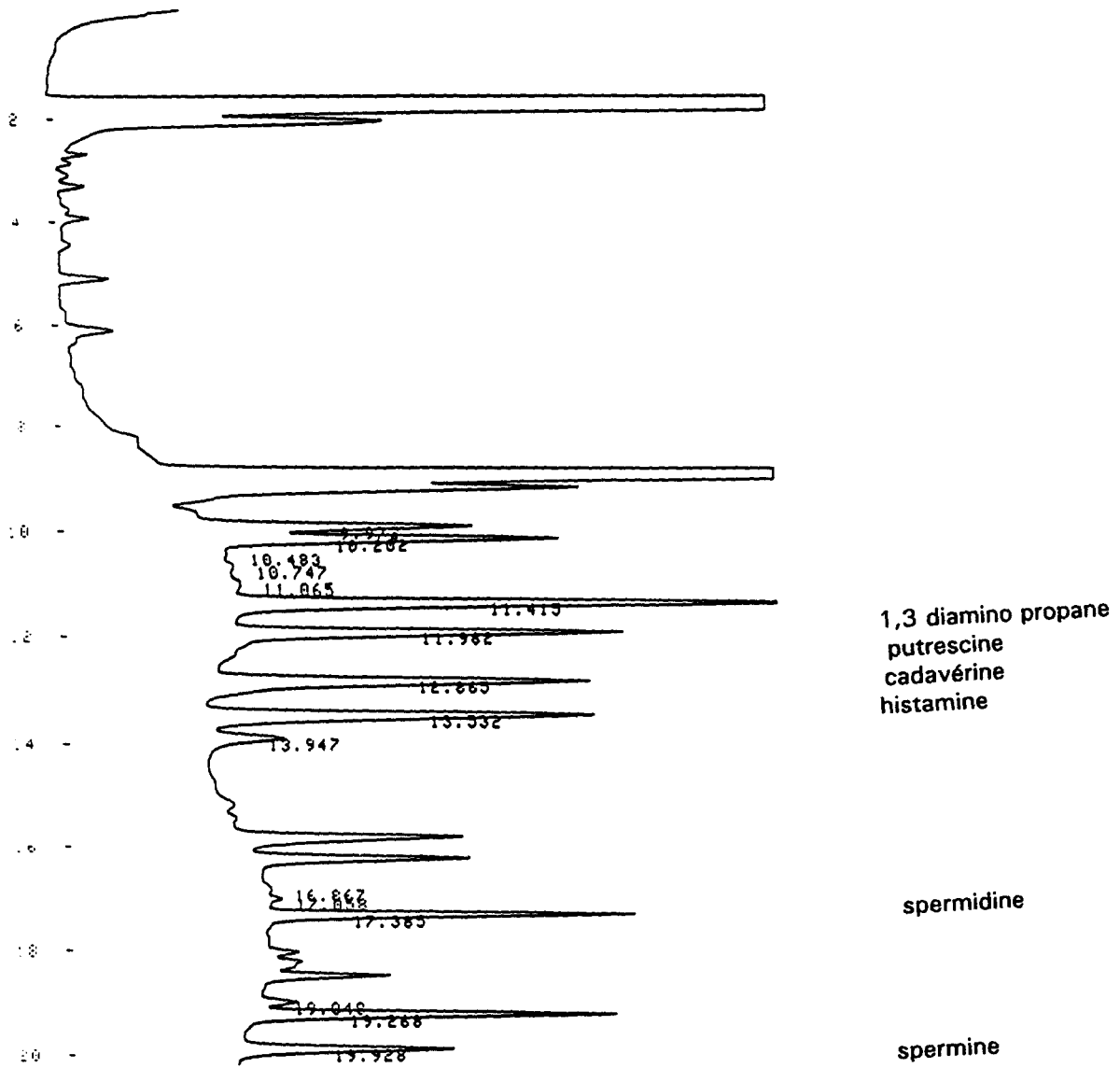


Figure VII. Chromatogramme d'une solution d'amines additionnée de 1,3 diamino propane.

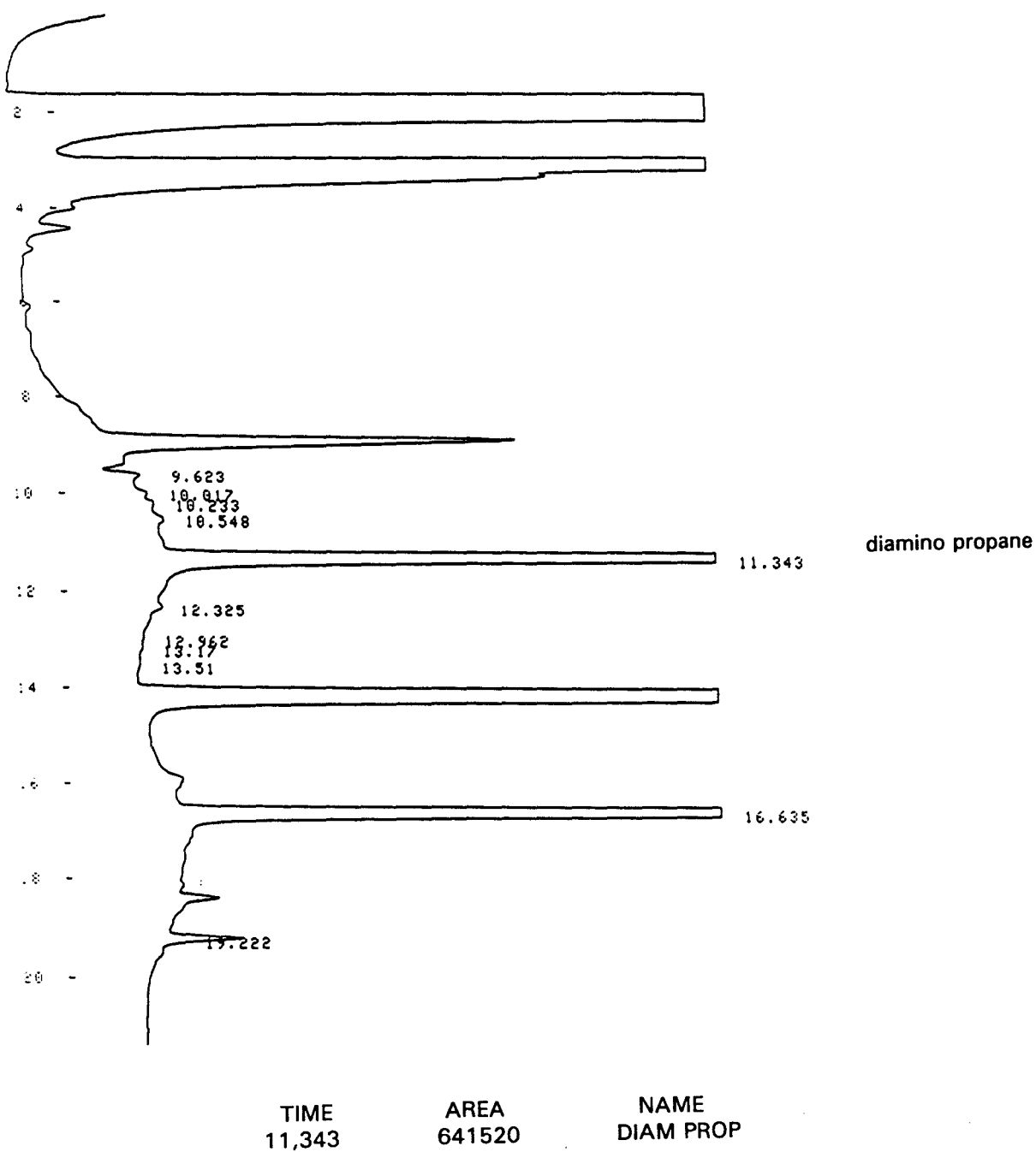


Figure VIII. Chromatogramme d'une solution de 1,3 diamino propane (2 mg de 1,3 diamino propane dichlorhydrate / 10 ml Na H CO₃) obtenu avec le protocole témoin.

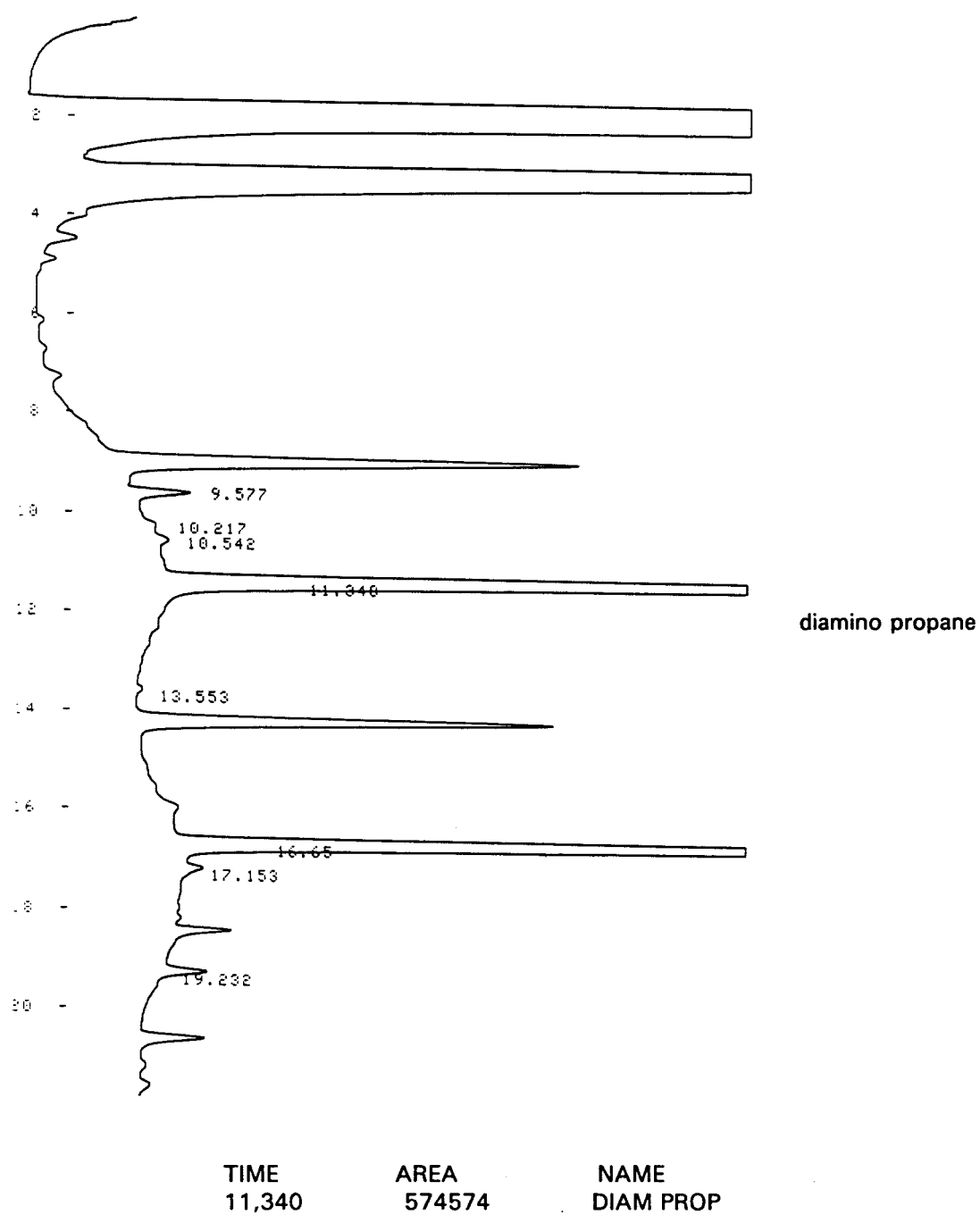


Figure IX. Chromatogramme d'une solution de 1,3 diamino propane (2 mg de 1,3 diamino propane dichlorhydrate / 10 ml Na H CO₃) conservée 6 jours à 3°C obtenu avec le protocole témoin.

INDICE	1.3			1.8		
TAUX DE PERTES	x 7.8	x 7	x 6.5	x 6.8	x 6.2	
P	210327	211393	172185	240754	177140	
C	70324	73920	82049	70910	75664	
H	36145	42133	32259	14701	149664	
Sd	171974	134358	116358	48049	204271	
Sn	--	13363	21671	9316	20664	

INDICE	2.5			2.6		
TAUX DE PERTES	x 5.2	x 6.3	x 5.4	x 7.4	x 11.9	x 6
P	466653	456491	396937	777740	712346	633863
C	370307	339620	315819	544078	517579	489202
H	48989	42077	36838	36045	40686	32922
Sd	158927	208958	178599	249018	259331	173079
Sn	13254	15214	13478	30577	17183	17899

INDICE	2.7			2.8		
TAUX DE PERTES	x 5.8	x 5.7	x 4.6	x 6.2	x 6.5	x 5.7
P	1011682	894968	794374	1015717	995871	1122704
C	1576469	1430262	1262405	2690895	2617121	2967872
H	527701	514362	424331	293225	270959	300706
Sd	130181	153740	161179	164428	180635	151633
Sn	---	11035	26744	20429	18668	25655

INDICE	2.9			3.4		
TAUX DE PERTES	x 3.71	x 4.35	x 4.08	x 4.83	x 4.76	
P	2084374	2042551	2048343	2456441	2159757	
C	3673575	3620209	360272	4632641	3958059	
H	1106099	1148065	1149422	770235	762695	
Sd	176165	165369	172535	164751	137635	
Sn	12895	13467	19163	14712	14679	

Tableau I: Valeurs corrigées (par le taux de pertes au cours de l'extraction) des surfaces des pics correspondant au amines biogènes du merlan conservé à 0°C en fonction de l'indice d'altération. (P : putrescine ; C : cadavérine ; H : histamine ; Sd : spermidine ; Sn : spermine).

INDICE	1.2			1.4		
TAUX DE PERTES	x 10.29	x 7.5	x 6.5	x 5.6	x 5.1	x 6.3
P	149195	148080	157137	184929	160385	196560
C	19955	10447	231153	17399	17789	17268
H	35778	20872	7254	20317	20227	10880
Sd	324207	286507	604702	233184	163460	156782
Sn	32670	14602	22600	12673	11664	11296
INDICE	1.8			2.1		
TAUX DE PERTES	x 7.9	x 10.5	x 7.2	x 7.3	x 5.6	x 6.15
P	297538	221518	288713	211656	254795	251898
C	82658	79369	74023	106624	115550	137268
H	11771	26628	9598	39362	52679	29372
Sd	296674	373170	234324	266165	141098	163621
Sn	54913	36571	23551	20309	12958	16088
INDICE	2.5			2.8		
TAUX DE PERTES	x 4.42	x 5.36	x 4.76	x 6.19	x 7.57	x 7
P	403042	334634	344695	414464	438840	461217
C	167544	168363	181623	611392	619169	683598
H	62931	65655	75736	690853	672663	690113
Sd	135667	149287	128710	221372	271066	233026
Sn	6581	---	----	17518	16676	10820
INDICE	3.1					
TAUX DE PERTES	x 2.93	x 5.07	x 5.17			
P	544312	523787	547208			
C	923161	1072705	1138480			
H	429617	499720	562718			
Sd	95500	247102	149506			
Sn	2994	15423	6333			

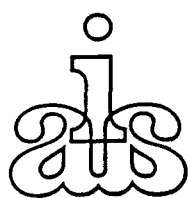
Tableau II: Valeurs corrigées (par le taux de pertes au cours de l'extraction) des surfaces des pics correspondant aux amines biogènes du maquereau conservé à 0°C en fonction de l'indice d'altération.
(P : putrescine ; C : Cadavérine ; H : histamine ; Sd : spermidine ; Sn : spermine).

(amines (ppm)	:putrescine	:cadavérine	:histamine	:spermidine	:spermine)
(indice	:	:	:	:	:
(1,3	: 67,90	: 23,22	: 13,84	: 82,20	: 18,79
(1,8	: 71,67	: 22,59	: 6,08	: 102,82	: 16,08
(2,5	: 150,92	: 105,38	: 16,02	: 106,33	: 19,74
(2,6	: 174,24	: 159,32	: 41,20	: 132,58	: 23,48
(2,7	: 308,82	: 438,58	: 183,64	: 86,60	: 20,26
(2,8	: 358,35	: 848,15	: 108,31	: 114,21	: 23,15
(2,9	: 706,04	: 1119,43	: 426,24	: 100,02	: 16,28
(3,4	: 791,68	: 1323,82	: 287,96	: 88,25	: 15,76

Tableau III: Teneurs moyennes en amines biogènes (en ppm) déterminées en fonction de l'indice d'altération chez le merlan conservé à 0°C.

(amines (ppm)	:putrescine	:cadavérine	:histamine	:spermidine	:spermine)
(indice	:	:	:	:	:
(1,2	: 58,05	: 6,23	: 7,52	: 219,46	: 45,53
(1,4	: 61,95	: 5,39	: 6,44	: 107,09	: 11,99
(1,8	: 92,35	: 24,25	: 6,01	: 175,92	: 41,13
(2,1	: 82,13	: 36,92	: 12,91	: 104,65	: 17,65
(2,5	: 105,10	: 53,17	: 25,59	: 80,48	: 7,06
(2,8	: 150,29	: 196,70	: 257,18	: 141,15	: 16,09
(3,2	: 184,68	: 322,00	: 186,85	: 95,75	: 8,85

Tableau IV : Teneurs moyennes en amines biogènes (en ppm) déterminées en fonction de l'indice d'altération chez le maquereau conservé à 0°C.



**industries
alimentaires et
agricoles**

98° ANNÉE • MARS 1981 • N° 3

Étude expérimentale de l'action antiseptique de la fumée sur "Escherichia coli"

Pierre MALLE, Philippe EB et Roger TAILLIEZ

Étude expérimentale de l'action antiseptique de la fumée sur "Escherichia coli"

Pierre MALLE *, Philippe EB ** et Roger TAILLIEZ **

SUMMARY

Experimental methods were established in order to study the smoking using liquid or gellified media. Data about antiseptic action of smoke on *Escherichia coli* were as follows :

- Submitted to a direct action of smoke, a bacterial population showed same exponential survival curves as that obtained with thermal treatment.
- Whereas a bacterial population was exposed to smoke components previously diffused through an agar medium the number of survivors was a function of smoke concentration : the characteristic relation was similar to those of chemical disinfection treatment.

RESUMEN

Los metodos de analisis se han establecido para estudiar la accion de los humos sobre modelos constiuidos en medio liquido y solido. Los resultados en cuanto a la accion antiseptica del humo sobre *Escherichia coli* demuestran que :

- Para una poblacion de bacterias sometidas a la accion directa del humo, la curva de supervencia sigue una ley exponencial identica a la que puede observarse teoricamente para un tratamiento termico.
- Para una poblacion de bacterias sometidas a la accion de componentes del humo que se ha difundido previamente dentro del medio solido, se encuentra una relacion entre el valor de esterilizacion y la concentracion de sustancias del humo ; esta relacion es muy parecida a la que puede observarse en la caso de tratamientos quimicos utilizados para la desinfeccion.

RESUME

Des méthodes d'analyse de laboratoire sont mises au point pour étudier le fumage sur des modèles constitués soit par un milieu liquide aqueux, soit par un milieu gélifié. Les résultats expérimentaux concernant l'action antiseptique de la fumée sur *Escherichia coli* démontrent que :

- Pour une population bactérienne soumise à l'action directe de la fumée, la cinétique de survie suit une loi exponentielle qui est analogue à celle observée théoriquement pour un traitement thermique.
- Pour une population bactérienne soumise à l'action des composants de la fumée ayant préalablement diffusé dans un milieu gélifié, il existe une relation entre la valeur stérilisatrice et la concentration des substances empyreumatiques : celle-ci est à rapprocher de celles observées au cours de certains traitements chimiques visant à la désinfection.

INTRODUCTION

Le fumage est une technique appliquée depuis les temps les plus anciens pour assurer la conservation de denrées alimentaires d'origine animale. La combinaison des actions respectives du sel et de la fumée sur les tissus, qui en est la base, est une méthode ancestrale : l'histoire nous apprend que chez les Egyptiens, les Grecs, les Romains, le commerce du poisson séché, salé et fumé se pratiquait déjà.

Le fumage consiste à imprégner les tissus préalablement salés de substances empyreumatiques conte-

nues dans la fumée que fournit la combustion lente de copeaux ou de sciure de bois. A l'origine, ce procédé était employé pour améliorer la qualité microbiologique d'un produit, mais ultérieurement, lorsque d'autres modes de conservation sont apparus, c'est essentiellement pour améliorer les qualités organoleptiques que le fumage a été utilisé. Ainsi le traitement par la fumée d'une denrée alimentaire d'origine animale lui confère une couleur et une saveur particulières, et lui assure une meilleure conservation.

Au début du siècle, on insistait particulièrement sur le rôle joué par le formol auquel on attribuait les propriétés antiseptiques des fumées de bois. En 1951, Dieuzeide (1) note que la plupart des produits résul-

* Laboratoire des Services Vétérinaires, Boulogne-sur-Mer.

** Laboratoire de Microbiologie, Université des Sciences et Techniques de Lille.

Article reçu le 20 janvier 1981, accepté par le Comité de Lecture le 12 février 1981

tant de la distillation des ligno-celluloses sont anti-septiques, accordant à l'aldéhyde formique le rôle principal, il souligne la contribution de nombreuses substances à l'action antiseptique de la fumée.

Shewan (2) constate en 1949 que le poisson fumé contient beaucoup de composés chimiques possédant des propriétés bactéricides ou bactériostatiques et que la teneur de la fumée en acides, en abaissant le pH de la chair de poisson, rend les microorganismes plus sensibles à l'action bactéricide et bactériostatique de la fumée elle-même. Des recherches ultérieures (3) l'amènent à penser que sur le plan microbiologique les constituants de la fumée les plus actifs sont les composés phénoliques. En 1967, Nielsen et Pedersen (4) étudiant l'effet inhibiteur des constituants de la fumée sur *Clostridium botulinum* dans du saumon fumé à froid l'attribuent au formaldéhyde et non aux phénols; des travaux publiés la même année par Tilgner (5) accordent, par contre, l'activité

bactéricide principale à des dérivés méthylés d'hydroxyphénols. En 1969, Zaitsev et Coll (6) mettent un terme à cette polémique en démontrant que l'effet bactéricide de la fumée dépend non seulement du formaldéhyde, mais aussi du phénol, des acides organiques et d'autres composés.

Si l'étude des composés chimiques susceptibles d'avoir une action létale sur les microorganismes a fait l'objet de travaux de recherche relativement nombreux, il n'en est pas de même pour l'établissement de lois physiques relatives à ce phénomène; au cours d'un travail de recherche appliquée au fumage du saumon (7) il nous a paru intéressant d'aborder ce problème: comme il est difficile de faire une étude précise sur ce matériel du fait de l'hétérogénéité de la répartition des microorganismes, nous rapportons ici une étude expérimentale de l'action de la fumée sur des bactéries hors de la denrée alimentaire qui constitue le substrat habituel.

MATERIELS ET METHODES

1. Souche bactérienne :

Les expériences sont réalisées avec *Escherichia coli* K 10. La conservation a été effectuée sur une gélose nutritive inclinée (8) à une température comprise entre + 2°C et + 8°C. La souche a été repiquée tous les deux mois.

2. Milieu de culture :

Le milieu minimum MSB₁ (9) couramment employé pour les bactéries prototrophes est utilisé liquide pour la préparation des bactéries; il est utilisé à l'état gélifié pour les autres essais.

3. Dénombrements :

Tous les dénombrements sont effectués en double exemplaire selon la même technique d'ensemencement en profondeur (8) sur milieu MSB₁ gélifié ou sur gélose au désoxycholate 1 0/00 pour coliformes (10); la numération des colonies est réalisée après vingt-quatre heures de culture à 44°C.

4. Fumoir :

Il s'agit d'un fumoir horizontal statique de marque Afos. La fumée provient de la combustion de sciure de bois durs contenant au minimum 80 % de hêtre, le reste provenant de chêne, de frêne et d'orme. La technique de fumage à froid a été employée dans ces travaux avec une température de la fumée voisine de 18°C. (Dans le fumage à chaud, la température des fumées est supérieure à 60°C, alors que dans le fumage à froid elle est inférieure à 30°C.)

Les paramètres caractéristiques du fumage sont rigoureusement les mêmes pour tous les essais expérimentaux qui ont été réalisés en boîtes de Pétri placées dans une cellule de fumage où sont habituellement placés des filets de saumon.

5. Technique d'exposition des bactéries à l' « action directe » de la fumée :

Le procédé expérimental suivant est adopté pour simuler l'action de la fumée à la surface d'une denrée alimentaire. Une suspension d'*Escherichia coli* dans de l'eau physiologique est répartie de façon homogène dans une série de boîtes de Pétri; celles-ci sont alors soumises à l'action de la fumée durant des périodes de temps différentes; pour éviter la dessiccation des bactéries, on coule préalablement dans le fond de la boîte une couche de gélose vierge (agar-agar).

La comparaison des dénombrements effectués à partir de suspensions ayant subi des expositions de diverses durées permet d'étudier l'évolution du nombre de bactéries survivantes au traitement par la fumée.

6. Technique d'exposition des bactéries à l' « action indirecte » de la fumée :

La fumée agit en partie par imprégnation du substrat: pour simplifier l'expérimentation, le poisson (ou la viande), qui constitue le substrat habituel, est remplacé par de la gélose. Une suspension bactérienne ensemencée dans un milieu gélifié est soumise pendant un laps de temps déterminé à l'action de substances empyreumatiques de concentrations variées. Le nombre de bactéries survivantes est déterminé pour chacune de ces concentrations.

Le mode opératoire est le suivant :

Une couche de gélose vierge (10 ml) est coulée dans le fond d'une boîte de Pétri. Celle-ci est alors soumise à l'action de la fumée pendant une durée déterminée: sa concentration en substances empyreumatiques diffusibles peut être considérée comme proportionnelle à cette durée d'exposition (11, 12).

Après cette opération, 0,5 ml d'eau physiologique stérile sont déposés sur le gel pour éviter un contact direct des bactéries avec la surface où la concentration en substances empyreumatiques est élevée.

Ensuite, 1 ml d'une suspension d'*Escherichia coli* dans de l'eau physiologique est intimement mélangé au moment de l'emploi à 10 ml de milieu gélosé MSB₁ en surfusion à 45 °C, puis coulé sur la couche inférieure.

Enfin, une couche superficielle de gel vierge est déposée pour éviter le contact avec le milieu extérieur. Après une incubation de quarante-huit heures à 44 °C le dénombrement est effectué.

Dans cette opération, les bactéries sont soumises à l'action des composants de la fumée qui se sont concentrés dans la couche inférieure et qui diffusent pendant l'incubation dans la couche intermédiaire qui les contient.

RESULTATS

1. Evolution du nombre de bactéries survivantes en fonction du temps d'exposition à la fumée :

La technique mise au point pour l'étude de l'« action directe » a été pratiquée sur une série de boîtes de Pétri avec des suspensions contenant initialement 90, 1.000 et 10.000 *E. coli* vivants : la figure 1 représente les cinétiques de survie de populations bactériennes soumises à l'action de la fumée ; chacune exprime le logarithme du nombre de bactéries survivantes en fonction de la durée d'exposition. Pour un même essai, l'estimation du nombre de microorganismes est analogue après dénombrement sur milieu MSB₁ ou sur gélose au désoxycholate qui est un milieu sélectif pour les coliformes : il est donc très probable qu'il n'y a pas eu de contamination par d'autres bactéries au cours de nos essais expérimentaux. Toutes les cinétiques peuvent être approximativement représentées par des droites dont les pentes sont à peu près identiques ; pour les essais effectués avec comme nombres initiaux d'*E. coli* 1.000 et 10.000 une étude statistique montre l'existence d'une liaison significative entre le nombre de bactéries survivantes et la durée d'exposition : les coefficients de corrélation sont respectivement de 0,993 et de 0,998 ce qui permet d'apprécier la probabilité du risque pris à $p < 0,001$.

Pour ces cinétiques, la figure 2 donne une autre représentation qui exprime le logarithme du rapport (nombre de bactéries initiales / nombre de bactéries survivantes après traitement) en fonction de la durée d'exposition : pour les quinze mesures rapportées, le test de linéarité réalisé par l'analyse de la variance montre que l'on peut considérer que l'on a affaire à une droite ($F_8^5 = 2,809$).

Au vu de ces résultats, on peut admettre que la cinétique de survie correspond à l'équation :

$$\log. N = \log. N_0 - \frac{t}{D} \quad (\text{fig. 1})$$

$$\text{ou } \log. \frac{N_0}{N} = \frac{t}{D} \quad (\text{fig. 2})$$

dans laquelle N_0 est le nombre de bactéries initialement présentes, N le nombre de bactéries survivantes après une durée d'exposition t , et D le temps nécessaire pour détruire 90 % des germes présents. Après calcul des paramètres des droites de régression,

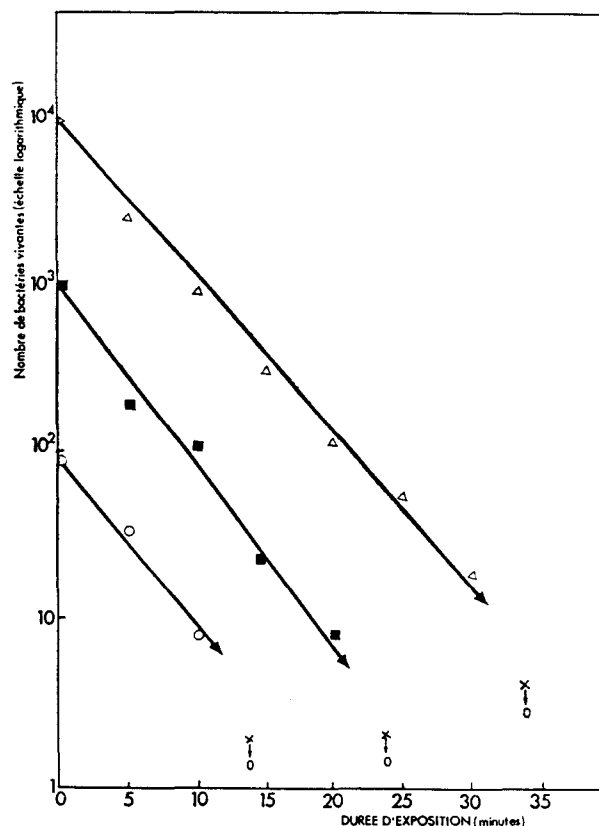


Figure 1 : Cinétiques de survie de populations d'*E. coli* soumises à l'action directe de la fumée : les expériences ont été réalisées avec un nombre initial de bactéries vivantes (N_0) de 90 (O), de 1.000 (■) et de 10.000 (Δ). Pour chaque essai, au-delà d'une certaine durée d'exposition, le nombre de bactéries survivantes est nul (noté par le symbole $\begin{smallmatrix} x \\ \downarrow \\ 0 \end{smallmatrix}$).

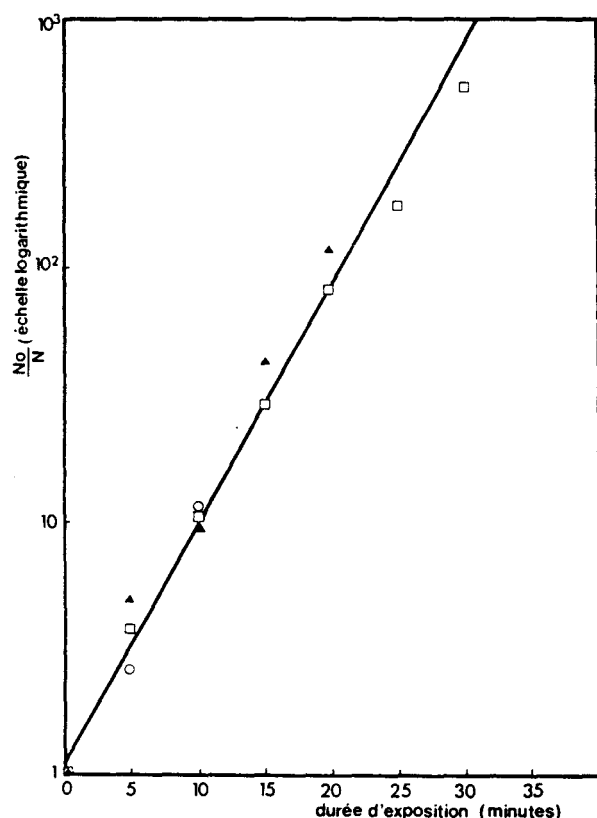


Figure 2 : Evolution des rapports : nombre de bactéries initialement présentes / nombre de bactéries survivantes après traitement (N_0/N) en fonction de la durée d'exposition à la fumée : les essais ont été réalisés avec un nombre initial de bactéries vivantes (N_0) de 90 (O), de 10^3 (Δ) et de 10^4 ($\square$).

la valeur de D peut être estimée à environ dix minutes dans nos conditions expérimentales.

2. Evolution du nombre de bactéries survivantes en fonction de la concentration en fumée

La technique élaborée pour l'étude de l'« action indirecte » a servi de méthode expérimentale : elle a été appliquée à des séries de boîtes de Pétri préalablement exposées à la fumée durant des périodes distinctes, puis ensemencées avec un nombre constant d'E. coli. Toutes les numérations sont effectuées après quarante-huit heures de contact. La « concentration en fumée » qui peut être considérée comme proportionnelle à la durée d'exposition de la couche inférieure de gélose, est exprimée par la lettre C affectée d'un nombre égal à la durée d'exposition correspondante (en minutes).

Sur la figure 3 sont rapportées quelques courbes de survie de populations bactériennes en fonction de la « concentration en fumée ». La représentation sur papier semi-logarithmique ne donne pas une relation linéaire entre les paramètres, par contre, avec

les valeurs de $\log. \frac{N_0}{N}$ et de C converties en loga-

rithmes on matérialise une droite (fig. 4). L'équation de celle-ci peut être établie par calcul statistique : les caractéristiques de la droite de régression permettent de conclure que :

$$\log. \frac{N_0}{N} = -3,4010 + 2,8626 \log. C$$

L'estimation du coefficient de corrélation ($r = 0,9971$) indique que nos données expérimentales s'ajustent parfaitement à la droite de régression. Ce résultat est largement confirmé par le test de Student qui, pour un « t » = 34,9495, indique que la probabilité du risque pris est inférieure à 1 0/00 : pour les neuf mesures rapportées, le test de linéarité

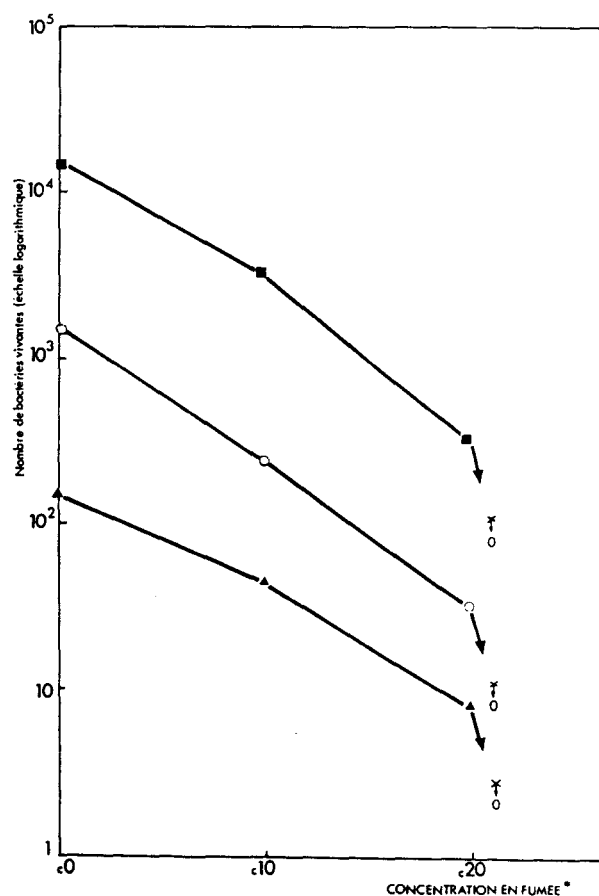


Figure 3 : Courbes de survie de populations d'E. coli en fonction de la « concentration en fumée » (exprimée en minutes d'exposition du gel). Les nombres de bactéries initialement présentes sont de 1.50 (Δ), 15.00 (O) et 150.00 ($\blacksquare$). Pour chaque essai, au-delà d'une certaine « concentration en fumée » le nombre de bactéries survivantes est nul (noté par le symbole $\downarrow$).

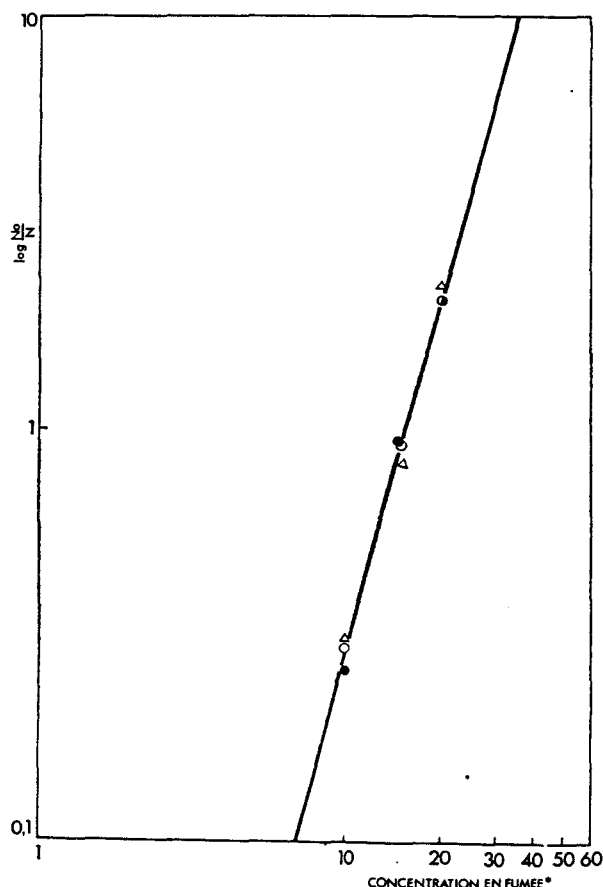


Figure 4 : Evolution du rapport : nombre de bactéries initialement présentes / nombre de bactéries survivantes après traitement (N_0/N) en fonction de la « concentration en fumée » (échelle bilogarithmique). Pour les trois essais effectués, le nombre initial de bactéries vivantes (N_0) est de 10^3 (●), 10^4 (Δ) et 10^5 (○).

* La « concentration en fumée » est exprimée en minutes d'exposition du gel.

réalisé par l'analyse de la variance montre que l'on peut considérer que l'on a affaire à une droite ($F_6^1 = 1,111$).

L'équation précédente peut aussi se mettre sous la forme :

$$\log. \frac{N_0}{N} = 4 \cdot 10^{-4} \cdot C^{2,86}$$

qui permet aussi de calculer, dans nos conditions expérimentales, le nombre de bactéries survivantes après quarante-huit heures de contact avec une « concentration en fumée » déterminée ; dans cette équation, la puissance dont est affectée la « concentration en fumée » C est une valeur caractéristique habituellement désignée « exposant de Watson » (13),

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats obtenus à l'aide de nos deux modèles expérimentaux permettent d'établir des lois physiques caractérisant l'action bactéricide au cours du fumage.

Avec le premier modèle expérimental, on montre que pour une population d'*E. coli* soumise à l'action directe de la fumée, l'évolution du nombre de bactéries survivantes en fonction de la durée d'exposition suit une loi exponentielle : celle-ci est analogue à celle qui exprime théoriquement la destruction bactérienne résultant d'un traitement thermique (14, 15) et qui est maintenant bien connue (16, 17).

Avec le second modèle expérimental on s'intéresse aux substances de la fumée diffusibles dans un milieu contenant les bactéries et qui ont sur ces dernières une action létale : on montre que la réduction d'une population bactérienne obtenue après un temps de contact donné est fonction de la « concentration en fumée » : la relation caractéristique est semblable à celle établie de façon empirique par Watson (13) à partir des données fournies par Chick (18). Notre démonstration confirme donc de façon indirecte l'intervention de substances telles que le formol et le phénol dans le processus de désinfection par la fumée jusqu'à maintenant admis (1, 6).

Pour les deux équations établies, nous avons parfaitement défini dans nos conditions expérimentales les valeurs des paramètres se rapportant à *E. coli*. D'autres valeurs seraient à déterminer pour d'autres espèces de microorganismes ; en particulier, on sait que les valeurs de D (temps de réduction décimale) et de n (exposant de Watson) ici affecté à la « concentration de fumée » dépendent non seulement des espèces bactériennes, mais aussi de leurs états physiologiques : la forme sporulée et la forme végétative d'un même microorganisme ont des comportements très différents du point de vue de la destruction thermique et chimique. De plus, on sait que d'autres facteurs tels que la composition du milieu, le pH, la température influent sur les valeurs caractéristiques des paramètres établis pour une espèce donnée.

En pratique, dans le fumage d'une denrée alimentaire, différents paramètres conditionnent l'action antiseptique de la fumée :

- la composition chimique et les propriétés de la fumée varient en fonction des essences de bois employées (19) et des conditions de production de la fumée : la température à laquelle la fumée est produite, la proportion d'eau dans les copeaux ou la sciure, le pourcentage d'air entrant dans la combustion (20) ;
- une partie importante des composants de la fumée déposés sur la denrée se concentre dans la zone externe du tissu musculaire (21) ;
- la quantité de fumée pénétrant à l'intérieur de la chair animale est une fonction complexe de la composition et de la concentration de celle-ci, des conditions environnantes et de l'état de la surface (22) ;

— le tissu musculaire protège les bactéries de l'action de la fumée et des substances constitutives peuvent inhiber les composants empyreumatiques actifs (7).

Aussi, pour déterminer son efficacité réelle sur le plan microbiologique, l'action antiseptique de la fumée telle que nous l'avons étudiée doit être replacée dans son contexte habituel, c'est-à-dire le produit fumé : les paramètres des équations caractéris-

tiques devront donc être établis dans le milieu alimentaire concerné et pour les microorganismes les plus résistants dont la présence fait courir un risque aux consommateurs.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les Etablissements Prodalux de Boulogne-sur-Mer, qui nous ont permis de réaliser nos expérimentations dans leur atelier de fumage.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) DIEUZEIDE (R.) et NOVELLA (M.). — Essai sur la technique de fumage du poisson. Bull. Stat. Exper. Aquicul. Pêche Castiglione (Alger), 1951, n° 169.
- (2) SHEWAN (J.M.). — The biological stability of smoked and salted fish. Chemistry and Industry, 1949, 501-505.
- (3) SHEVAN (J.M.). — The microbiology of sea-water fish. In G. Borgstrom (ed.), Fish and Food, Academic Press, Inc., New-York, 1961, Vol. 1, 487-560.
- (4) NIELSEN (S.F.) and PEDERSEN (H.O.). — Studies on occurrence and germination of *C. botulinum* on smoked salmon. In M. Ingram and T.A. Roberts (ed.), Botulism 1966, Proc. 5th Int. Symp. Fd Microbiol., Chapman and Hall, London, 1967, 66-72.
- (5) TILGNER (D.J.). — Effet du fumage et substances actives dans la fumée. Die Fleishwirtschaft, 1967, 47, 4.
- (6) ZAITSEV (V.I.), KIZEVETTER L., LAGUNOV T., MAKAROVA (L.) and PODSEVALOV (V.). — Fish curing and processing. MIR Publishers, Moscow, 1969.
- (7) MALLE (P.). — Le fumage à froid du saumon : aspects microbiologiques, Thèse de Doctorat d'Université, Lille, 1980.
- (8) BUTTIAUX (R.), BEERENS (H.) et TACQUET (A.). — Manuel de techniques bactériologiques. Flammarion (éd.), 1974, 4^e éd., Paris.
- (9) PLICHON (B.), LUCQUIN (M.) et GUILLAUME (J.-B.). — Vérification expérimentale des cinétiques de croissance bactérienne obtenues par simulation sur ordinateur. Ann. Inst. Past. Lille, 1971, 22, 37-43.
- (10) EDWARDS (P.R.) and EWING (W.H.). — Identification of Enterobacteriaceae. Burges Publ. Co., Minneapolis (USA), 1962.
- (11) CHAN (W.S.), TOLEDO (R.T.) and DENG (J.). — Effect of smokehouse Temperature, humidity and air flow on smoke penetration into fish muscle. J. Fd Sci., 1975, 40, 240-243.
- (12) FOSTER (W.W.) and SIMPSON (T.H.). — Studies of the smoking process for foods: the role of smoke particles. J. Sci. Food Agr., 1961, 9, 635-644.
- (13) WATSON (H.E.). — Variations of the rate of disinfection with change in the concentration of the disinfectant. J. Hyg., 1908, 8, 536-542.
- (14) BIGELOW (W.D.). — The logarithmic nature of thermal death time curves. J. Infect. Dis., 1921, 29, 528-536.
- (15) RAHN (O.). — Logarithmic order of death in bacteria. Biodynamica, 1943, 4, 81-129.
- (16) LONCIN (M.). — Les opérations unitaires du génie chimique. Dunod (éd.), 1961, Paris.
- (17) PFLUG (I.J.) and HOLCOMB (R.G.). — Principles of thermal destruction of microorganisms. In : Disinfection, Sterilization and Preservation, Seymour S. Block (ed.), Philadelphia, 1977, 2nd ed.
- (18) CHICK (H.J.). — Laws of disinfection. J. Hyg., 1908, 8, 92-158.
- (19) SZEPULA (W.), OLANCZUCK-NEYMAN (K.), DAUN (H.) et GRABOWSKA (J.). — Influence des différentes sortes de bois sur les propriétés bactériostatiques de la fumée de bois. Zesz. nauk. Politech. gdansk. chem., 1970, 152, 65-72.
- (20) JEANDEL (R.). — Le fumage des denrées alimentaires. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Alfort, 1944.
- (21) YUDISTKAYA (A.I.). — Histological and histochemical investigation of tissues of smoked fish. Rybnoe Khoziaistvo, 1959, 35, (2), 65-69.
- (22) CUTTING (C.L.). — Smoking. In G. Borgstrom (ed.), Fish and Food, Academic Press, Inc., New-York, 1965, 3, 55-105.

Le fumage du saumon

Influence de la qualité de la matière première sur l'action antiseptique de la fumée

par P. MALLE (*), P. EB (**) et R. TAILLIEZ (**)

Les produits fumés connaissent un regain d'intérêt depuis une vingtaine d'années, notamment le saumon qui rencontre un grand succès sur le marché français. Autrefois les denrées alimentaires subissaient un fumage intense réalisant une véritable stérilisation; l'industrie alimentaire pratique aujourd'hui sur le saumon un fumage modéré dont le but essentiel est de conférer au produit des caractéristiques organoleptiques délicates. Il importe de savoir si le fumage à froid tel qu'il est utilisé actuellement permet d'obtenir une stabilisation du produit traité.

Pour étudier l'évolution de la flore bactérienne du saumon pendant le fumage, nous avons réalisé des dénombrements sur un même filet avant et après fumage. La comparaison des résultats ainsi obtenus sur plusieurs filets met en évidence une action incontestable de la fumée sur la flore bactérienne aérobie, mais cette action est modérée puisque le taux moyen de réduction du nombre de bactéries est de l'ordre de 5 [1, 2].

Dans d'autres expériences de laboratoire, des bactéries comme Escherichia coli et Staphylococcus aureus ont été utilisées : l'action de la fumée sur des suspensions bactériennes en milieu aqueux (ou gélifié) s'est révélée remarquablement efficace [1, 3]; dans ces conditions opératoires, l'activité antiseptique de la fumée est nettement plus importante que celle observée avec les filets de saumon et nous envisageons l'hypothèse que les tissus du poisson protègent les micro-organismes qu'ils contiennent. Nous nous proposons au cours d'une étude expérimentale avec E. coli de vérifier cette hypothèse puis de déterminer la nature des constituants tissulaires en cause : une telle analyse a pour but essentiel de déterminer les critères conduisant à l'obtention d'un produit fumé d'excellente qualité.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Fumoir

Les expériences de fumage ont été réalisées dans un fumoir horizontal statique de marque AFOS; il s'agit d'un fumage à froid où la température de la fumée est voisine de 18 °C. Le taux de fumage est approximativement proportionnel à la densité optique de la fumée [4]. Cette densité de fumée qui est constante dans une expérience donnée peut présenter des variations d'une expérience à une autre, compte tenu des nombreux facteurs dont elle dépend; ceci est à considérer dans l'interprétation des résultats. Dans chaque expérience, les boîtes de Pétri ont été placées dans la cellule de fumage où sont habituellement exposés les filets de saumon. Les paramètres caractéristiques du fumage dans ces essais sont donc rigoureusement identiques à ceux du fumage classique du saumon.

(*) Laboratoire des Services Vétérinaires, Boulogne-sur-Mer.

(**) Laboratoire de Microbiologie, Université des Sciences et Techniques de Lille.

2. Étude de « l'action directe » de la fumée

La technique utilisée a été décrite précédemment [1, 3]. Les boîtes de Pétri contenant soit une suspension d'*Escherichia coli* (souche K 10) dans de l'eau physiologique, soit un mélange *E. coli*-broyat de saumon sont placées dans le fumoir pendant un temps déterminé (de 10 à 50 mn). Après exposition à la fumée, un prélèvement est réalisé : son ensemencement sur milieu MSB₁ gélosé [5] permet d'effectuer une numération sélective après incubation de 48 heures à 44 °C [6].

3. Étude de « l'action indirecte » de la fumée

La technique a été mise au point auparavant [1, 3]. Les bactéries (*E. coli* souche K 10) subissent l'action des substances empyreumatiques retenues dans une couche de milieu gélifié (gélose pure ou additionnée de broyat de saumon ou gélose contenant différentes substances chimiques ou biologiques : acides aminés, peptones, albumine, cada-

véline, putrescine, glucosamine, glucose, lipides, chlorure de sodium). La « concentration en fumée » peut être considérée comme proportionnelle à la durée d'exposition de la gélose [4, 7] : elle est exprimée par la lettre C affectée d'un nombre correspondant à la durée d'exposition (en minutes).

RÉSULTATS ET COMMENTAIRES

1. Influence de la chair de saumon sur l'action de la fumée

« L'action directe » de la fumée sur des bactéries en suspension soit dans l'eau physiologique, soit dans un broyat de saumon est illustrée par la figure 1 : pour une durée

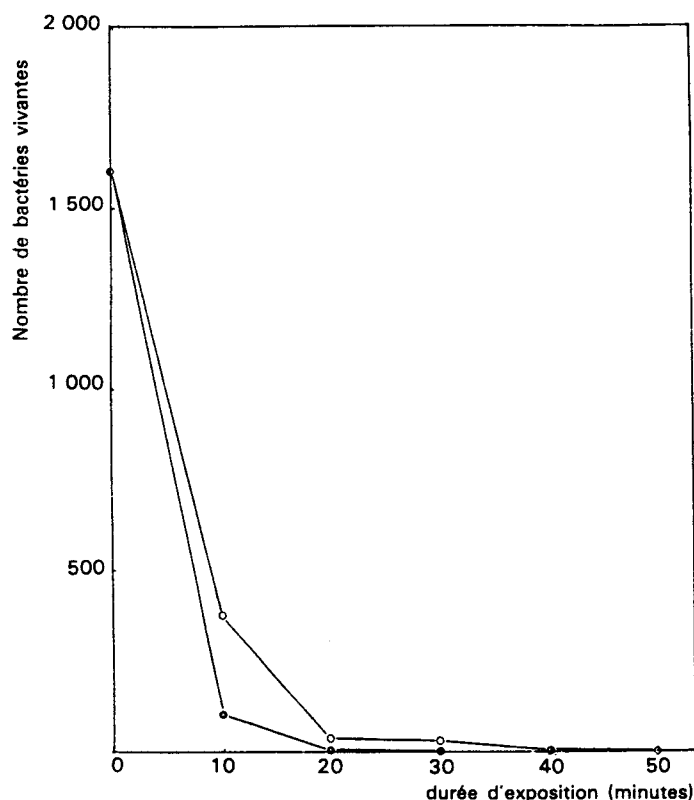


Figure 1. – Cinétiques de survie de populations d'*Escherichia coli* soumises à « l'action directe » de la fumée en présence (O) et en l'absence (●) d'un broyat de saumon.

donnée d'exposition à la fumée, le nombre de bactéries survivant au traitement est plus élevé en présence de broyat de saumon.

La technique mise au point pour l'étude de « l'action indirecte » est employée pour déterminer si la réduction de l'activité antiseptique de la fumée n'est pas due simplement à une protection physique : la chair du saumon pourrait constituer un écran s'opposant à la diffusion de la fumée et les bactéries situées au sein des tissus n'y subiraient pas son action. Pour ce faire, des milieux gélosés additionnés de 0 ml, 3,5 ml ou 5 ml de broyat de saumon et exposés à la fumée durant des périodes distinctes sont ensuite ensemencés par une suspension de 1 500 *E. coli*; le nombre de survivants est déterminé après 48 heures d'incubation. Réalisées dans ces conditions expérimentales les courbes

reportées sur la figure 2 montrent que l'activité bactériostatique des composants de la fumée diffusibles en milieu gélosé est fortement réduite en présence d'un broyat de saumon; la diminution de l'activité observée est fonction de la quantité de broyat incluse. Ainsi il apparaît que la chair de saumon est capable de retenir ou d'inhiber certaines substances actives de la fumée.

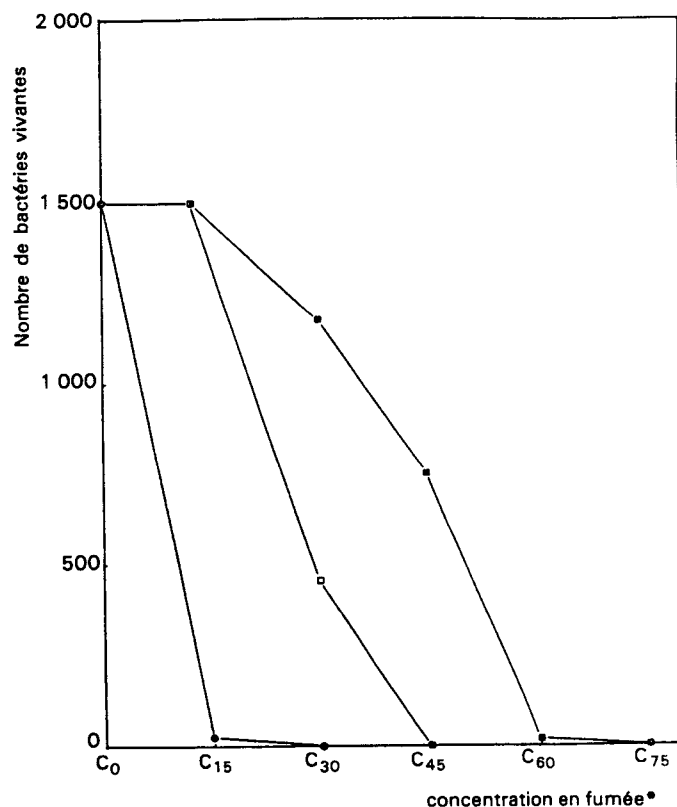


Figure 2. – Courbes de survie de populations d'*Escherichia coli* en fonction de la concentration en fumée : le milieu se compose de gélose (●), de gélose + 3,5 ml de broyat (□), ou de gélose + 5 ml de broyat (○).

* La « concentration » en fumée est exprimée en minutes d'exposition du milieu.

2. Influence de diverses substances biologiques

Pour déterminer la nature des constituants de la denrée destinée au fumage qui sont susceptibles de réagir avec certaines substances actives de la fumée, un certain nombre de composés constitutifs du muscle de poisson sont étudiés séparément; de la même façon, des produits issus de la dégradation bactérienne ou de l'autolyse sont expérimentés.

Les substances sont préalablement incluses dans le gel soumis à la fumée durant des périodes variant de 0 à 30 mn. Un nombre d'*E. coli* (N_0) compris entre 10^2 et 10^3 sert à l'ensemencement; la numération des bactéries survivantes (N) est réalisée après 2 jours et permet d'établir l'évolution de la réduction de la population N_0/N en fonction de la « concentration » en fumée (figures 3 et 4).

Pour un gel ne contenant aucune substance, on constate qu'une « concentration » en fumée de l'ordre de C₁₅ à C₂₀ est nécessaire pour détruire la quasi totalité des micro-organismes; dans les mêmes conditions, mais en présence

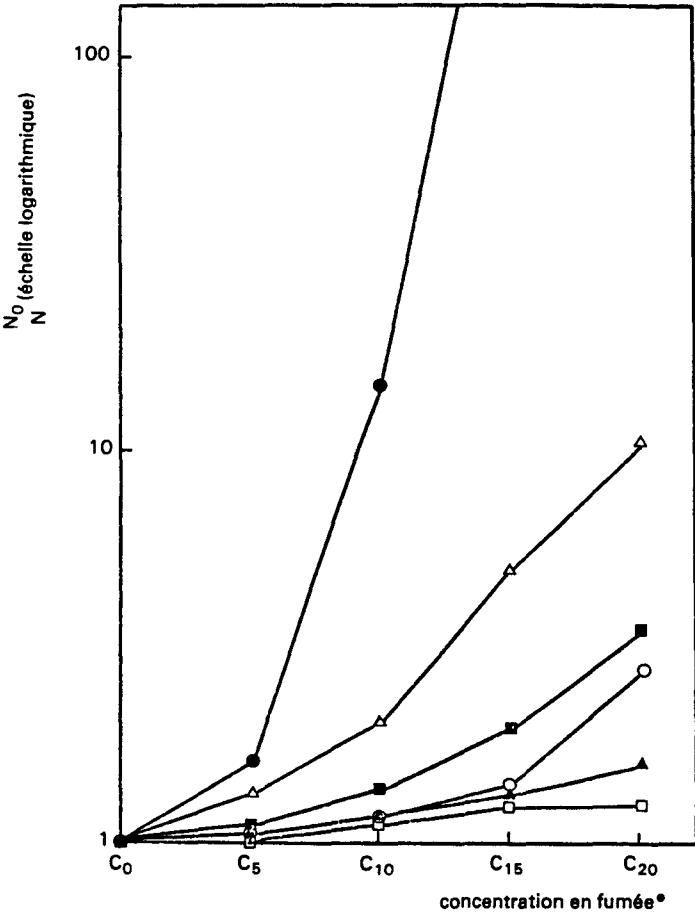


Figure 3. - Variations de la population d'Escherichia coli en fonction de la « concentration » en fumée (N_0/N représente le rapport des nombres de bactéries vivantes avant et après expérimentation). Les courbes ont été établies pour diverses concentrations de putrescine dans le milieu (en mg/100 g) : 0 (●), 30 (Δ), 60 (■), 90 (○), 120 (▲), 150 (□).

* La « concentration » en fumée est exprimée en minutes d'exposition du milieu.

de certaines substances un pourcentage plus ou moins important de bactéries survivent à un traitement identique. C'est ainsi que l'on peut regrouper en deux catégories les substances que nous avons testées :

1° Substances se comportant comme des inhibiteurs de l'action bactéricide de la fumée : les tableaux I et II expriment en pourcentage le nombre de bactéries survivantes pour différentes concentrations de quelques substances biologiques testées. La concentration en fumée choisie est celle qui tue toutes les bactéries dans l'expérience témoin. L'ensemble de nos essais permet de classer dans un ordre croissant d'activité inhibitrice l'albumine, les peptones, la glucosamine, les acides aminés et les ptomaïnes.

Concentration en substance (mg/100 g)	0	50	150	250	500	1 000
Albumine ...	0	0	0	0	7	14
Peptone	0	2	16	18	39	48

TABLEAU I :

Fumage en présence d'albumine ou de peptone : influence de la concentration sur le nombre de bactéries survivantes (en % par rapport à la population initiale).

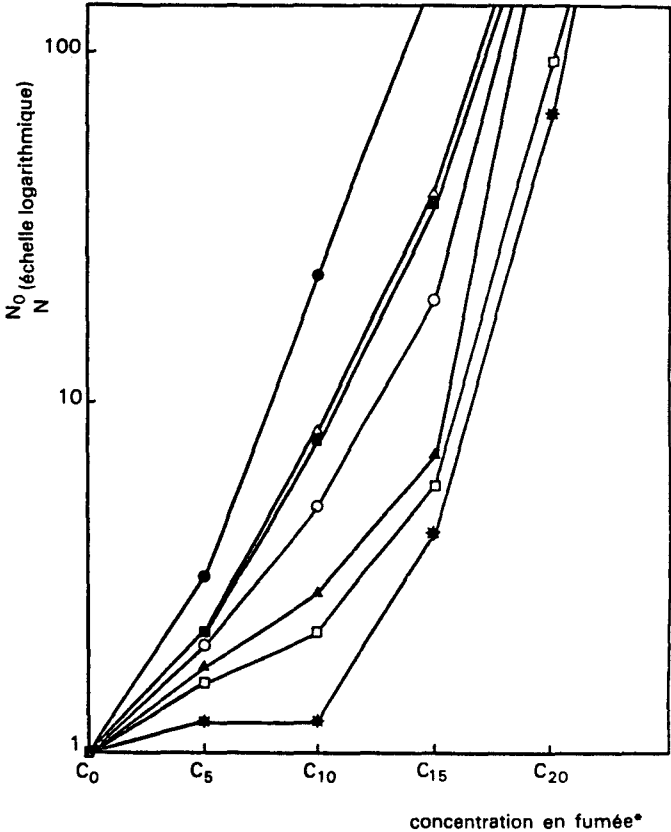


Figure 4. - Variations de la population d'Escherichia coli en fonction de la « concentration » en fumée (N_0/N représente le rapport des nombres de bactéries vivantes avant et après expérimentation). Les courbes ont été établies pour différentes substances présentes dans le milieu (à la concentration de 50 mg/100 g) : caséine (Δ), peptone (■), alanine (○), albumine (▲), lysine (□), putrescine (*); le milieu seul (●) sert de témoin.

* La « concentration » en fumée est exprimée en minutes d'exposition du milieu.

Concentration en substance (mg/100 g)	0	30	60	90	120	150
Cadavérine ...	0	11	13	13	25	52
Putrescine	0	20	52	71	73	78

TABLEAU II :

Fumage en présence de cadavérine ou de putrescine : influence de la concentration sur le nombre de bactéries survivantes (en % par rapport à la population initiale).

2° Substances sans effet sur l'action bactéricide de la fumée : pour une gamme de concentration allant jusqu'à 1 g pour 100 g l'addition de lipides (huile de saumon), de glucose ou de chlorure de sodium ne provoque aucune modification de l'action létale de la fumée.

On constate que les substances se comportant comme des inhibiteurs de l'action de la fumée possèdent une ou plusieurs fonctions amines. Nous avons mis clairement en évidence le rôle de la fonction amine dans cette baisse d'activité bactéricide : le glucose n'a aucune influence sur l'action de la fumée alors que la glucosamine diminue son action [1].

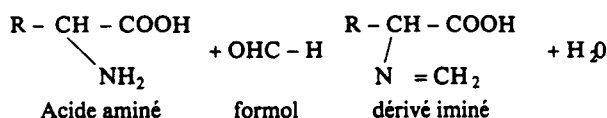
DISCUSSION ET CONCLUSION

Nous avons déterminé parmi les constituants du tissu musculaire ceux qui sont susceptibles de réagir avec certaines substances actives de la fumée et d'inhiber ainsi partiellement son action antiseptique.

Nous avons mis en évidence l'existence d'une corrélation entre la présence dans la denrée de fonctions amines libres et la réduction de l'activité bactériostatique de la fumée. Ceci suppose par conséquent que les fonctions amines libres soient capables de réagir avec des substances empyreumatiques douées d'une activité bactériostatique et de les rendre ainsi inactives. Il est donc nécessaire de connaître la nature de ces substances.

En 1969, Zaitsev et coll. [8] démontrent que l'effet bactéricide de la fumée dépend non seulement du formaldéhyde mais aussi du phénol, des acides organiques et d'autres composés; ils mettent ainsi un terme aux différentes hypothèses formulées sur l'action de la fumée [9, 10, 11, 12 et 13].

Il est permis de penser que dans nos expériences l'aldéhyde formique de la fumée réagit avec des fonctions amines appartenant à diverses substances : protéines, peptides, acides aminés et amines provenant de leur dégradation. La réaction de condensation « aldéhyde - acide aminé » est une réaction bien connue :



Une réaction équivalente pourrait s'effectuer entre l'aldéhyde formique et les fonctions amines libres des protéines, des peptides et de divers composés aminés.

Dans nos travaux, nous avons pu classer quelques substances inhibant l'action bactériostatique de la fumée. On sait que la dégradation des protéines suit ce processus : protéines → peptides → acides aminés → amines de dégradation; or, nous constatons, en considérant les substances que nous avons étudiées, que la protéolyse entraîne le remplacement des molécules existantes par des molécules douées d'une plus grande influence inhibitrice sur l'action de la fumée, comme par exemple : peptone → acide aminé → putrescine.

Il y a une trentaine d'années qu'on a reconnu expérimentalement à l'albumine sérique la propriété de détoxifier les

milieux de culture [14]. La comparaison de l'influence d'autres substances possédant des fonctions amines nous a amenés à établir une corrélation entre l'augmentation du nombre de fonctions amines libres, résultant de la dégradation des chaînes protéiques, et la diminution de l'activité bactériostatique de la fumée. Ceci signifie que la fumée est d'autant moins efficace sur les bactéries que le saumon est plus altéré.

Il s'ensuit que dans un poisson présentant une contamination bactérienne importante la dégradation sera plus avancée et que l'action bactériostatique de la fumée en sera d'autant plus réduite. A l'inverse, la fumée se montrera plus efficace si le contenu bactérien est minime. Il est donc vain d'espérer améliorer par le fumage une denrée altérée, mais l'action de la fumée sur les bactéries n'est pas négligeable dans un produit de qualité contenant une flore bactérienne réduite.

Bilan de la qualité bactériologique du saumon fumé

L'énorme différence d'efficacité qui a été constatée entre l'action bactériostatique de la fumée qui s'exerce sur des bactéries isolées [3] et celle qui s'exerce sur les bactéries dans le saumon [1] peut donc s'expliquer par la présence de composés aminés.

Il importe de replacer l'action de la fumée dans le contexte général du traitement du poisson : avant d'être fumés, les filets de saumon sont salés et séchés. Le sel provoque une exosmose en captant une partie de l'eau de constitution de la chair musculaire, et une certaine quantité pénètre à l'intérieur des tissus. Cette déshydratation diminue la disponibilité de l'eau pour la croissance des germes, le sel sélectionne donc les flores en fonction de l'activité de l'eau. Ainsi le salage inhibe la multiplication de la majeure partie des bactéries intervenant dans l'altération, mais favorise celle des halophiles [15]. Les travaux de Liston et coll [16] puis ceux de Weckel et coll. [17] ont permis de déterminer la contribution du sel à la qualité du poisson fumé : il raffermait la chair, empêche la décoloration et donne du goût, mais il n'inhibe pas la croissance bactérienne et n'empêche pas l'altération aux concentrations choisies pour satisfaire

les consommateurs. La concentration de 2 à 3 % de sel retenue pour la plupart des produits modernes n'a qu'un effet minime sur les bactéries puisque l'eau reste liée aux constituants protéiques [18].

Le saumon salé subit un « séchage » qui est l'un des plus anciens procédés de préservation des aliments [19] : du fait de la faible activité de l'eau qui en résulte, les micro-organismes ne peuvent pas proliférer, et la plupart des réactions chimiques et enzymatiques de dégradation sont ralenties.

Des recherches effectuées en 1973 [20] ont amené leurs auteurs à admettre que si les effets du sel, de la fumée et d'autres facteurs sur la conservation du saumon fumé à froid sont à l'heure actuelle assez mal connus, la combinaison du salage, du séchage et du fumage se révèle généralement efficace en retardant l'altération. Les produits fumés ne sont stables que s'ils sont suffisamment déshydratés, ou si la quantité de sel est suffisante pour abaisser l'activité de l'eau à un niveau qui ne permette pas d'activité microbiologique [7].

Des travaux effectués sur le saumon fumé [21] et sur le mulot fumé [22] ont conduit à une conclusion commune : *le plus grand soin doit être apporté au traitement du produit ainsi qu'à son stockage, surtout s'il est peu salé et peu fumé*. La présentation du saumon fumé en bandes pré-tranchées reconstituées nécessite de nombreuses manipulations, chaque tranche étant manipulée plus de 10 fois avant d'être commercialisée : cette pratique devrait faire l'objet d'une hygiène extrêmement rigoureuse. Par ailleurs, il ne faut pas négliger les sources de contaminations importantes que représentent les étapes de décongélation et de tranchage [23].

En conclusion, il s'avère que le fumage entraîne une réduction sensible de la flore bactérienne si le saumon est peu contaminé. *La stabilisation réalisée par la fumée ne permettra une conservation prolongée que si la qualité de la matière première est irréprochable et si le traitement est effectué dans les conditions d'hygiène les plus strictes*; il est indispensable de trouver un procédé de sélection rapide des poissons destinés au fumage pour que le saumon fumé, qui est un produit de luxe, soit un produit de haute qualité.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les Établissements PRODALUX de Boulogne-sur-Mer, qui nous ont permis de réaliser nos expérimentations dans leur atelier de fumage.

RÉSUMÉ

L'action antiseptique de la fumée est étudiée expérimentalement sur *Escherichia coli* en vue d'établir les meilleures conditions opératoires pour le fumage industriel du saumon.

L'analyse des résultats de laboratoire montre que le pouvoir bactéricide de la fumée est en relation avec la composition chimique de la matière première utilisée; la présence de substances possédant des fonctions aminées diminue fortement l'action létale du fumage sur les bactéries : en particulier, l'inhibition observée en présence de ptomaines issues de la dégradation des matières biologiques montre tout l'intérêt qu'il y a à soumettre au fumage uniquement une matière première de qualité.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MALLE P. – Le fumage à froid du saumon. Aspects microbiologiques. Thèse d'Université Lille, 1980.
- [2] MALLE P., EB P. et TAILLIEZ R. – Un saumon fumé sans risque bactériologique. *Le Quotidien du Médecin*, 1980, 2340, 7-8.
- [3] MALLE P., EB P. et TAILLIEZ R. – Étude expérimentale de l'action antiseptique de la fumée sur *E. coli*. *Ind. Ali. Agri.*, 1981, 98, 1-5.
- [4] FOSTER W.W. and SIMPSON T.H. – Studies of the smoking process for foods : the importance of vapors. *J. Sci. Food Agr.*, 1961, 5, 363-374.
- [5] PLICHON B., LUCQUIN M. et GUILLAUME J. B. – Vérification expérimentale des cinétiques de croissance bactérienne obtenues par simulation sur ordinateur. *Ann. Inst. Past. Lille*, 1971, 22, 37-43.
- [6] MACKENZIE E. F. W., WINDLE TAYLOR E., GILBERT W. E. – Recent experiences in the rapid identification of *Bacterium coli* Type I. *J. Gen. Microbiol.*, 1948, 2, 197-204.
- [7] CHAN W. S., TOLEDO R. T. and DENG J. – Effect of smokehouse temperature, humidity and air flow on smoke penetration into fish muscle. *J. Fd. Sci.*, 1975, 40, 240-243.
- [8] ZAITSEV V. I., KIZEVETTER L., LAGUNOV T., MAKAROVA L. and PODSEVALOV V. – Fish curing and processing. MIR Publishers, Moscow, 1969.
- [9] DIEUZEIDE R. et NOVELLA M. – Essai sur la technique de fumage du poisson. *Bull. Stat. Exper. Aquicul. Pêche Castiglione (Alger)*, 1951, n° 169.
- [10] SHEWAN J. M. – The biological stability of smoked and salted fish. *Chemistry and Industry*, 1949, 501-505.
- [11] SHEWAN J. M. – The microbiology of sea-water fish. In G. Borgstrom (Ed.), *Fish and Food*, Academic Press, Inc. New-York, 1961, Vol. 1, 487-560.
- [12] NIELSEN S. F. and PEDERSEN H. O. – Studies on the occurrence and germination of *C. botulinum* on smoked salmon. In M. Ingram and T. A. Roberts (Ed.), *Botulism 1966*, Proc. 5th Int. Symp. Fd Microbiol., Chapman and Hall, London, 1967, 66-72.
- [13] TILGNER D. J. – Effets du fumage et substances actives dans la fumée. *Die Fleishwirtschaft*, 1967, 47, 4.
- [14] DUBOS R. J. and DAVIS B. D. – Factors affecting the growth of tubercle bacilli in liquid media. *J. Exper. Med.*, 1946, 83, 409.
- [15] LECLERC H., BUTTIAUX R., GUILLAUME J. et WATTRE P. – Microbiologie appliquée. Doin (Ed.), Paris, 1977, 2nd Ed.
- [16] LISTON J. and SHEWAN J. M. – Bacteria brought into brines of fish. In B.P. Eddy (Ed.), Proc. 2nd Int. Symp. Fd Microbiol. Her Majesty's Stationary Office, London, 1976, 35-43.
- [17] WECKEL K. G. and WOSJE D. – Brine salting of Great Lakes chub for smoking. University of Wisconsin, College of Agriculture, Madison Res. Rep., 1966, 24.
- [18] DYER W. J. – The salting of codfish. *Fish Res. Bd. Can., Prog. Dept. Atl. St.*, 1942, 32, 6-8.
- [19] CHEFTEL J.-C., CHEPTEL H. et BESANCON P. – Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. *Entr. Mod. (Ed.)*, 1976, Vol. 2, Paris.
- [20] SOUTHCOTT B. A. and RAZZELL W. E. – *Clostridium botulinum* control in cold-smoked salmon : a review. *J. Fish Res. Board Can.*, 1973, 30, 631-641.
- [21] LEE J. S. and PFEIFFER D. K. – Aerobic microbial flora of smoked salmon. *J. Milk Fd Technol.*, 1973, 36, 143-145.
- [22] KOBURGER J. A. and MENDENHALL T. – Smoked mullet quality : an assesment. *J. Milk Fd Technol.*, 1973, 4, 194-195.
- [23] DEMPSTER J. F., REID S. N. and CODY O. – Sources of contamination of cooked, ready to eat cured and uncured meats. *J. Hyg.*, 1973, 71, 815-823.

JFM 00103

Determination of the quality of fish by measuring trimethylamine oxide reduction

P. Malle ¹, P. Eb ² and R. Tailliez ²

¹ *Laboratoire d'Inspection des Produits de la Pêche, Service Vétérinaire d'Hygiène Alimentaire,
Rue Huret Lagache, 62200 Boulogne-sur-Mer and* ² *Laboratoire de Microbiologie,
Institut Agricole et Alimentaire de Lille, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois,
Bâtiment C 6, 59655 Villeneuve D'Ascq Cédex, France*

(Received 1 April 1986; Accepted 23 May 1986)

The sanitary quality of perishable food products can be evaluated through an assessment of the bacterial microflora or by chemical tests such as the determination of total volatile basic nitrogen (TVBN). For deep frozen fish fillet, a method was developed based on the reduction of trimethylamine oxide (TMAO) to trimethylamine (TMA), as measured by a pH change in the cultured medium. The technique is rapid (8 h incubation at 25°C) and can be easily applied in laboratories. Comparison of the results obtained by this method with those based on TVBN and TMA determinations gave good correlations.

Key words: Trimethylamine oxide reduction; Fish, quality; Microbiological test

Introduction

The determination of the freshness of fish by laboratory methods remains difficult in spite of the numerous studies made in this field (Connell, 1980). For intact fish, a sensory evaluation usually allows an assessment of the degree of spoilage during an on site inspection (Gousset et al., 1978). However, in the case of fish fillets or of processed or stabilized products, the organoleptic grading method proposed by Soudan et al. (1957) is no longer adequate and laboratory analysis is necessary.

Many authors, Boury (1936), Farber et al. (1953), Shewan et al. (1957), Collins et al. (1960), Hillig et al. (1960), Pantaleon et al. (1962), Spiegel (1970), have recognized the usefulness of determinations of total volatile basic nitrogen (TVBN) and trimethylamine (TMA), but these studies have not established a definite correlation between the levels of these substances and the quality of the sample. Many contaminating bacteria reduce trimethylamine oxide (TMAO) and form TMA, thus the presence of TMA in muscle can give a very good indication of the level of bacterial contamination (Beatty and Gibbons, 1937; Babitt, 1972). However, it should be mentioned that the significance of the TMA content varies according to the species under consideration, and furthermore, that it is not a good indicator in all species (Soudan, 1965), since the data must be interpreted with great caution.

Studying, in a few species of marine fish, the relationship between the spoilage index and the TVBN level (Malle et al., 1983), we have been able to demonstrate a wide range of TVBN levels corresponding to a particular spoilage index. Official standards do not actually exist, but the TVBN content remains a factor highly regarded by hygienists and an extensively used criterion, in spite of its inadequacy. The other chemical determinations considered to date lend themselves to even greater criticism: hydrogen sulfide, propionic or butyric acid, indole (Boury, 1935), histamine (Nerisson, 1976), hypoxanthine (Jahns, 1976); and they are only applicable in particular cases.

Thus, in view of the generally rapid physico-chemical tests available, whose results are difficult to interpret, bacteriological analysis can permit the evaluation of the hygienic quality. However, the necessity of a long incubation period remains a major inconvenience which is often incompatible with the exigencies of inspection or industry. These two requirements are the basis for the interest in a method that can be rapidly executed and easily interpreted. Our research has been devoted to devising a test capable of satisfying these objectives.

The production of TMA by the reduction of TMAO is due to an enzyme that activates the latter so that it can be reduced by means of multiple bacterial dehydrogenases (Lerke et al., 1965; Tarr, 1939 and 1940). This reduction reaction, which constitutes the principle of the test proposed, begins at the onset of bacterial oxygen deprivation (Watson, 1939). A technique has been designed based upon these facts which allows the determination of the capacity of a bacterial population to reduce TMAO. In the absence of oxygen and in an appropriate culture medium containing TMAO and permitting growth, the bacterial population originating from the sample under analysis reduces TMAO, thus forms TMA. The aim of the study was to see if the evolution of the pH of the culture medium revealed the level of contamination of the muscle and, consequently, the freshness of the fish.

Materials and Methods

All experiments were performed with codfish (*Gadus morrhua*) fillets stored in ice.

TVBN determination using a distillation process

This method was proposed to the 'Comité du Codex Alimentarius' (Food Coding Committee) in 1968, and was tested for its ability to qualitatively evaluate fishery products by Billon et al., 1979.

In order to perform a protein precipitation, 100 g of fish muscle are added to 200 ml of a 7.5% aqueous solution of trichloroacetic acid. After homogenization and centrifugation at 2000 rpm for 5 min, the supernatant is filtered through Whatman No. 3 filter paper in a Buchner funnel.

A Kjeldahl type distillation apparatus (Vapodest 2 Gerhardt) was used. 25 ml of the filtrate are introduced into the distillation tube and then 6 ml of a 10% sodium

hydroxide solution are added (this step is automatic with the Vapodest 2 once the instrument has been started). A beaker containing 10 ml of a 4% boric acid solution added to 4 ml/l of a mixed indicator, composed of methyl red and bromocresol green (Merck 6130), which titers the ammonia level, is placed under the condenser. The apparatus is started and the distillation process is continued until the beaker contains a final volume of 50 ml (40 ml of distillate).

The boric acid solution turns green as a result of the alkalization produced by the TVBN collected. A 0.01 ml graduated microburette containing a 0.1 N aqueous sulfuric acid solution is used to titrate the distillate until complete decoloration (if neutralization has been attained, the addition of one drop of sulfuric acid will cause the solution to become pale pink). If n is the number of ml of sulfuric acid solution used, the TVBN level is equal to $n \times 16.8$ mg of nitrogen per 100 g of fish.

TMA determination

To measure TMA with this distillation procedure, 20 ml of formaldehyde are added to the distillation tube in order to block primary and secondary amines.

Microbiological test for TMAO reduction

A tenfold dilution is prepared by homogenizing 40 g of fish fillets with 360 ml of sterile water containing peptone.

In order to introduce a maximum number of bacteria and to obtain a maximal response after a short period of incubation, 2.7 ml of the tenfold dilution are mixed with 300 μ l of the standard medium: 50 g of trimethylamine N-oxide (Sigma), 1.8 g of glucose, 50 g of sodium chloride, 0 to 34 g of sodium formate, 1 liter of distilled water q.s. After agitation, the pH is approximately 7 (slight variations can be detected depending upon the degree of decomposition). This culture is then covered with 2 cm of mineral oil.

The incubation time is fixed at 8 h, so as to obtain the results within one day. Following this interval at 25°C, a sample is pipetted from the bottom of the tube, under the oil, and the pH is measured to the closest 0.01 with a digital pH meter (Tacussel PHN 81).

The glucose and sodium chloride concentrations of the standard medium were modified and sodium formate was added in order to study their influences upon the response.

Results and Comments

Constitution of the culture medium

Determination of the optimal sodium formate concentration

Tests were performed with culture medium containing 1.7 g or 3.4 g of sodium formate per liter. The results shown on Fig. 1 correspond to cultures established

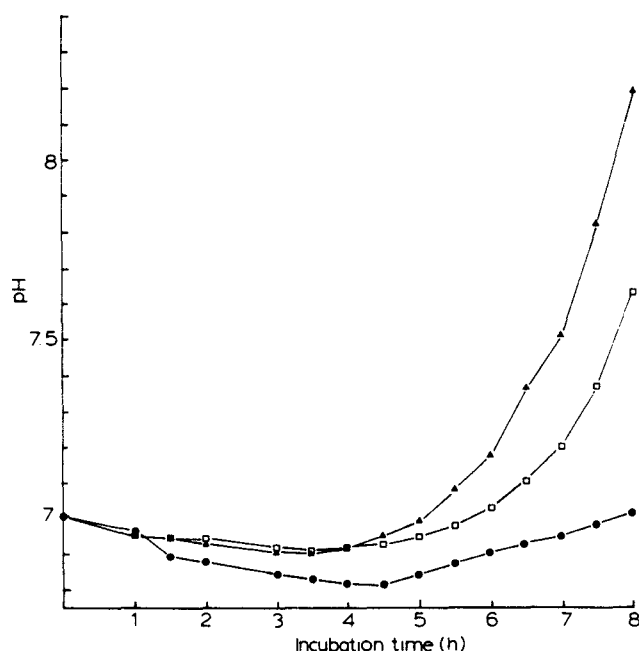


Figure 1. Kinetics of the evolution of the pH with different concentrations of sodium formate: 0 g/l (●); 1.7 g/l (▲); and 3.4 g/l (□) of the culture medium.

using a codfish fillet presenting the following characteristics: TVBN = 37.28 mg/100 g; TMA = 24.52 mg/100 g.

The changes in the pH occur more rapidly in the presence of sodium formate: the concentration of 1.7 g/l, which permitted us to obtain a pH higher than 8 after 8 h, was used for all subsequent experiments. Repeated assays gave analogous results. Sodium formate increased the amplitude of the response without significantly diminishing the lag time which corresponds to the incubation time necessary for the oxygen in the tube to be consumed and thus for the TMAO reduction reaction to start.

Sodium formate is not essential for growth, but intervenes as an energy source (Yamamoto et al., 1977), and trimethylamine oxide serves as the final electron acceptor.

Study of the effect of various sodium chloride concentrations

The composition of the standard medium was altered so as to obtain the following range of concentrations: 4.5, 9.5 and 14.5 g of NaCl/l of culture medium. Fig. 2 presents the results obtained using a codfish fillet having the following characteristics: TVBN = 43.34 mg/100 g; TMA = 31.32 mg/100 g.

The study of the evolution of the pH as a function of the NaCl content of the medium (Fig. 2) shows that the concentration of 4.5 g/l of culture medium is insufficient, since it does not allow significant modification of the pH during the 8 h incubation. On the other hand, the 9.5 and 14.5 g/l concentrations gave similar results and optimal responses. Complementary experiments revealed that a further

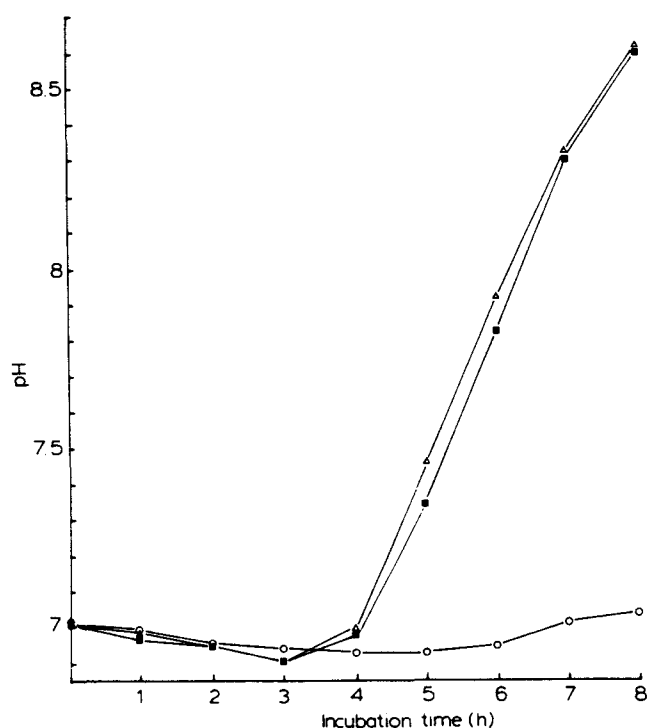


Figure 2. Kinetics of the evolution of the pH with different concentrations of sodium chloride: 4.5 g/l (○); 9.5 g/l (■); and 14.5 g/l (△) of culture medium.

increase in the NaCl concentration over 14.5 g/l did not effect the evolution of the pH. It is generally admitted that bacteria are not very sensitive to changes in the osmotic pressure. Numerous marine halophilic bacteria provide the exception to this rule, since they are adapted to a medium containing 35 g of NaCl/l and it is better to use a concentration of 10 g/l or more to study them (Leclerc et al., 1977).

Study of the effect of various glucose concentrations

The TMAO reduction reaction was studied by Debevere and Voets (1974), who found that a glucose concentration of 0.18 g/l of culture medium (0.001 M) favors the alkalization resulting from the formation of TMA, whereas a concentration of 1.8 g/l (0.01 M) has the opposite effect.

Our experiments performed in the absence of glucose or in the presence of 0.18 g/l gave similar curves of pH modification as a function of incubation time (Fig. 3), and indicated only a slight positive influence of glucose.

Choice of the incubation temperature

We performed parallel incubations at 25°C and 37°C. Fig. 4 shows the evolution of the pH measured at these two temperatures using a codfish fillet having a TVBN content of 30.06 mg/100 g and a TMA level of 12.59 mg/100 g. The curves obtained indicate that the bacteria responsible for the alkalization of the medium, which results from the reduction of TMAO, grow better at 25°C than at 37°C. The

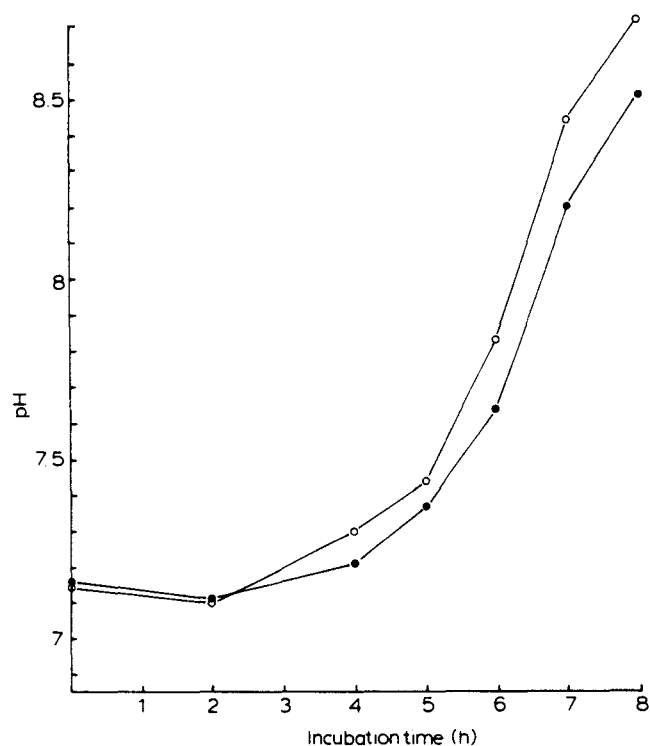


Figure 3. Kinetics of the evolution of the pH without glucose (●) and with 0.18 g/l (○) of culture medium.

majority of bacteria encountered in fish and crustaceans as well as in sea water, usually grows at temperatures below $+10^{\circ}\text{C}$ (Billon, 1976). In addition to the psychrophiles that require a temperature near 0°C ($+1^{\circ}$ to $+2^{\circ}\text{C}$) to proliferate

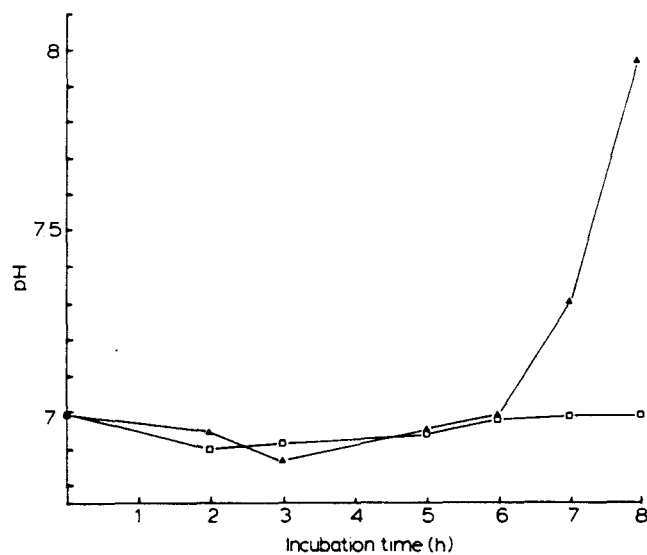


Figure 4. Kinetics of the evolution of the pH according to the incubation temperature: 25°C (▲) and 37°C (□).

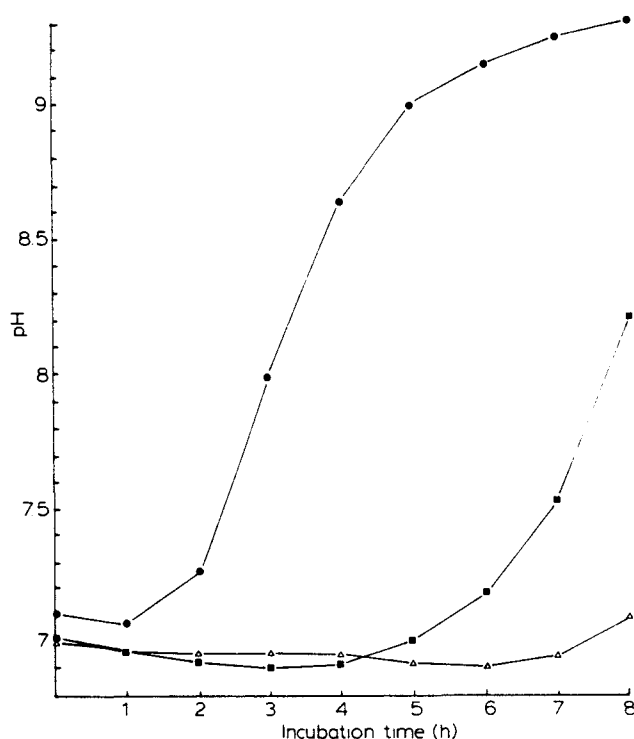


Figure 5. Kinetics of the evolution of the pH obtained with codfish fillets having different levels of decomposition: 17.46 mg TVBN/100 g (Δ); 37.28 mg TVBN/100 g ($\blacksquare$); and 81.32 mg TVBN/100 g ($\bullet$).

(Leclerc et al., 1977), psychrotrophic bacteria that multiply at low temperatures but tolerate temperatures of 20 to 30°C, are also found in fish. The psychrotrophic bacteria, which constitute the predominant microorganisms found in ocean fish fillets (Lerke et al., 1965) poorly tolerate temperatures superior to 30°C. This can explain the differences observed at the two incubation temperatures studied.

Kinetic study of the evolution of the pH as a function of the degree of decomposition

In the multiple kinetic studies of the evolution of the pH performed, a slight acidification of the medium is always noted in the initial phase. At the onset of the incubation, anaerobic conditions are not completely established, thus the aerobic-anaerobic bacteria and the aerobic bacteria consume the remaining oxygen, and it can be thought that they metabolize the glucose while producing acid compounds.

Fig. 5 shows that the lag time is shortened as the degree of decomposition, as assessed by the TVBN level, increases. Thus, in order to obtain a significant response after 8 h of incubation, it is necessary that the product being analyzed contain a sufficient quantity of bacteria. This threshold level of contamination is more easily attained with fillets. In fact, other experiments have shown that for analogous TVBN values, the pH levels measured were very different depending upon whether the sample was taken from a fillet or from the center of a muscle within an intact fish. The microbiological test, under the conditions that we have

described, can only be applicable to those products presenting sufficient levels of contamination. This threshold explains why this test was used to study fish fillets.

Study of the correlation between the test for TMAO reduction and the different physico-chemical criteria

Codfish fillets preserved in ice (under rigorously constant conditions throughout the entire storage period) were used to test, in parallel, TMAO reduction and the levels of TVBN and TMA as determined by the distillation procedure described above. The evolution of the pH of the culture medium, as assayed by the TMAO reduction test, plotted as a function of the TVBN/TMA ratio can be seen on Fig. 6.

It has previously been specified that TVBN and TMA levels provide information allowing a determination of the freshness of fish, but they do not under any circumstances constitute absolute criteria.

For 17 paired values, the correlation between the pH and the TVBN level is significant, at a 1% risk ($r = 0.795$). The relationship between the pH and the TMA level ($r = 0.847$) is even better correlated. Finally, the most significant correlation

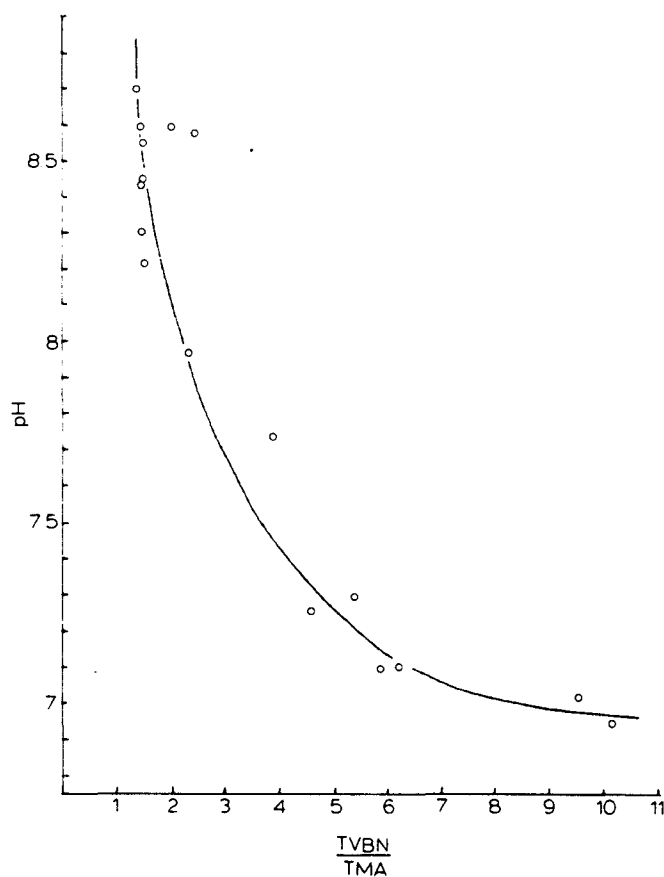


Figure 6. Correlation between the pH values (measured after 8 h of incubation at 25°C) and the TVBN/TMA ratio.

was found between the pH and the TVBN/TMA ratio ($r = 0.901$). In all three cases, the Student's test demonstrates that the probability is less than 0.001 ($t = 5.076$, $t = 6.171$, $t = 8.044$).

Discussion and Conclusion

The advantage of the technique proposed, the measurement of alkalization of a culture medium resulting from the production of TMA by bacterial microorganisms, was demonstrated by comparing it with the physico-chemical criteria, and the statistical correlations are significant. The pH values measured essentially reveal the production of TMA from TMAO, but may also include the formation of other compounds, most notably mono- and diethylamines (Sainclivier, 1983). This assay is based upon the TMA-producing TMAO reduction, which is one of the best known bacterial decomposition reactions studied in fish (Soudan, 1965). It represents an indirect expression of the capacity of the microorganisms present to decompose muscle tissue. In the flesh of dead fish, once the oxygen has been consumed, numerous bacteria use TMAO as the terminal electron acceptor (Yamamoto et al., 1977). The experimental conditions that we have described (i.e., the composition of the medium and oxygen deprivation) allow us to create for the bacteria the physiological environment analogous to that of the dead fish, by limiting the buffering effect of the muscle tissue (Cheftel et al., 1976).

In addition, this test is directly aimed at those bacteria capable of reducing TMAO to form TMA. Studies by Reay et al. (1949), Adams et al. (1964) and Soudan (1965) showed that this transformation involves only a fraction, between 0.05% and 43%, of the total bacterial population. The bacteria which reduce TMAO in the fish are primarily psychrotrophic Gram negative and oxidase positive (Watson, 1939; Tarr, 1940) bacteria of the types *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, (Lerke et al., 1965) and *Flavobacterium* (Castell et al., 1952); and secondarily, Enterobacteriaceae, with the exception of *Shigella* and *Erwinia* (Wood et al., 1943). The Micrococcaceae do not as a rule reduce TMAO (Debevere et al., 1974).

The limitations of this test are, for the most part, linked to the threshold of contamination. Preliminary assays showed that products containing an abundance of microbes gave significant results in a shorter period of time. In contrast, products only slightly contaminated by bacteria required a prolonged incubation time, over 8 h. The application of this test to foodstuffs other than refrigerated fish can be foreseen. In fact, assays performed with frozen fish gave good results provided that the incubation period was extended (data not shown). It could be applied to other products (meat, milk, etc.), using the same basic principle, once the composition of the standard medium has been appropriately adapted and the pH and temperature conditions identified, so as to provide the optimal microenvironment for the TMAO-reducing bacteria implicated in the decomposition.

Acknowledgments

The authors would like to thank Sylvie Degremont for her collaboration on this study.

References

- Adams, R., L. Farber and P. Lerke, 1964. Bacteriology of spoilage of fish muscle. II. Incidence of spoilers during spoilage. *Appl. Microbiol.*, 12, 277-279.
- Babitt, J.K., 1972. Decomposition of oxide and changes in protein extractibility during frozen storage of minced and intact hake (*Merluccius productus*) muscle. *J. Agric. Food Chem.* 20, (5), 1052-1054.
- Beatty, S.A. and N.E. Gibbons, 1937. The measurement of spoilage in fish. *J. Biol. Bd. Can.* 3, 77-91.
- Billon, J., 1976. Intérêt du froid dans la conservation du poisson et des crustacés: aspects microbiologiques. *Bull. Acad. Vét. France* 49, 333-339.
- Billon, J., N. Ollieuz and S.H. Tao, 1979. Etude d'une nouvelle méthode de dosage de l'azote basique volatil total pour l'évaluation qualitative des produits de la pêche. *R.T.V.A.*, 149, 13-17.
- Boury, M., 1935. L'altération du poisson. *Rev. Trav. Off. Pêches Mmes.* 8, 31, 282-333.
- Boury, M., 1936. L'altération du poisson. *Rev. Trav. Off. Pêches Mmes.* 9, 36, 401-419.
- Castell, C.H. and E.G. Mapplebeck, 1952. The importance of *Flavobacterium* in fish spoilage. *J. Fish. Res. Board Canada*, 9, 148-156.
- Cheftel, J.C., H. Cheftel and P. Besancon, 1976. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. *Entr. Mod. Vol. 2*, Paris.
- Collins, J., H. Seagran and J. Iverson, 1960. Processing and quality studies on shrimp held in refrigerated sea water and ice: comparison of objective methods for quality evaluation of raw shrimp. *Commerc. Fish Res.* 22, (4), 1-5.
- Connell, J.J., 1980. Sensory and non-sensory of fish. In: *Advances in fish science and technology*. Fishing News Books Ltd. Farnham, England, 56-64.
- Debevere, J.M. and J.P. Voets, 1974. A rapid selective medium for the determination of trimethylamine oxide-reducing bacteria. *Z. Allg. Mikrobiol.* 14, 8, 655-658.
- Easter, M.C., D.M. Gibson and F.B. Ward, 1983. The induction and location of trimethylamine-*N*-oxide reductase in *Alteromonas* sp. NCMB 400. *J. Gen. Microbiol.* 129, 3689-3696.
- Farber, L. and A. Cederquist, 1953. The determination of volatile reducing substances as an aid in quality control of fish products. *Food Technol.* 7, (2) 478-480.
- Gousset, J., G. Tixerant and M. Roblot, 1978. Inspection des produits de la pêche: poissons, crustacés, mollusques. Informations techniques des Directions des Services Vétérinaires. 3rd edn. 5, rue Ernest Renan, 92130 Issy-les-Moulineaux, France.
- Hillig, F., L.R. Shelton, Jr., J.N. Louchery and B.B. Fitzgerald, 1960. Chemical indices of decomposition in flounder. *J. Assoc. Offic. Agric. Chem.* 43, (4), 755-759.
- Jahns, F.D., 1976. A rapid visual enzyme test to assess fish freshness. *Food Technol.* 30, (7) 27-30.
- Leclerc, H., R. Buttiaux, J. Guillaume and P. Wattre, 1977. Microbiologie appliquée. Doin 2nd edn., Paris.
- Lerke, P., R. Adams and L. Farber, 1965. Bacteriology of spoilage of fish muscle. III. Characterization of spoilers. *Appl. Microbiol.* 13, 625-630.
- Malle, P., G. Nowogrocki and R. Tailliez, 1983. Corrélation entre l'indice d'altération et l'azote basique volatil total pour divers poissons marins. *Sci. Aliments* 3, (2), 311-322.
- Nerisson, P., 1976. L'histamine comme indicateur d'altération. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 39, (4), 471-482.
- Pantaleon, J. and R. Rosset, 1962. Contrôle de la qualité et de la salubrité du poisson et des coquillages. Association Vétérinaire d'Hygiène Alimentaire. 28, Rue des Petits Hôtels, Paris 10.
- Reay, G.A. and J.M. Shewan, 1949. The spoilage of fish and its preservation by chilling. *Adv. Food Res.* 3, 344-398.

- Sainclivier, M., 1983. L'industrie alimentaire halieutique. Vol. 1: le poisson matière première. Bull. Soc. Techn. E.N.S. Agro, Rennes.
- Shewan, J.M. and A.S.C. Ehrenberg, 1957. Volatile bases as quality indices of iced north sea cod. J. Sci. Food Agric. 8, 227-239.
- Soudan, F., A. Daknof, J. Bazin, G. Chapel, G. Daspet and R. Seynave, 1957. Appréciation de l'altération du poisson frais par un examen organoleptique systématique. Annal. Nutr. Alimentation 11, 1-24.
- Soudan, F., 1965. Conservation par le froid des poissons, crustacés et mollusques, Baillière et Fils, Paris.
- Spiegel, M.R., 1970. Estatística. Frad. Pedro Constantino, Rio de Janeiro, Mc Graw Hill de Brasil, pp. 362-400.
- Sternberg, E., O.B. Styrvoid and A.R. Strom, 1982. trimethylamine oxide respiration in *Proteus* sp. strain NTHC153: electron transfer-dependent phosphorylation and L-serine transport. J. Bacteriol. 149 (1), 22-28.
- Tarr, H.L.A., 1939. The bacterial reduction of trimethylamine oxide to trimethylamine. J. Fish. Res. Board Canada 4, 367-377.
- Tarr, H.L.A., 1940. Specificity of triaminoxidase. J. Fish. Res. Board Canada 5, 187-196.
- Watson, D.W., 1939. Studies of fish spoilage. IV. The bacterial reduction of trimethylamine oxide. J. Fish Res. Board Canada 4, 252-280.
- Wood, A.J. and E.A. Baird, 1943. Reduction of trimethylamine oxide by bacteria. I. The bacteriaceae. J. Fish. Res. Board Canada 6, 194-201.
- Yamamoto, I. and M. Ishimoto, 1977. Anaerobic growth of *Escherichia coli* on formate by reduction of nitrate, fumarate and trimethylamine N. oxide. Z. Allg. Mikrobiol. 17, 3, 235-242.

Reprinted from

Journal of Food Protection, Vol. 50, No. 9, Pages 756-760 (September 1987)

Copyright© International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians

Rapid Quantitative Determination of Trimethylamine using Steam Distillation

P. MALLE¹ and S. H. TAO²

Ministere de l'Agriculture, Direction de la Qualite, Laboratoire d'Inspection des Produits de la Peche, Service Veterinaire d'Hygiene Alimentaire, rue Huret Lagache, 62200 Boulogne-Sur-Mer, France and Ministere de l'Agriculture, Direction de la Qualite, Laboratoire Central d'Hygiene Alimentaire, 43, rue de Dantzig, 75015, Paris, France

(Received for publication May 14, 1986)

ABSTRACT

A simple, rapid and inexpensive method is proposed for determination of trimethylamine (TMA) in fish muscle. This procedure includes a deproteinization step with trichloroacetic acid (TCA) followed by blocking of primary and secondary amines using formaldehyde at alkaline pH and finally steam distillation of TMA. No statistically significant differences were found between this new optimized procedure and either the Conway microdiffusion method or the colorimetric method. Using the technique proposed here it is possible to assay both the total volatile basic nitrogen (TVBN) and the TMA in less than 30 min.

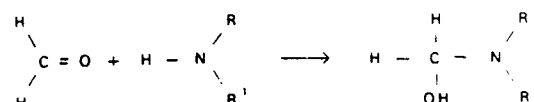
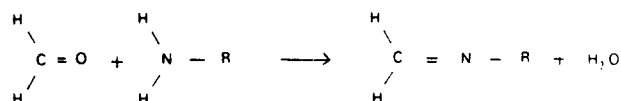
Quantitative determination of the total volatile basic nitrogen (TVBN) developed 50 years ago by Boury (3) is widely used as an indicator of fish and seafood quality. The work published by Pantaleon and Rosset (13) on this method in 1962 led to its adoption by many laboratories. When we compared the deterioration index and the TVBN levels for a given species, however, we (11) found that there was a wide variation in the TVBN for the same deterioration index. The TVBN test cannot therefore be considered to be an absolute criterion of fish quality, despite its popularity among food sanitarians.

On the other hand, in certain species, the amount of trimethylamine (TMA) present in fish may be a very good indicator of the level of bacterial contamination (1). The significance of the TMA test has been a subject of controversy because of the variation among fish species (16) and it has been shown that the use of the TMA assay as an indicator of quality depends on the presence of *Pseudomonas putrefaciens*, or a similar TMA-producing species in the contaminating flora (9).

Several colorimetric (5,15), volumetric (2,4), enzymatic (8) and chromatographic (5,7,10,13,14) methods are available for TMA quantification. The chromatographic technique appears to be the most sensitive and specific though it is very time-consuming and requires expensive materials and apparatus.

We attempted to apply the methodology usually employed for the assay of TVBN (2) to quantify TMA values for evaluating fish quality and the levels of deterioration.

To measure TMA alone, formaldehyde may be used to block the primary and secondary amines according to the following reactions:



The resulting compounds are not volatile and will not interfere with the assay of TMA. In this report, we evaluate the new technique by comparing it with the Conway diffusion method and a colorimetric method for the determination of fish quality.

MATERIALS AND METHODS

Assay of the total volatile basic nitrogen (TVBN) by steam distillation

One hundred grams of fish muscle were homogenized in 200 ml of 7.5% aqueous TCA (trichloroacetic acid) solution. The homogenate was centrifuged at 400 × g for 5 min and the supernatant liquid was filtered through a Büchner funnel using a Whatman No. 3 filter paper. Steam distillation was carried out using a Kjeldahl-type distillator. Twenty-five milliliters of filtrate were loaded into the distillation tube followed by 5 ml of 10% NaOH.

A beaker containing 10 ml of a 4% aqueous boric acid solution and 0.04 ml of methyl red and bromocresol green indicator for titration of ammonia was placed at the end of the condenser. Distillation was continued until a final volume of 50 ml was obtained in the beaker (40 ml of distillate).

The boric acid solution turned green when alkalized by the distilled TVBN. This was titrated using a 0.01-ml graduated microburette containing an aqueous 0.1 N sulfuric acid solution.

¹Laboratoire d'Inspection des Produits de la Peche.

²Laboratoire Control d'Hygiene Alimentaire.

Complete neutralization was obtained when the color turned pink on the addition of a further drop of sulfuric acid.

The quantity of TVBN in mg was determined from the volume of sulfuric acid (n ml) added as follows:

$$\text{TVBN} = n \times 16.8 \text{ mg of nitrogen/100 g}$$

Proposed method: assay of trimethylamine (TMA) by steam distillation

Modification of the TVBN assay. To determine the amount of formaldehyde required to react with the primary and secondary amines, increasing quantities of formaldehyde were added to 24 ml of filtrate. Steam distillation was then performed as for TVBN determination. The amount of volatile amines was measured and the results expressed in mg of nitrogen/100 g.

Calculation of the TMA. When the required amount of formaldehyde was added, only the TMA was distilled. The TMA content was calculated from the volume of 0.1 N sulfuric acid used for titration (n' ml) as follows:

$$\text{TMA} = n' \times 16.8 \text{ mg nitrogen/100 g}$$

TMA assay by Conway's method

One-hundred grams of fish muscle were homogenized in 50 ml of water and deproteinized by further homogenization in 50 ml of 20% TCA solution. The homogenate was centrifuged at $400 \times g$ for 5 min and the supernatant liquid was filtered.

Microdiffusion was carried out in a Conway chamber: 1 ml of water, 0.5 ml of a nonacidic 40% formaldehyde solution and 1 ml of the filtrate were loaded on the chamber side and 1 ml of a 1% boric acid solution in the center of the chamber. Boric acid (1%) was prepared as follows: one gram of boric acid was dissolved in 200 ml of 95% alcohol and 700 ml water. Ten milliliters of a mixture of 0.033% bromocresol green and 0.066% methyl red were then added and the final volume was made up to 1 L with water. The pH was adjusted to 5.

One milliliter of a saturated (112%) aqueous potassium carbonate solution (112 g of potassium carbonate may be dissolved in 100 ml) was added to the side trough and the chamber was closed with a grease-coated cover. The contents of the side trough were mixed carefully by rotating the chamber. The chamber was incubated at $35^\circ\text{C} \pm 1$ for 2 h.

After incubation, the boric acid solution, colored green, was neutralized with 0.01 N HCl. The quantity of TMA in the sample was calculated from the volume of HCl added (n ml) as follows:

$$\text{TMA} = n \times 27.67 \text{ mg of nitrogen/100 g of fish}$$

Quantitative determination of TMA using a colorimetric method

One hundred grams of fish muscle were deproteinized as described previously and the filtrate was collected. TMA was assayed as the picrate salt by colorimetry. One milliliter of filtrate and 3 ml of water were added to a test tube. Three other test tubes received 1, 2 and 3 ml of a standard TMA solution (concentration = 0.01 mg/ml) and 3, 2 and 1 ml of distilled water, respectively. The TMA stock solution was prepared by adding 1 ml of HCl to 0.682 g of TMA and making up to a final volume of 100 ml with distilled water.

To prepare the TMA standard solution, 1 ml of the stock solution was mixed with 1 ml of HCl and diluted to 100 ml with water. A 5th tube containing 4 ml of water was used as a blank for colorimetry.

One milliliter of a 20% formaldehyde solution, 10 ml of toluene and 3 ml of saturated potassium carbonate solution were placed in the 5 tubes. The 20% formaldehyde solution was prepared as follows: 100 g of magnesium carbonate and 1 L of

commercial formaldehyde (40%) were shaken and filtered. One hundred milliliters of this stock solution were diluted to 200 ml with water.

The 5 tubes were shaken vigorously for 40 s; 8 ml of the toluene phase were then transferred to a tube containing 0.2 g of anhydrous sodium sulfate and shaken until dehydrated. Five milliliters of the dehydrated toluene phase were mixed in another tube with 5 ml of picric acid solution prepared by diluting 1 ml of a picric acid stock solution to 100 ml with toluene. The picric acid stock solution was prepared by dissolving 2 g of picric acid in 100 ml of toluene.

Optical densities (OD) were measured using a Lambda 1 Perkin Elmer spectrophotometer at a wavelength of 410 nm. If the OD measured in the tube was greater than 0.8, the sample was diluted to obtain an OD of between 0.2 and 0.8.

A standard curve plotted from the standard solution values was used to determine the quantity of TMA in the samples in mg from their OD values. The quantity per 100 ml of fish was given by:

$$\text{TMA} = x \text{ mg} \times 300 \text{ mg nitrogen/100 g of fish}$$

Statistical analysis

The coefficient of correlation was calculated to compare the results obtained using the different TMA assay methods.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of a rapid technique for the assay of TMA

Data for haddock (*Melanogrammus aeglefinus*), cod (*Gadus morrhua*) and scorpionfish (*Sebastes marinus*) using increasing amounts of formaldehyde are given in Table 1. These results show the following. In the absence of formaldehyde, the value corresponds to the total volatile basic nitrogen (TVBN). The quantity of amines assayed decreased as the volume of formaldehyde added increased from 0 to 14 ml because of the blocking reactions with all the volatile amines except TMA. A plateau was observed at formaldehyde volumes of from 15 to 18 ml when the quantity of amines recovered was constant. Only the TMA was distilled under these conditions and all the other amines were blocked. Eighteen milliliters of formaldehyde were therefore sufficient to assay the TMA alone and 20 ml of formaldehyde were chosen as the reaction volume in this test.

Comparison with the Conway method

The TMA values obtained with our method were compared with those obtained by the Conway method. Tables 2 and 3 show the results for haddock and other species.

For the results in Table 2, the coefficient of correlation r was 0.982, which is significant at $P < 0.01$. For the results in Table 3, r was 0.969, which is significant at $P < 0.01$. To conclude, there was a highly significant relation between the results obtained by both methods.

Comparison between the colorimetric and Conway methods and the proposed technique

The TMA values obtained with the proposed method were compared with those obtained by the colorimetric and Conway methods. The three techniques performed on the same haddock samples gave the results in Table 2

TABLE 1. Amount of amines in fish filets measured in the presence of increasing volumes of formaldehyde.

Species	Formaldehyde (ml)	Amines (mg/nitrogen/100 g)				
		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5
Haddock	0	24.48	24.48	19.99	19.58	18.36
	5	-- ^a	--	--	14.28	--
	10	--	--	--	--	--
	14	7.75	--	--	8.16	--
	15	6.12	7.75	--	6.12	3.87
	16	6.12	7.34	--	--	3.67
	17	--	--	5.71	--	--
	18	--	5.71	--	5.10	--
	19	--	5.71	--	--	--
	20	6.12	--	5.71	5.10	3.67
	25	6.12	--	5.71	--	3.67
Scorpionfish	0	27.74	24.48	24.07	20.40	
	5	--	--	--	18.76	
	10	--	--	10.20	8.97	
	13	11.01	--	--	--	
	14	--	--	9.79	--	
	15	10.02	8.97	9.38	8.16	
	16	10.02	8.56	--	--	
	17	--	--	--	--	
	18	--	8.16	8.36	--	
	19	--	--	--	--	
	20	10.02	8.16	8.36	7.75	
	25	--	--	8.36	7.75	
Cod	0	15.91				
	5	15.91				
	10	8.56				
	15	5.98				
	16	4.48				
	17	4.48				
	19	4.48				
	20	4.48				
	25	4.48				

^aNot determined.

(series 1). The significant relation between the results obtained by steam distillation and colorimetry was demonstrated by the correlation coefficient r of 0.950 which is significant at $P < 0.01$.

The TMA assay, after blocking of the primary and secondary amines with formaldehyde in an alkaline medium and steam distillation, gave satisfactory results as there was a highly significant agreement with the results obtained using the Conway method and the colorimetric method.

If the results obtained by the three methods are compared, those obtained using our method were higher than those given by the colorimetric method and the data obtained with the Conway method were even lower. However, a satisfactory correlation between these methods was found.

We mentioned above that the two criteria, TVBN and TMA, are insufficient when considered alone. We found that the simultaneous measurement of both these parameters provided a better indication of the deterioration of fish and our results on the significance of the TMA/TVBN ratio will be published shortly. As the objective is to accurately determine this ratio, the differences ob-

served between the methods for determination of TMA will have little effect on the TMA/TVBN ratio if the two criteria are assayed according to the same principle as analogous differences will occur in the determination of the TVBN. Two of the three methods employed here may be used to assay both TVBN and TMA: the Conway method and the steam distillation method.

This steam distillation method was found to have the same advantages of simplicity and efficiency when used for the assay of TMA as described for TVBN. As far as rapidity is concerned, this essential criterion was fully satisfied by this technique as both TVBN and TMA could be determined in less than 30 min. Because of this important advantage, we have continued our study of the optimization of these two chemical criteria for the evaluation of fish quality.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Véronique Maillard, Sylvie Degremont, J. Marc Fremy, Martine Poumeyrol and Kasra Mohanna for their technical assistance and suggestions during the preparation of this manuscript.

TABLE 2. Comparison of the levels of TMA in haddock as measured by the steam distillation method, Conway microdiffusion method and the colorimetric method.

Series	Sample	TMA levels (mg nitrogen/100 g)		
		Steam distillation	Microdiffusion (Conway)	Colorimetry
1	1	1.68	1.67	1.40
	2	3.36	2.94	2.00
	3	4.52	2.72	2.91
	4	4.88	3.22	3.93
	5	5.04	8.78	3.96
	6	11.08	8.11	9.30
	7	11.34	7.36	10.08
	8	11.76	8.78	9.60
	9	18.48	13.10	13.20
	10	18.48	13.80	22.50
	11	27.88	14.64	22.26
Mean		10.77	7.73	9.19
2	1	2.68	2.78	
	2	2.84	2.08	
	3	3.02	2.30	
	4	4.70	3.55	
	5	5.44	5.08	
	6	9.40	6.90	
	7	18.48	18.32	
	8	33.82	28.06	
	9	34.26	22.59	
	10	36.82	35.41	
	11	39.94	32.77	
	12	47.23	31.37	
	13	55.00	44.02	
	14	57.45	39.32	
	15	79.75	65.43	
Mean		28.72	22.66	

TABLE 3. Comparison of TMA levels in various species as measured by 2 methods.

Sample	Series	TMA levels (mg nitrogen/100 g)	
		Steam distillation	Microdiffusion (Conway)
1	<i>Gadus morrhua</i>	13.44	9.07
2	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	21.84	17.16
3	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	26.88	24.42
4	<i>Merlangus merlangus</i>	10.08	8.91
5	<i>Merlangus merlangus</i>	25.20	24.25
6	<i>Merlangus merlangus</i>	47.92	42.57
7	<i>Molva molva</i>	25.50	26.07
8	<i>Molva molva</i>	30.24	26.73
9	<i>Molva molva</i>	44.24	28.05
10	<i>Oncorhynchus nerka</i>	5.10	3.30
11	<i>Phycis phycis</i>	10.50	9.57
12	<i>Phycis phycis</i>	51.24	45.04
13	<i>Pollachius virens</i>	5.88	3.63
14	<i>Trachurus trachurus</i>	9.24	8.58
Mean		23.35	19.81

REFERENCES

1. Babbitt, J. K. 1972. Decomposition of TMA oxide and changes in protein extractability during frozen storage of minced and intact hake (*Merluccius productus*) muscle. J. Agric. Food Chem. 20:1052-1054.
2. Billon, J., N. Ollieuz, and S. H. Tao. 1979. Etude d'une nouvelle méthode de dosage de l'azote basique volatil total pour l'évaluation qualitative des produits de la pêche. Rev. Tech. Vét. de l'Alimentation 149:13-17.
3. Boury, M. 1936. L'alteration du poisson. Rev. Trav. off. Pêche Mmes. 9:401-419.

4. Conway, E. J. 1962. Determination of volatile amines. pp 195-200. In E. J. Conway. Microdiffusion analysis and volumetric error, 5th ed. Crosby Lockwood, London. 467 p.
5. Dyer, W. J. 1945. Amines in fish muscle. I Colorimetric determination of trimethylamine as the picrate salt. J. Fish. Res. Bd. Canada 6:351-358.
6. Gruger, E. H. 1972. Chromatographic analyses of volatile amines in marine fish. J. Agr. Food Chem. 20:781-785.
7. Keay, J. N., and R. Hardy. 1972. Separation of aliphatic amines in dilute aqueous solution by gas chromatography and application of this technique to the quantitative analysis of tri and di methylamine in fish. J. Sci. Food Agr. 23:9-19.
8. Large, P. J., and H. McDougall. 1975. An enzymatic method for the microestimation of trimethylamine. Anal. Biochem. 64:304-310.
9. Laycock, R. A., and L. W. Regier. 1971. Trimethylamine-producing bacteria on haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) fillets during refrigerated storage. J. Fish. Res. Bd. Canada 28:305-309.
10. Lundstrom, R. C., and L. D. Racicot. 1983. Gas chromatographic determination of dimethylamine and trimethylamine in seafoods. J. Assoc. Anal. Chem. 66:1158-1162.
11. Malle, P., G. Nowogrocki, and R. Tailliez. 1983. Relationship between deterioration index and rates of total volatile basic nitrogen for marine fish. Sci. Aliments 3:311-322.
12. Miller, A., R. A. Scanlan, J. S. Lee, and L. M. Libbey. 1972. Quantitative and selective gas chromatographic analysis of di and tri methylamine in fish. J. Agr. Food Chem. 20:709-711.
13. Pantaleon, J., and R. Rosset. 1962. Controle de la qualite et de la salubrite du poisson et des coquillages. Assoc. Vet. d'Hygiene Alimentaire, 28 rue des Petits Hotels. Paris 10 eme.
14. Ritskes, T. M. 1975. Gas chromatographic determination of trimethylamine and dimethylamine in fish, fishery products, and other foods. J. Food Technol. 10:221-228.
15. Shewan, J. M., D. M. Gibson, and C. K. Murray. 1971. Estimation of trimethylamine in fish muscle. Fish Insp. Qual. Contr. 71:183-186.
16. Soudan, F., M. Anquez, and A. Benezit. 1965. L'alteration spontanée du poisson. pp. 58-86. In F. Soudan (ed.), Conservation par le froid des poissons, crustacés et mollusques. Baillere et Fils. Paris. 514 p.

RECHERCHE

TENEUR EN AZOTE BASIQUE VOLATIL TOTAL DU TISSU MUSCULAIRE DES POISSONS MARINS

Éléments pour une normalisation de la détermination, de l'expression et de l'exploitation de l'ABVT ⁽¹⁾

par P. Malle* A.M. Vanelle** et A. Petit**

RÉSUMÉ — La comparaison entre les résultats des deux méthodes les plus largement employées pour déterminer les taux d'Azote Basique Volatil Total a permis de définir la droite de régression exprimant les valeurs obtenues par entraînement à la vapeur en fonction des valeurs obtenues par microdiffusion.

Les avantages respectifs de ces deux méthodes ont été soumis à une comparaison. Après avoir établi l'incidence de certains paramètres sur les teneurs en ABVT, nous avons proposé un mode d'expression commun des résultats en azote, et une démarche pour l'interprétation qui tienne compte des facteurs de variabilité. Des valeurs de référence sont indiquées pour les poissons marins réfrigérés ou congelés avec des éléments complémentaires d'exploitation de ces critères.

Mots clés : Azote Basique Volatil Total - Poissons marins - Altération - Critères chimiques.

Rec. Méd. Vét., 1989, 165, (4), 395-402

INTRODUCTION

La putréfaction résulte de l'action conjuguée des réactions de glycolyse, lipolyse et protéolyse. Chez le poisson, pour apprécier le niveau de dégradation, on s'intéresse davantage au catabolisme des substances protéiques, compte-tenu de sa pauvreté en glucides, de la complexité des lipides et de leur variabilité qualitative et quantitative.

Sans vouloir négliger l'action des enzymes tissulaires, il apparaît que c'est essentiellement sous l'action des enzymes bactériennes que les protéines sont hydrolysées en peptides puis en acides aminés. Ceux-ci sont ensuite métabolisés selon 2 voies principales : les désaminations conduisant à l'ammoniac et à diverses chaînes hydrocarbonées, et les décarboxylations conduisant à la formation d'amines souvent volatiles et responsables de l'odeur spécifique des putréfactions (19). Par ailleurs, de nombreuses bactéries peuvent, en l'absence d'oxygène, produire de la triméthylamine (TMA) en utilisant comme accepteur d'hydrogène l'oxyde de TMA, substance présente dans le tissu musculaire du poisson marin (20). On obtient donc un certain nombre de composés azotés présentant en commun la basicité et la volatilité, dosables par acidimétrie après entraînement à la vapeur ou microdiffusion. Cet ensemble, formé par l'ammoniac et diverses

amines volatiles dont la triméthylamine, constitue l'azote basique volatil total (A.B.V.T.).

De nombreux autres produits de dégradation ont retenu l'attention des chercheurs pour déterminer par des mesures chimiques le niveau d'altération du poisson : les acides volatils (15), l'hypoxanthine (3), (7), (17), l'indole, le scatole, l'histamine (14), les acides aminés. Ces dosages présentent divers inconvénients : soit la technique est relativement longue, soit les résultats ne sont significatifs que dans certaines espèces ou à un niveau d'altération très avancé, soit la fiabilité du critère s'est révélée discutable à l'usage.

Toutefois, des déterminations très fines des taux de diverses polyamines (putrescine, cadavérine, spermine, spermidine) et de l'histamine en HPLC (13) permettent d'espérer la mise en place de nouveaux critères dans les prochaines années, dès l'instant où un mode d'extraction rapide et performant sera au point.

Actuellement, le dosage de l'ABVT garde toujours l'avantage de pouvoir être réalisé avec des techniques simples, économiques et rapides, ce qui lui a valu l'intérêt qu'il suscite depuis plus de 50 ans. Et en dépit de ses insuffisances désormais bien

* Ministère de l'Agriculture. Direction Générale de l'Alimentation. Laboratoire des Services Vétérinaires - Rue Huret Lagache - 62200 Boulogne-sur-Mer - France.

** Ministère de l'Agriculture. Direction Générale de l'Alimentation. Laboratoire des Services Vétérinaires du Val de Marne - 2 Rue du Caducée B.P. 435 - 94155 Rungis France.

(1) Manuscrit reçu le 20 juin 1988, accepté le 10 janvier 1989.

396 connues (9), il permet une approche de l'état de fraîcheur du poisson.

Dans ce travail, nous avons comparé les 2 méthodes les plus employées pour déterminer le taux d'ABVT. La première, dont le principe est un entraînement à la vapeur, a été proposée au Comité du Codex Alimentarius par Billon et al. (2). La seconde est la méthode de microdiffusion de Conway (4) appliquée par Beatty et Gibbons (1) au dosage des amines volatiles dans le poisson. A la suite de cette comparaison, nous avons étudié les applications de ces déterminations chez les Sélaciens et les Téléostéens marins.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Préparation des échantillons

Les échantillons utilisés dans cette étude sont des poissons entiers (E) ou en filets (F). Lorsqu'un essai nécessite la constitution d'un témoin, on procède de la façon suivante :

Pour un filet

Il est divisé en 4 parties selon ce principe :

Avant Arrière

X 1	X 2
Y 2	Y 1

échantillon témoin : X1 + Y1

échantillon à tester : X2 + Y2

Cette technique permet d'atténuer les différences des teneurs en ABVT résultant de l'endroit du prélèvement et donc d'obtenir 2 échantillons de teneurs voisines.

Pour un poisson entier

On prélève les deux filets qui vont servir d'échantillons. Deux cas peuvent se présenter :

- s'il s'agit d'un poisson de petite taille, un des filets constitue l'échantillon témoin et l'autre l'échantillon à tester.
- si la taille du poisson est suffisante, chaque filet constitue un échantillon qui sera divisé selon le principe ci-dessus.

Dosage de l'ABVT par la méthode d'entraînement à la vapeur

Pour obtenir un extrait de poisson exempt de protéines, on pèse 100 g de muscle de poisson auxquels on ajoute 200 ml de solution aqueuse d'acide trichloracétique à 7,5 p. cent. Après homogénéisation et centrifugation à 2 000 tours/minute pendant 5 minutes, on filtre sur Buchner avec filtre Whatman n°3, ou sur filtre n°2 sans Buchner.

L'entraînement à la vapeur est réalisé avec un appareil de distillation de type Kjeldahl (Vapodest 2 Gerhardt ou Buchi 321). On introduit 25 ml de filtrat dans le tube de distillation puis 6 ml d'hydroxyde de sodium à 10 p. cent (cette dernière opération est automatique avec le Vapodest 2 lors de la mise en route de l'appareil). On place sous l'extrémité du condenseur un béccher dans lequel ont été versés 10 ml de solution aqueuse d'acide borique à 4 p. cent contenant 0,04 ml d'un indicateur mixte

pour le titrage de l'ammoniaque (Merck 6130) constitué de rouge de méthyle et de vert de bromocrésol. On met en route la distillation et on prolonge l'entraînement à la vapeur jusqu'à ce que le béccher contienne exactement un volume final de 50 ml (40 ml de distillat). L'appareil sera rincé avant l'utilisation suivante.

La solution d'acide borique étant devenue verte sous l'effet de l'alcalinisation produite par l'ABVT recueilli, on place le béccher sous une microburette graduée à 0,01 ml (ou une burette automatique) contenant une solution aqueuse d'acide sulfurique 0,1 N, et on titre jusqu'à complète décoloration (la chute de burette doit être lue précisément à ce stade, l'addition ultérieure d'une goutte d'acide sulfurique entraînera alors l'apparition d'une légère coloration rose).

Soit n le nombre de ml de solution d'acide sulfurique utilisés, le taux d'ABVT est égal à $n \times 16,8$ mg d'azote pour 100 g de poisson.

Dosage de la TMA par la méthode d'entraînement à la vapeur

Aménagement du mode opératoire de la détermination de la teneur en ABVT : avant la distillation, on ajoute au filtrat 20 ml de formol (solution à 37 p. cent minimum) pour bloquer les amines primaires et secondaires (10).

Dosage de l'ABVT par la méthode de Conway

100 g de muscle de poisson sont homogénéisés dans 50 ml d'eau. Pour réaliser la défécation des protéines, on ajoute 50 ml de solution d'acide trichloracétique à 20 p. cent et on homogénéise à nouveau. Après centrifugation à 2000 tours/minute pendant 5 minutes, on filtre.

La microdiffusion est réalisée dans une cellule de Conway. On met dans la couronne 1,5 ml d'eau distillée et 1 ml de filtrat. On met au centre de la cellule 1 ml d'acide borique à 1 p. cent préparé comme suit : on dissout 10 g d'acide borique dans 200 ml d'alcool éthylique à 95 p. cent et 700 ml d'eau ; on ajoute 10 ml d'un mélange de vert de bromocrésol à 0,033 p. cent et de rouge de méthyle à 0,066 p. cent (16,5 mg de vert de bromocrésol et 33 mg de rouge de méthyle dans 50 ml d'alcool éthylique à 95 p. cent) ; on complète à 1 litre et on ajuste à pH 5.

On met rapidement dans la couronne 1 ml de solution saturée de carbonate de potassium à 112 p. cent et on place immédiatement le couvercle enduit de vaseline. Par un mouvement de rotation, on mélange soigneusement le contenu de la couronne. L'incubation se fait à 35°C $\pm$ 1°C pendant 2 heures, ou à la température du laboratoire pendant une nuit.

La solution d'acide borique devenue verte est neutralisée par de l'acide chlorhydrique 0,01 N en utilisant une microburette graduée à 0,01 ml. On titre jusqu'au retour à la couleur rose.

Soit n le nombre de ml d'acide chlorhydrique utilisés, le taux d'ABVT est égal à $n \times 27,67$ mg d'azote pour 100 g de poisson.

Dosage de la TMA par la méthode de Conway

Aménagement du mode opératoire : on met dans la couronne 1 ml de filtrat, 1 ml d'eau distillée et 0,5 ml de formol neutralisé.

Essais portant sur l'immersion Sans circulation d'eau

Elle consiste à immerger les filets dans un récipient contenant de l'eau déminéralisée ou de l'eau du réseau. L'immersion est pratiquée pendant 24 à 48 heures à + 2°C avec 1 ou 2 renouvellements ou sans renouvellement de cette eau. Les échantillons témoins (non immergés) sont conservés dans les mêmes conditions de température.

49 essais ont été réalisés sur des échantillons appartenant à 8 espèces de poissons.

Avec circulation d'eau

Les échantillons de poisson sont placés dans un récipient dans lequel on entretient une circulation d'eau. L'immersion est maintenue pendant des durées variant de 15 minutes à 2 heures 30.

26 essais ont été réalisés portant sur 5 espèces différentes.

Essais portant sur le conditionnement

Des dosages d'ABVT sont pratiqués par la méthode d'entraînement à la vapeur sur 2 moitiés d'un même filet conservé pendant 3 jours : une moitié est conservée sous glace fondante entourée d'une feuille de protection (conditions habituelles de commercialisation des filets qui ne doivent pas être en contact direct avec la glace), l'autre moitié est conditionnée au jour Jo par le procédé « Skin-Pack » constitué d'une barquette et d'un film composé de 7 couches très fortement adhérent à la denrée après mise sous vide. Cette barquette est conservée sous glace fondante dans les mêmes conditions de température que le filet témoin.

15 essais ont été réalisés.

RÉSULTATS ET COMMENTAIRES

Comparaison des résultats des 2 méthodes

Sur 261 échantillons de poissons divers, entiers ou en filets, ont été effectués des dosages d'ABVT à la fois par la méthode d'entraînement à la vapeur (valeurs y) et par la méthode de microdiffusion de Conway (valeurs x).

Résultats

Les résultats de ces déterminations effectuées dans les laboratoires de Rungis et de Boulogne-sur-Mer peuvent être obtenus auprès des auteurs.

— L'analyse des données a permis d'établir par la méthode des moindres carrés une droite de régression exprimant y en fonction de x :

$$y = 1,0167 x + 0,8508$$

Les paramètres statistiques des 2 séries de données sont les suivants :

- nombre de données pour chaque série : 261
- moyenne arithmétique des valeurs y : 21,16 mg/100 g
- moyenne arithmétique des valeurs x : 19,98 mg/100 g
- écart-type des valeurs y : 14,67 mg/100 g
- écart-type des valeurs x : 14,23 mg/100 g
- coefficient de corrélation de x et de y : 0,9865.

Selon la valeur de ce coefficient de corrélation et le degré de liberté du système (N=261), la probabilité pour que la liaison n'existe pas est très inférieure à 0,001. La valeur du coefficient de corrélation indique une intensité de liaison très forte entre les résultats des 2 méthodes.

Répétabilité des deux méthodes

Compte tenu de la difficulté à disposer d'un échantillon de volume suffisant pour effectuer des répétitions de dosages, la répétabilité a été évaluée sur une série d'échantillons ; chaque échantillon a fait l'objet de 2 dosages effectués par la même méthode sur le même filtrat (l'étape de pesée, broyage, centrifugation, filtration n'est donc pas testée mais on retrouve les mêmes sources de variabilité dans les 2 méthodes qui utilisent les mêmes étapes pour la préparation du filtrat).

La dépendance entre les 2 séries de dosages couplés est testée par le calcul du coefficient r et la consultation de la table des valeurs de r selon le degré de liberté du système.

Dosage de l'ABVT par la méthode d'entraînement à la vapeur

59 échantillons ont fait l'objet d'un dosage effectué en double. Le coefficient de corrélation obtenu est de 0,9978 et indique une liaison de forte intensité entre les 2 séries de résultats couplés.

Dosage de l'ABVT par la méthode de Conway

61 échantillons ont fait l'objet d'un dosage en double. Le coefficient de corrélation obtenu est de 0,9961 et indique une liaison de forte intensité entre les 2 séries de résultats couplés.

Incidence de divers paramètres sur la teneur en ABVT

Influence du volume de distillat recueilli sur les résultats de la méthode d'entraînement à la vapeur

Lorsque la distillation est prolongée au-delà des 50 ml préconisés, on observe des teneurs en ABVT plus élevées. C'est ainsi que 6 échantillons ont fait l'objet de distillations prolongées par paliers réguliers jusqu'à 100 ml. On constate pour ces 6 essais un taux d'augmentation moyen de 9,7 p. cent entre les valeurs d'ABVT contenues dans 50 ml de distillat et celles contenues dans 100 ml ; on note qu'un palier dans cette augmentation apparaît à 75 ml.

Le principe de la méthode de Conway est une simple diffusion à une température moyenne, par contre la méthode d'entraînement à la vapeur implique une température élevée. On peut penser que la déprotéinisation par l'acide trichloracétique laisse subsister des composés azotés de faible poids moléculaire, notamment des acides aminés et des

peptides de petite taille, susceptibles d'être hydrolysés à température élevée en libérant des amines volatiles. Le volume recueilli dans le bécher doit donc être fixé précisément à 50 ml (40 ml de distillat + 10 ml d'acide borique), afin que les résultats entre laboratoires soient comparables.

Immersion

Sans circulation d'eau

Les taux d'ABVT et de TMA ont été déterminés avant et après immersion sur 49 essais. Les résultats mettent en évidence une diminution importante des teneurs en amines volatiles à la suite de cette pratique.

Immersion sans renouvellement d'eau :

Pour les teneurs en ABVT, les moyennes des taux de diminution sont les suivantes :

- après une immersion de 24 heures : - 57,87 p. cent (24 essais)
- après une immersion de 48 heures : - 59,34 p. cent (9 essais)

Il apparaît donc que la simple immersion en eau « dormante » assure un lessivage du poisson et un entraînement des amines volatiles.

L'influence du paramètre immersion peut être étudiée sur la série de 24 échantillons ayant fait l'objet d'un dosage sur une partie témoin et sur une partie immergée pendant 24 heures sans renouvellement d'eau.

On compare les moyennes de ces 2 séries appariées de résultats (échantillon témoin - échantillon immergé) par le calcul de $t = m/s/\sqrt{n}$ où m est la moyenne des différences et s l'écart-type estimé sur l'échantillon des n différences. La valeur de t obtenue ($t = 7,75$) montre que les moyennes diffèrent significativement (risque inférieur à 0,001) et que l'immersion a donc une incidence sur le taux d'ABVT.

Immersion avec renouvellement d'eau :

Lorsque l'eau est renouvelée au cours de l'immersion, on peut noter les diminutions moyennes suivantes du taux d'ABVT :

- 24 heures avec renouvellement : - 66,65 p. cent (10 essais)
- 48 heures avec renouvellement : - 72,76 p. cent (6 essais)

La teneur en ABVT subit une chute plus importante lorsqu'il y a un renouvellement de l'eau ou lorsqu'on augmente la durée de l'immersion.

Pour la TMA, les expérimentations mettent en évidence des diminutions des teneurs suite à l'immersion. La TMA entre dans la composition de l'ABVT, il n'est donc pas surprenant que sa teneur régresse comme régresse probablement la teneur individuelle de chacune des amines volatiles.

Par contre, lorsqu'on compare les rapports $P = \text{TMA/ABVT}$ (pourcentage) avant et après immersion, on ne décèle ni augmentation ni diminution : la moyenne des valeurs de P sur 23 essais (pourcentage de TMA dans l'ABVT) est de 60,34 p. cent dans les échantillons témoins, et de 59,75 p. cent dans les échantillons traités. Ainsi, les valeurs de P ne subissent pas de modification significative suite à l'im-

mersion, ce qui laisse supposer que cette pratique affecte de la même façon les 2 termes du rapport. Ceci est un argument en faveur du dosage de la TMA : la TMA constitue un élément d'appréciation complémentaire de l'ABVT, et de plus $P = \text{TMA/ABVT}$ (pourcentage) est relativement indépendant de nombreux facteurs de variation de la composition chimique.

Avec circulation d'eau

L'immersion avec circulation d'eau a été testée sur 26 essais. Les résultats confirment le phénomène observé lors d'une immersion simple, il apparaît toutefois que l'entraînement des bases aminées volatiles est accéléré. On note une variabilité importante des diminutions observées pour une même durée d'immersion, variabilité due à des facteurs divers dont les différences de taille et d'épaisseur des échantillons (5 espèces différentes ont été testées), éventuellement la vitesse d'écoulement ou la température de l'eau. Ces premiers résultats seraient à affiner en étudiant l'influence de ces différents paramètres. Toutefois, les diminutions moyennes correspondant à des durées de lavage croissantes permettent d'appréhender l'incidence de cette pratique :

— 30 minutes :	15,13 p. cent
— 1 heure :	23,62 p. cent
— 1 heure 30 minutes :	27,54 p. cent
— 2 heures :	30,88 p. cent

Conditionnement sous film

Les variations des teneurs en ABVT d'un même échantillon conservé sous glace fondante, d'une part de manière traditionnelle, non préemballé, d'autre part sous conditionnement étanche sous-vide de type Skin-Pack ont été testées sur 15 échantillons.

L'analyse comparative est effectuée à $J+3$ par la méthode d'entraînement à la vapeur.

m_1 (moyenne des échantillons non préemballés) = 20,76
 m_2 (moyenne des échantillons conditionnés) = 34,85.

Les moyennes des 2 séries appariées sont comparées par le calcul de $t = m/s/\sqrt{n}$ où m et s désignent la moyenne et l'écart-type estimés sur l'échantillon des n différences. La valeur de t ($t = 9,03$) indique que ces deux moyennes sont significativement différentes (p inférieur à 0,001) et que le mode de conditionnement est un des paramètres qui influe sur la teneur en ABVT.

Ces premiers résultats, concernant un nombre restreint d'essais, devront être complétés et prendre en compte certains paramètres, notamment la nature du film et l'atmosphère du conditionnement. Il est toutefois apparent qu'un résultat d'ABVT doit être interprété différemment s'il concerne un poisson conditionné ; il est vraisemblable que le poisson conservé traditionnellement sous glace subit une sorte de « lessivage » par l'eau de fusion de la glace qui entraîne ainsi une partie des amines et de l'ammoniac ; ce phénomène est empêché lors d'un conditionnement sous film. A cette hypothèse d'origine « mécanique » pourrait éventuellement s'ajou-

ter celle des modifications de flore et d'enzymes microbiennes lors du conditionnement sous vide ou sous atmosphère contrôlée.

DISCUSSION

Les 2 méthodes qui font l'objet de cette étude ont résisté à l'épreuve du temps : cette remarque n'est pas un argument scientifique mais indique l'intérêt que ces méthodes suscitent encore aujourd'hui et les services qu'elles peuvent rendre, même s'il est raisonnable de penser qu'elles seront prochainement détrônées par des techniques plus fines et plus fiables. Pour permettre d'utiliser ces méthodes dans des conditions optimales, il est nécessaire de normaliser la détermination, l'expression et l'exploitation des teneurs en ABVT. Ces travaux constituent une étape dans ce sens.

Expression des résultats

Le premier élément de normalisation proposé concerne l'expression des résultats. L'ABVT étant un ensemble de composés chimiques, divers modes d'expression sont possibles. Un usage s'est établi pour la méthode d'entraînement à la vapeur qui consiste à exprimer le résultat en ammoniac puisque celui-ci est un composé quantitativement essentiel. Dans la méthode de Conway, le résultat est exprimé en azote. Très souvent les résultats sont donnés sans mention ni de la méthode ni du mode d'expression, or ceci est important pour l'exploitation des teneurs obtenues et peut fausser en partie la conclusion. Il est donc souhaitable d'opter pour un mode d'expression commun, et l'azote constitue le choix le plus rationnel dans la mesure où il entre dans la composition de l'ammoniac et des diverses molécules d'amines.

Dans cette étude, les résultats fournis par les 2 méthodes sont exprimés en azote.

La formule de calcul pour la méthode de Conway est :

$ABVT = n \times 27,67 \text{ mg d'azote}/100 \text{ g}$ (où n = nombre de ml HCl 0,01 N)

La formule de calcul utilisée pour la méthode d'entraînement à la vapeur est :

$ABVT = n \times 16,80 \text{ mg d'azote}/100 \text{ g}$ (où n = nombre de ml H_2SO_4 0,1 N).

Ce mode d'expression commun présente un autre avantage. Nous évoquerons plus loin l'intérêt du dosage de la triméthylamine ; or pour établir le rapport TMA/ABVT, il est indispensable d'exprimer de la même façon TMA et ABVT.

Comparaison critique des 2 méthodes

Des éléments de comparaison sont présentés sous la forme d'une liste d'avantages et d'inconvénients :

Avantages

Méthode par entraînement à la vapeur

- facilité de mise en œuvre, rapidité d'exécution, peu de facteurs d'erreurs
- permet de déterminer des taux d'ABVT très élevés sans dilution du filtrat

Méthode de Conway

- investissement faible
- utilisation de petits volumes de réactifs

Inconvénients

Méthode par entraînement à la vapeur

- investissement relativement important
- utilisation de volumes importants de réactifs

Méthode de Conway

- nécessité d'un opérateur minutieux rodé à cette technique
- incubation relativement longue (opération totale supérieure à 2 heures)
- nombreuses causes possibles d'erreurs dues au fait qu'il s'agit d'une microméthode (mauvais rinçage des cellules, erreurs sur la délivrance de faibles volumes de réactif, influence de l'environnement qui doit être exempt d'ammoniac, débordements d'une chambre dans l'autre)
- nécessité lorsque le taux d'ABVT est très élevé de pratiquer de nouveaux dosages à une dilution plus élevée (capacité limitée de la chambre centrale de dosage contenant l'acide borique)
- nécessité d'un doublage systématique

Cette comparaison fait apparaître plus d'avantages pour la méthode d'entraînement à la vapeur et met en évidence quelques points délicats dans la pratique de la méthode de Conway ; toutefois cela ne doit pas conduire à des conclusions hâtives, car cette dernière se révèle fiable si un opérateur méticuleux est initié à la technique, et elle peut convenir parfaitement si un délai de 2 h 30 est acceptable pour fournir le résultat.

Le coût de revient de l'analyse est à envisager en distinguant la part de l'investissement et la part du fonctionnement.

Pour l'investissement, il convient de prendre en compte les investissements spécifiques hors les appareils courants de laboratoire nécessaires aux deux méthodes. La méthode d'entraînement à la vapeur nécessite un appareil de distillation. La méthode de Conway implique l'achat de cellules de microdiffusion en nombre suffisant pour effectuer une rotation, ce qui correspond à un investissement plus léger que celui de la méthode d'entraînement à la vapeur.

En frais de fonctionnement, la méthode de Conway présente également un léger avantage, compte tenu de l'utilisation de petits volumes de carbonate de K et d'acide borique ; par contre la préparation de l'extrait déprotéiné est équivalente dans les 2 méthodes.

Au total, le coût de revient de l'analyse semble inférieur dans la méthode de Conway. Toutefois, si on s'efforce de considérer tous les paramètres (temps passé au nettoyage des cellules, indisponibilité d'une étuve, consommation de vaseline, de détergent, coût de la main d'œuvre plus élevé...), la valeur de cette affirmation semble tout à fait relative. Le coût respectif des 2 méthodes doit être calculé dans le contexte particulier de chaque laboratoire et de son équipement.

Correspondance entre les résultats des 2 méthodes

Cette correspondance a été étudiée en exprimant les teneurs d'ABVT en mg d'azote pour 100 g.

D'autre part, il est important de rappeler 2 points essentiels dans le mode opératoire de la méthode d'entraînement à la vapeur. Les expérimentations ont démontré que la distillation doit être stoppée précisément dès que le volume recueilli dans le bécher (acide borique + distillat) atteint 50 ml. Lors du dosage, l'addition d'acide sulfurique ne doit pas être poursuivie au-delà de la décoloration complète du contenu du bécher, la coloration rose ne devant pas être atteinte. Il est apparu que ces 2 impératifs n'étaient pas scrupuleusement respectés dans tous les laboratoires et que cela pouvait introduire des distorsions dans les résultats.

La droite de régression obtenue fait apparaître des valeurs légèrement supérieures pour la méthode d'entraînement à la vapeur (y) par rapport à la méthode de Conway (x) :

$$y = 1,02 x + 0,85$$

Les valeurs obtenues par les 2 méthodes sont très voisines (5). Il existe toutefois une différence qui pourrait s'expliquer par un des éléments suivants ou par la conjonction des 2 : soit la méthode de Conway donne un résultat par défaut, cela pouvant être dû à une libération d'amines hors de la cellule lors de l'introduction du K₂ CO₃, ou à un minime pourcentage d'amines non piégées par l'acide borique puisque le principe repose sur la seule microdiffusion, soit la méthode d'entraînement à la vapeur détermine un taux par excès, cela pouvant être dû, comme nous l'avons déjà évoqué, à une dégradation de composés azotés persistant après déprotonisation.

En tout état de cause, la corrélation entre les résultats des 2 méthodes est excellente, les différences sont faibles et peuvent être maîtrisées en se référant à la droite de régression.

Interprétation des résultats

Les expérimentations démontrant l'incidence de l'immersion et du conditionnement sur la teneur en ABVT constituent le préalable nécessaire à toute proposition de normes. Les causes multiples de variabilité des taux d'ABVT de poissons à niveau d'altération égal (12) rendent délicate la définition de normes au sens strict du terme. Il est à noter que la composition de la flore de contamination, l'espèce du poisson, le cycle sexuel, la nourriture, le mode de pêche, les conditions de conservation, la localisation du prélèvement, sont autant de facteurs qui peuvent affecter la teneur en bases azotées volatiles et introduire une distorsion entre le taux d'ABVT et le niveau réel d'altération.

Rappelons que l'ABVT résulte de l'addition de divers composés basiques volatils, et que des taux d'ABVT identiques peuvent recouvrir des teneurs individuelles différentes pour chacun des composants. Des valeurs d'ABVT égales peuvent donc exprimer des réalités biochimiques et microbiologiques sensiblement différentes.

Ces réserves étant faites, il est possible de définir des valeurs de référence en distinguant la démarche de l'inspection officielle et la démarche contractuelle. Dans les deux cas, il s'agit de fixer un niveau de décision au-delà duquel un refus de la marchandise est prononcé. Dans le cas de normes réglementaires, la décision administrative est prise en dehors de toute convention particulière et n'a pas d'alternative : refoulement en frontière ou saisie. Différents paramètres étant susceptibles de modifier ou d'influencer les résultats d'ABVT obtenus, le risque d'une décision erronée doit être évité. Par contre, s'agissant de valeurs de référence commerciales, les teneurs peuvent être fixées plus basses dans la mesure où elles sont le résultat d'un accord contractuel entre l'acheteur et le vendeur. Ces raisons expliquent le léger décalage entre les valeurs d'ABVT proposées pour les décisions d'inspection officielle et celles applicables à des contrats commerciaux. La valeur d'ABVT généralement admise comme limite par divers auteurs (8, 18, 16) se situe aux alentours de 30 mg N/100 g dans le muscle de poisson blanc conservé sous glace. Les valeurs proposées pour l'inspection officielle et la démarche contractuelle figurent dans le tableau I.

Proposition d'un critère complémentaire

La TMA ne constitue pas l'objet de cet article, mais dans des cas litigieux, nous proposons d'utiliser la teneur en TMA pour affiner l'exploitation de la teneur en ABVT.

Il est totalement déconseillé d'interpréter seules les teneurs en TMA. Généralement la qualité est satisfaisante en dessous de 6 mg/100 g, elle est moyenne entre 6 et 14, au-delà le produit est en voie d'altération. Mais c'est par les informations qu'il fournit sur la composition de l'ABVT que le dosage de la TMA est précieux, et c'est dans ce sens qu'il doit être exploité. Le pourcentage de TMA dans l'ABVT : $P = \text{TMA/ABVT}$ (pourcentage) est ainsi un critère complémentaire de l'ABVT (11). A titre indicatif, les valeurs suivantes sont proposées pour l'inspection :

P = 40-45 p. cent : voie d'altération

P = 55-60 p. cent : putréfaction

CONCLUSION

Les méthodes de microdiffusion et d'entraînement à la vapeur restent aujourd'hui largement employées pour le dosage de l'ABVT parce qu'elles sont rapides et économiques. Des techniques plus fiables et plus sélectives prendront le relais dans un proche avenir, mais il n'est pas certain qu'elles puissent un jour donner une réponse aussi rapide avec un coût de revient aussi faible. Les méthodes anciennes ont donc encore un certain avenir et elles ne sont aucunement à négliger si elles peuvent continuer à asseoir quotidiennement des décisions tant en inspection qu'en industrie.

L'avantage des nouvelles techniques sera de permettre une approche de la composition intrinsèque de l'ABVT. Actuellement, il est toutefois pos-

TABEAU I - Proposition de valeurs de référence chez les poissons frais ou congelés (produits transformés exclus) pour l'ABVT déterminé par la méthode d'entraînement à la vapeur (en mg d'azote/100 g).

Téléostéens marins (excepté les Thonidés)

Démarche d'inspection officielle.

Proposition de normes	Cas général	Exceptions : — certains g adidés (comme le lieu noir) — certains poissons gras (comme le maquereau)
Bonne qualité	< 15	< 20
Qualité commerciale courante	15 à 28	20 à 33
Qualité médiocre — marché de gros : non satisfaisant — vente au détail : Acceptable si l'examen des critères complémentaires — notamment les organoleptiques — est favorable.	28 à 35	33 à 40
Altération confirmée	> 35	> 40

Démarche contractuelle.

Classification commerciale	Cas général	Exceptions : cf. tableau précédent
Extra	< 12	
Qualité A : début	12 à 16	Les chiffres ci-
Qualité A : fin	16 à 20	contre peuvent
Qualité B : début	20 à 24	être majorés de
Qualité B : fin	24 à 28	3 à 4 mg pour ces espèces
Non commercialisable	> 28	> 33

Sélaciens

Le poisson est considéré non commercialisable au-delà de 50 mg/100 g (démarche contractuelle) et en état d'altération confirmée (inspection officielle) au-delà de 65 mg/100 g.

Remarques

- L'ABVT a peu de signification chez les Thonidés.
- L'interprétation des taux d'ABVT est délicate chez les poissons gras en général, particulièrement chez les Saumons.
- Les valeurs proposées ne concernent pas les produits cuits ni les produits ayant subi une transformation (salaison, fumaison, pasteurisation, stérilisation).
- Les valeurs ne concernent pas les produits préemballés.
- Compte tenu des causes de variabilité de l'ABVT, il est souhaitable de faire en parallèle un test organoleptique, et d'exploiter le taux de triméthylamine.

sible d'optimiser l'usage de ce critère si les modes opératoires des méthodes de microdiffusion et d'entraînement à la vapeur sont scrupuleusement respectés, si on évite les confusions introduites par le choix de la méthode ou le mode d'expression du résultat, et si le cas échéant on considère la proportion de TMA.

Ce critère, exprimé sous la forme $P = \text{TMA/ABVT}$ (pourcentage) n'est pas proposé pour remplacer

l'ABVT : ABVT et P constituent 2 critères complémentaires.

Il est à noter que les critères chimiques ne constituent qu'un élément d'appréciation et que d'autres éléments gardent toute leur importance, notamment les tests organoleptiques. De plus, compte tenu des paramètres de variabilité évoqués pour les résultats des dosages ABVT et des manipulations subies par certaines denrées (filetage), il semble indispensable d'effectuer parallèlement une analyse bactériologique qui permettra une appréciation plus complète de la qualité de la denrée.

Enfin, l'échantillonnage reste déterminant : cette remarque est particulièrement importante dans un domaine où l'interprétation n'est pas simple et doit donc s'établir sur des valeurs statistiquement représentatives.

Remerciements

Les auteurs remercient vivement les Docteurs D. Simonin et H. Belveze (Direction Générale de l'Alimentation) ainsi que le Docteur J. Gledel (Laboratoire Central d'Hygiène Alimentaire) pour leurs conseils. Leur reconnaissance s'adresse également au personnel technique de leurs laboratoires, ainsi qu'à R. Sanzhi-Bokally, S.H. Tao et M. Poumeyrol (L.C.H.A.), M. Morel (IFREMER) et P. Bécel. Ils remercient les Sociétés Adhoc et Nutrimer qui ont permis d'effectuer les essais de conditionnement dans leurs installations.

Bibliographie

- (1) BEATTY (S.A.) et GIBBONS (N.E.) - The measurement of spoilage in fish. *J. Biol. Bd. Can.*, 1937, 3, 77-91.
- (2) BILLON (J.), OLLIEUX (N.) et TAO (S.H.) - Etude d'une nouvelle méthode de dosage de l'azote basique volatil total pour l'évaluation qualitative des produits de la pêche. *R.T.V.A.*, 1979, 149, 13-17.
- (3) BURT (J.R.) - Hypoxanthine : a biochemical index of fish quality. *Process. Biochem.*, 1977, 12, (1), 32-35.
- (4) CONWAY (E.J.) - *Microdiffusion analyses and volumetric error*. 5th ed. Crosby Lockwood and Son, London, 1962.
- (5) DAVIDOVICH (L.A.) et GIANNINI (D.H.) - Correlation between total volatile bases contents in fish determined by the distillation and the microdiffusion methods. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 1984, 17, 287-289.
- (6) FARBER (L.) - *Freshness tests. Fish as food*. Vol. IV. Processing Part. 2. 65-126. Borgstrom (G) ed. 1965.
- (7) JAHNS (F.D.) - A rapid visual enzymes test to assess fish freshness. *Food Technol.*, 1976, 30, (7), 27-30.
- (8) LUCKE (F.) et GEIDEL (W.) - Bestimmung des flüchtigen basischen Stickstoffs in Fischen als Masstab für ihren Frischezustand. *Z. untersuch. Lebensm.*, 1935, 70, 441-458. Rapporté par Farber 1965.
- (9) MALLE (P.), NOWOGROCKI (G.) et TAILLIEZ (R.) - Relationship between deterioration index and rates of total volatile basic nitrogen for marine fish. *Science des aliments*, 1983, 3, (2), 311-322.
- (10) MALLE (P.) et TAO (S.H.) - Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation. *J. Food Prot.*, 1987, 50, 756-760.
- (11) MALLE (P.) et POUMEYROL (M.) - A new chemical criterion for the quality control of fish : trimethylamine / total volatile basic nitrogen (p. cent). *J. Food Prot.*, 1988, Article accepté pour publication.
- (12) MENDES (M.H.M.) et LAJOLO (F.M.) - Evolução das bases volatéis totais e da Trimetilamima em pescados e o seu uso como indicador de qualidade. *Rev. Farm. Bioquim Univ.*, 1975, 13, (2), 303-322.
- (13) MIETZ (J.L.) et KARMAS (E.) - Polyamine and histamine content of rockfish, lobster, and shrimp as an indicator of decomposition. *J.A.O.A.C.*, 1978, 61, 139-145.
- (14) NERISSON (P.) - L'histamine comme indicateur d'altération. *Rev. Trav. Inst. pêches marit.*, 1976, 39, (4), 471-482.
- (15) SAINCLIVIER (M.) - L'industrie alimentaire halieutique. Le poisson matière première. Les causes d'altération du poisson et l'évaluation de l'état de fraîcheur. *Bull. Soc. Techn. E.N.S. Agro. Rennes*, 1983, (1), 167-259.
- (16) SOUDAN (F.), ANQUEZ (M.) et BENEZIT (A.) - *Conservation par le froid des poissons, crustacés et mollusques*. Baillière et Fils, Paris, 1965.
- (17) SPINELLI (J.) - Biochemical basis of fish freshness. *Process. Biochem.*, 1971, 6, (5), 3-6.
- (18) TANIKAWA (E.) - Studies on measuring freshness of fish and shellfish meat. *J. Soc. Ind. Fisheries.*, 1935, 3, 267-296.
- (19) VAN SPREEKENS (K.J.A.) - Characterization of some fish and shrimp spoiling bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 1977, 43, 283-303.
- (20) WATSON (D.W.) - Studies of fish spoilage. The bacterial reduction of trimethylamine oxyde. *J. Fish Res. Bd. Can.*, 1939, 4, 252-266.

Total volatile basic nitrogen rates in salt water fish muscle
Data for standardisation
of the determination, expression
and use of T.V.B.N.

by P. MALLE, A.M. VANELLE and A. PETIT

Contenido en nitrogeno basico volatil
Total (N.B.V.T.) del tejido muscular
de los peces marinos
Elementos para una normalizacion
de la determinacion, la expresion
y la explotacion del N.B.V.T.

por P. MALLE, A.M. VANELLE y A. PETIT

SUMMARY

The comparison between the results of the two widely used methods for the determination of Total Volatile Basic Nitrogen allowed us to define the straight line equation correlating the values obtained by distillation in function of the values of microdiffusion.

The respective advantages of the two methods are compared. After studying the effects of some parameters on the T.V.B.N. rates, the authors propose a common expression of the results in nitrogen and an approach for interpretation taking into account of the variability factors.

Standard values are specified for chilled or frozen salt water fish with complementary factors for optimal use of these values.

Key words : Total volatile basic nitrogen - Salt water fish - Alteration - Chemical values.

RESUMEN

La comparacion de los resultados de los dos metodos mas extensamente utilizados para determinar las tasas de Nitrogeno Basico Volatil Total ha permitido la definicion de la linea de regresion que expresa los valores obtenidos por arrastre al vapor en funcion de los valores obtenidos por microdifusion.

Las ventajas respectivas de ambos metodos han sido comparadas.

Despues de haber establecido la incidencia de ciertos parametros sobre los contenidos en N.B.V.T., hemos propuesto un modo de expresion comun de los resultados en nitrogeno, y un modo de gestion para la interpretacion que tiene en cuenta ciertos factores de variabilidad. Unos valores de referencia son indicados para los peces marinos refrigerados o congelados con unos elementos complementarios de explotacion de estos criterios.

Palabras claves : Nitrogeno basico volatil - Peces marinos - Alteracion - Quimicos cirterios.

Reprinted from

Journal of Food Protection, Vol. 52, No. 6, Pages 419-423 (June 1989)

Copyright© International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians

A New Chemical Criterion for the Quality Control of Fish: Trimethylamine/Total Volatile Basic Nitrogen (%)

PIERRE MALLE^{*1} and MARTINE POUMEYROL²

Ministère de l'Agriculture, et de la Forêt Direction Générale de l'Alimentation, Laboratoire des Services Vétérinaires, Rue Huret Lagache, 62200 Boulogne-sur-mer (France) and CNEVA, Laboratoire Central d'Hygiène Alimentaire, 43, rue de Dantzig, 75015 Paris (France)

(Received for publication August 25, 1988)

ABSTRACT

Trimethylamine (TMA) and the total volatile basic nitrogen (TVBN) were determined in 169 samples of sea-fish (herring, cod, whiting, and mackerel) at all stages of decomposition. The comparison of these two parameters with the ratio $P = \text{TVBN/TMA} (\%)$ showed that P provides a useful index of freshness. It is relatively constant between species, its dispersion is less than that of TMA and it increases more rapidly than TVBN at the start of decomposition. Statistical analysis of the experimental results showed that there is a non-linear correlation between P and the decomposition index (i). The comparison of the line-equations defining $\log P$ as a function of i for different species of marine Teleostei led us to show that there is little or no intraspace variation of this correlation under determined conservation conditions. It is noted that for a given species, this correlation is temperature-dependant. Statistical exploitation of these results permit us to determine the maximal admissible values for P which can be used as a support for the development of new standards.

Although a detailed organoleptic inspection is usually sufficient to determine the freshness of intact refrigerated fish, for sliced, frozen, and processed fish, or in the case of a dispute, laboratory examinations are indispensable and must rapidly provide objective data for the assessment of quality. Fish decomposition is mainly due to bacterial growth which results in the production of various substances, some of which are not normally found in live muscle tissue, while others, which are already present in the muscle, increase logarithmically in parallel with microbial growth (20). The assay of some of these substances may provide useful data for the evaluation of fish freshness. The determination of total volatile basic nitrogen (TVBN) first proposed by Boury (4,5) in 1935, is widely used today to estimate the degree of decomposition of fish. The efficiency of TVBN assay has been confirmed by several authors (8,9,11,23,27), although it does not fully satisfy sanitarians. In a previous paper (18) we showed that there may be a wide dispersion of TVBN levels for a given decomposition index, and that changes in

TVBN were slow at the onset of decomposition. TVBN levels, although they are a useful parameter, are therefore subject to certain valid criticisms.

Other chemical determinations have also been tested as decomposition criteria, though they all have disadvantages. Some of these tests, such as the hypoxanthine test, do not give consistent results (6,14,31). Others are only significant when the product is spoiled and inedible, such as H_2S , indol, volatile acids (24), and histamine (22). Another example is the so-called K ratio (inosine + hypoxanthine/total ATP breakdown products) which increases in the first stage of decomposition and then rapidly tends towards a plateau (10,21,25). Many other initially promising tests were later found to give ambiguous results; trimethylamine (TMA) assay provides a good example. The TMA content provides an accurate indication of bacterial spoilage in some species (1,2,17) though it is not always reliable as certain other factors modify the TMA production.

During this study we investigated the changes in the levels of TVBN and TMA during fish decomposition. Although neither TVBN or TMA are sufficient when taken alone and are often difficult to interpret, we examined the possibility of using them simultaneously to evaluate the degree of freshness by studying the correlation between the ratio $P = \text{TMA/TVBN} (\%)$ and the level of decomposition.

MATERIALS AND METHODS

Species studied

The degree of freshness and the TMA and TVBN levels were evaluated in four common fish species: *Clupea harengus* (herring), *Gadus morrhua* (cod), *Merlangius merlangus* (whiting), and *Scomber scombrus* (mackerel).

The fishes were stored either at 0°C on an ice bath or in the refrigerator at a temperature of 7°C $\pm$ 1°C.

Determination of the decomposition index

The decomposition index ("i") was calculated by using the numerical organoleptic method of Soudan et al. (29) with a rating scale based on an external examination of the skin, eyes, gills, and tissue softness and an internal examination of the peritoneum and vertebral column. The state of perfect freshness is considered to be 1 and any fish with an index of more than 3 is considered to be

¹Laboratoire des Services Vétérinaires.

²Laboratoire Central d'Hygiène Alimentaire.

inedible for man (grade C). Three other grades are fixed for "i" values between 1 and 3 ("Extra" for $i \leq 1.3$; A: $1.3 < i \leq 2$; B: $2 < i \leq 3$).

The degree of freshness as defined by EEC regulations n°s 2455/70 and 103/76 is determined using the same method. The degree of freshness (d) is rapidly calculated from the decomposition index with the equation $d=4-i$. Four classes are defined as follows: extra: $d \geq 2.7$; A: $2 \leq d < 2.7$; B: $1 \leq d < 2$; C: $d < 1$.

TVBN assay by steam distillation

This method proposed by the Codex Alimentarius Committee in 1968 was tested for the qualitative evaluation of seafood by Billon et al. (3). Briefly, 200 ml of a 7.5% aqueous trichloroacetic acid solution was added to 100 g of fish muscle; after homogenization, the mixture was centrifuged at 400 g for 5 min and then filtered through a Buchner funnel using a Whatman n°3 filter paper.

Steam entrainment was performed using a Kjeldahl-type distillator: (Vapodest 2 Gerhardt or Buchi 320). 25 ml of filtrate were loaded into the distillation tube followed by 6 ml of 10% NaOH (the final operation is automatic on starting the Vapodest 2). A beaker containing 10 ml of 4% boric acid and 0.04 ml of methyl red and bromocresol green indicator was placed under the condenser for the titration of ammonia (ref: Merck 6130).

Distillation was started and steam entrainment continued until a final volume of 50 ml was obtained in the beaker (40 ml of distillate). The boric acid solution turned green when alkalinized by the distilled TVBN which was titrated with aqueous 0.1 N sulphuric acid solution using a 0.01 ml graduated microburette. Complete neutralization was obtained when the color turned pink on the addition of a further drop of sulphuric acid.

If n is the number of ml of sulphuric acid added, the TVBN content is $nx \ 16.8$ mg of nitrogen per 100 g of fish.

TMA assay

To assay TMA using this method, 20 ml of formaldehyde was added to the distillation tube to block the primary and secondary amines (19).

RESULTS AND DISCUSSION

Study of 3 fish species stored at 6-8°C

The decomposition index was measured for samples of cod, whiting, and mackerel (stored at $7 \pm 1^\circ\text{C}$) in duplicate by two different technicians, and the arithmetic mean of the results for each sample was retained. Between 30 and 40 samples of each species were tested (total = 102), and the duration of storage was determined in order to give at least one sample for every 0.1 increment of the decomposition index from 1.3 to 3.6. The TMA and TVBN were determined in each sample and the results are given in Fig 1 and 2 for cod and mackerel, and in Fig 3 for whiting. The decomposition index is plotted on the X-axis and the amine levels on the Y-axis. P is defined as the percentage TMA in the TVBN [$P = \text{TMA}/\text{TVBN} (\%)$]. The P values for cod and mackerel are shown in Fig 4.

Comparison of the changes in the 3 criteria (TVBN, TMA, P)

The shape of the scatter diagrams of TVBN (Fig. 1) and TMA (Fig. 2) for cod and mackerel shows that the amine levels are different in the two species at a given stage of decomposition. This further confirms the well-known fact

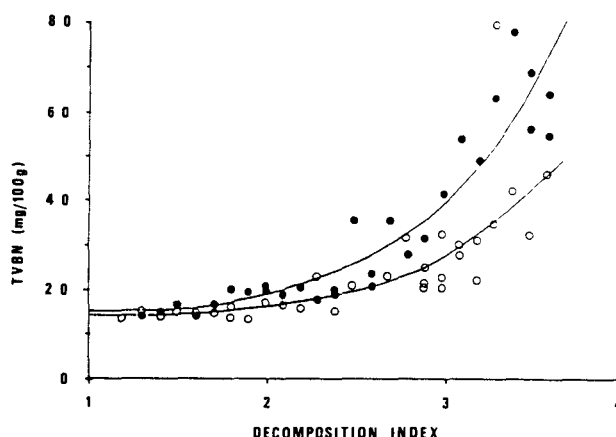


Figure 1. Correlation between the decomposition index and TVBN levels for cod (○) and mackerel (●) samples stored at 6-8°C.

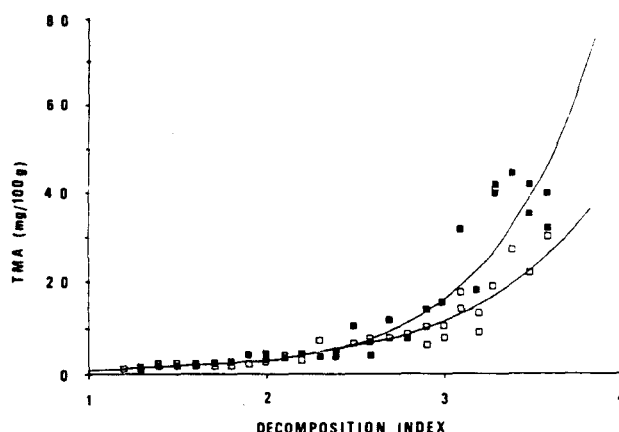


Figure 2. Correlation between the decomposition index and TMA levels for cod (□) and mackerel (■) samples stored at 6-8°C.

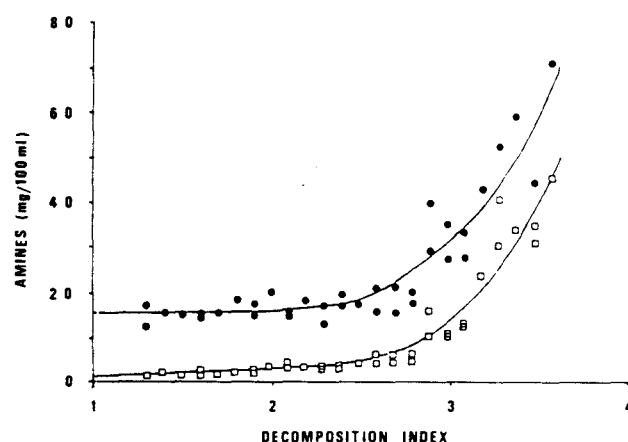


Figure 3. Correlation between the decomposition index and TMA (□) or TVBN (●) levels for whiting samples stored at 6-8°C.

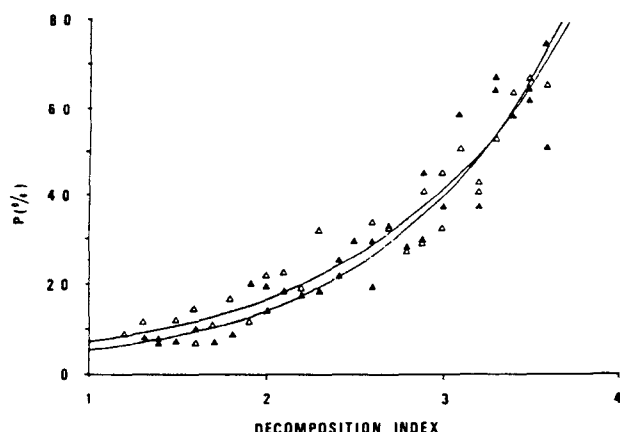


Figure 4. Correlation between the decomposition index and P ($TMA/TVBN \times 100$) for cod (Δ) and mackerel ($\blacktriangle$) samples stored at 6-8 °C.

that the variability of the TVBN and TMA contents is due to different species-related factors such as the microbial flora, the conditions of capture, and storage (7,12,18,30,32,33). On the contrary, however, the P values determined on the same samples, and given in Fig 4, are nearly superposable and only slightly dependant on species. This argues in favor of the use of P rather than the two other parameters as a criterion of freshness.

The curves in Fig 1, 2, 3, and 4 have different shapes depending on the criterion studied. The increase in TVBN is not very significant at the start of decomposition when a plateau is observed (18). This plateau is not observed either for the TMA levels which increase rapidly at the onset of decomposition, or for P . The two major components of TVBN are ammonia and TMA, and it is the ammonia that predominates in fresh fish where it may be reutilized in certain synthetic reactions and modify the TVBN levels (26). TVBN does not therefore provide an accurate indication of fish decomposition at the start of storage. This is not true for P as this criterion takes into account the TMA levels. We therefore recommend TMA and P rather than TVBN as criteria of fish quality.

Comparison of the coefficient of variation of the 3 criteria

Table 1 gives the coefficient of variation of the values for each criterion for the 3 fish species studied.

The coefficients of variation (standard deviation/mean) for TVBN (0.5625) and P (0.6063) were similar, whereas much higher values were obtained for TMA (1.1066). Because of this considerable dispersion of the TMA levels, very little interest has been shown in this parameter in the past, though certain authors consider that the TMA content may reflect the bacterial spoilage in some fish species (1). There are several reasons for this variability in the TMA production. It depends on the nature of the bacterial flora of the fish and, in particular, on the presence of TMA producing organisms such as *Pseudomonas putrefaciens* (15,16) and also on the conditions of development of this flora. On the other hand, the muscle TMA oxide content (TMAO) varies with

TABLE 1. Variation coefficients (standard deviation/mean) of each criterion (TVBN, TMA and P) for 3 species of fish stored at 6-8 °C.

Species	TVBN	TMA	P
Cod	0.5439	1.0637	0.5909
Whiting	0.5704	1.2038	0.5806
Mackerel	0.5734	1.0523	0.6476
Mean	0.5625	1.1066	0.6063

the species and the reduction of TMAO to TMA is not uniform in the same fish (24). The TMA content is therefore not an accurate criterion of quality. Of the two criteria retained here, TMA and P , we chose P because of its lower dispersion, evaluated from the coefficient of variation.

Study of log P

Expression of P

102 values of P were obtained with the 3 species studied. We established the following empirical regression line in which P is expressed as a function of the decomposition index (i), by computer data analysis and the use of the least-squares test:

$$P = 25.1706 i - 31.9081$$

with a correlation coefficient of 0.9229

The configuration of the scatter diagram of the values of P (Fig. 4) encouraged us to look for an exponential expression, and using the above method we obtained a line expressing log P as a function of the decomposition index:

$$\log P = 0.4132 i + 0.3719$$

with a correlation coefficient of 0.9469

On Fig. 5, this line cuts the scatter diagram of log P values. The comparison of the correlation coefficients led us to choose log P rather than P for the rest of this study.

Influence of species

Figure 6 presents a plot of the log P values as a function of the decomposition index for the three species stored at 6-

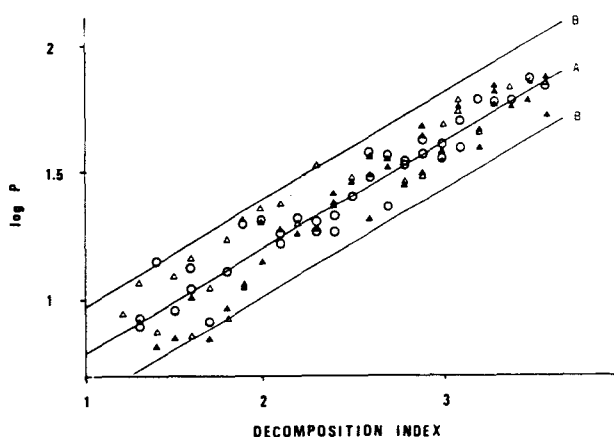


Figure 5. Correlation between the decomposition index and log P for cod (Δ), mackerel ($\blacktriangle$), and whiting ($\circ$) stored at 6-8 °C (line A). Determination of the 95% confidence interval limits (lines B).

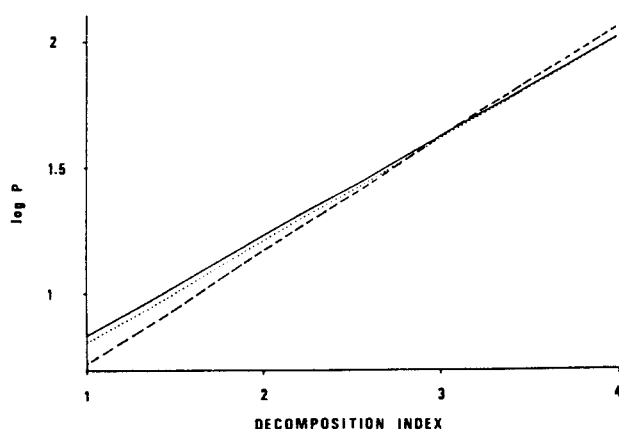


Figure 6. Correlation between the decomposition index and $\log P$ for cod (—), whiting (··· ···), and mackerel (---) stored at 6-8°C.

8°C. The following equations were obtained for the straight lines:

$$\begin{aligned}\text{Cod } \log P &= 0.3942 i + 0.4309 \\ \text{Whiting } \log P &= 0.4002 i + 0.4032 \\ \text{Mackerel } \log P &= 0.4433 i + 0.2746\end{aligned}$$

These three lines are more or less superposable showing that $\log P$ does not vary widely in the three marine teleostean species studied here.

Effect of storage temperature

The decomposition index, TVBN and TMA were determined for 67 samples of herring and mackerel stored on ice (0°C) by the same method as above and $\log P$ was plotted versus the decomposition index. The following equations were obtained for the straight lines:

$$\begin{aligned}\text{Herring } \log P &= 0.3764 i + 0.2975 \\ \text{Mackerel } \log P &= 0.3526 i + 0.3673\end{aligned}$$

These lines are shown on Fig. 7. In this case as well, $\log P$ is independent of the species studied. On the other hand, the comparison of the slope of the straight lines obtained for samples stored at 0°C with that of the lines obtained for samples stored at 6-8°C (Fig. 8) clearly shows that the storage temperature has an effect on the proposed criterion.

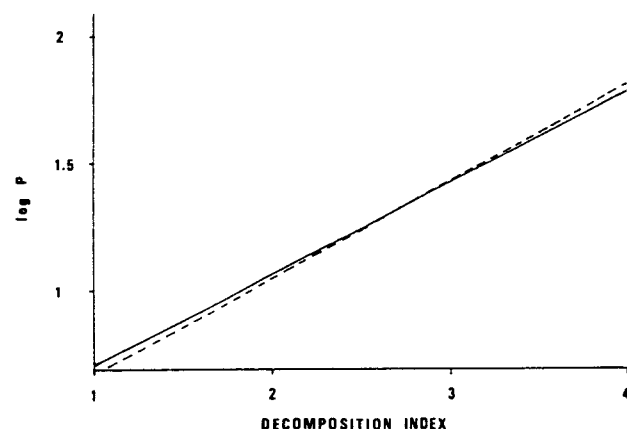


Figure 7. Correlation between the decomposition index and $\log P$ for samples of herring (---) and mackerel (—) stored at 0°C.

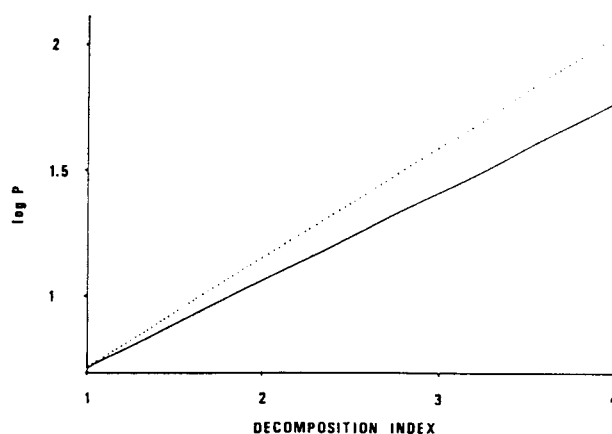


Figure 8. Correlation between the decomposition index and $\log P$ for mackerel samples stored at 0°C (—) and 6.8°C (·····).

The correlation between the volatile amines (TVBN or TMA) and the decomposition index varies according to different factors, some of which are related to the fish itself (species, nutrition, sexual cycle) (13,20,28) and some to the microbial flora liable to spoil it (18). Although the correlation between the TMA/TVBN % ratio and the decomposition index is less dependant on the factors affecting TMA and TVBN production, it is still partially affected by these factors. 'Species' has a slight effect and 'storage temperature' a considerable effect.

Data analysis

In order to determine the maximum acceptable value of $\log P$, we used the results obtained for samples stored at 6-8°C. Although it is recommended to keep fish on melting ice, at 0°C, fish are almost certainly exposed to higher temperatures during transformation and marketing. We, therefore, chose the higher limit of 8°C, above which fish should never be stored.

Given a normal distribution, a confidence interval of 95% corresponds to a deviation of 1.96Σ in relation to the line intersecting the $\log P$ scatter diagram (Fig. 5). The residual variance is the mean of the squares of the deviations between the scatter points and this line. The residual standard deviation Σ expressing the mean dispersion around the line is obtained by calculating the square root of this residual variance:

$$\Sigma = \sqrt{\sigma^2 (1 - r^2)} \text{ where } \sigma^2 = \text{variance} \\ r = \text{correlation coefficient.}$$

The limits of the interval defined above are shown in Fig. 5. The upper limit is defined by the line:

$$\log P + 1.96 \Sigma = 0.4132 i + 0.5571$$

For a given decomposition index, there is a probability of 2.5% of obtaining P values above this line. This study may provide a useful basis for the elaboration of standards.

The changes in the TMA component of the TVBN expressed as P or, better still, as log P, provides a useful means of evaluating fish quality from the TVBN, as this criterion, TMA/TVBN (%), is less affected by the various factors acting on both the TMA and TVBN contents. These factors include the fish species, the quantity of fat, and the various treatments such as dehydration and freezing. The value of P is also independent of the methods used to assay the amines provided that the same method is used for both TMA and TVBN.

Our study was carried out on three species of sea-fish where the values of P obtained were little dependent on the species. Similar results should be obtained in other marine Teleostei, though the values of P will almost certainly be very different in freshwater fish, where the muscle TMAO content is very low, and in the Selachii which have a higher TMAO content and where the TVBN includes large quantities of ammonia produced by the decomposition of urea.

This investigation provides a preliminary experimental study. To use this criterion in practice for the control of fish quality, a straight line must be defined between the line intersecting the log P scatter diagram and the upper limit line which constitutes the extreme limit which should not be exceeded and which was determined at a temperature too high for fish storage.

P is simple and inexpensive to determine and may constitute a useful complement to the TVBN.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Bernard Lemaître for his help with the statistical analysis, Olivier Buridant, Anne-Françoise Salomé, and Guylaine Leleu for their technical assistance, and Kasra Mohanna and Cécile Lahellec for their valuable collaboration.

REFERENCES

- Babitt, J. K. 1972. Decomposition of TMA oxide and changes in protein extractability during frozen storage of minced and intact hake (*Merluccius productus*) muscle. J. Agric. Food. Chem. 20: 1052-1054.
- Beatty, S. A., and N. E. Gibbons. 1937. The measurement of spoilage in fish. J. Biol. Bd. Can. 3:77-91.
- Billon, J., N. Ollieuz, and S. H. Tao. 1979. Etude d'une nouvelle methode de dosage de l'azote basique volatil total pour l'évaluation qualitative des produits de la pêche. R.T.V.A. 149:13-17.
- Boury, M. 1935. L'altération du poisson. Rev. Trav. Off. Pêche Mmes. 8:282-333.
- Boury, M. 1936. L'altération du poisson. Rev. Trav. Off. Pêche Mmes. 9:401-419.
- Burt, J. R. 1977. Hypoxanthine: a biochemical index of fish quality. Process. Biochem. 12:32-35.
- Castell, C. H., W. E. Neal, and B. Smith. 1971. Production of dimethylamine in muscle of several species of gadoid fish during frozen storage, especially in relation to presence of dark muscle. J. Fish. Res. Bd. Can. 28:1-5.
- Collins, J., H. Seagran, and J. Iverson. 1960. Processing and quality studies on shrimp held in refrigerated sea water ice: comparison of objective methods for quality evaluation of raw shrimp. Commenc. Fish. Res. 22:1-5.
- Farber, L., and A. Cedarquist. 1953. The determination of volatile reducing substances (VRS) as an aid in quality control of fish products. Food Technol., 7:478-480.
- Fujii, Y., K. Shudo, K. Nakamura, S. Ishikawa, and M. Okada. 1973. Relation between the quality of canned fish and its content of ATP-breakdown. III. ATP-breakdown in canned albacore and skipjack in relation to the organoleptic inspection. Bul. Jap. Soc. Sci. Fish 39:69-84.
- Hillig, F., JR. L. R. Shelton, J. N. Louchery, and B. F. Fitzgerald. 1960. Chemical indices of decomposition in flounder. J. Ass. Offic. Agr. Chem. 43:755-759.
- Hughes, R. B. 1959. Chemical studies on the herring (*Clupea harengus*). 1. Trimethylamine oxide and volatile amines in fresh, spoiling and cooked herring flesh. J. Sci. Food. Agric., London, 10:431-434.
- Ito, Y., L. Sanches, and D. R. Silva. 1969. Seasonal variation of the chemical composition of sardine. Contrib. Inst. Oceanogr. Univ. S. Paulo, Ser. Technologia, Sao Paulo, 6:1-8.
- Jahns, F. D. 1976. A rapid visual enzyme test to assess fish freshness. Food Technol. 30:27-30.
- Krueger, K. E. 1972. Psychrotrophic micro-organisms in fish. Arch. Lebensmittelhig. 23:275-277.
- Laycock, R. A., and L. W. Regier. 1971. Trimethylamine-producing bacteria on haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) filets during refrigerated storage. J. Fish. Res. Bd. Canada. 28:305-309.
- Lundstrom, R. C., and L. D. Racicot. 1983. Gas chromatographic determination of dimethylamine and trimethylamine in seafoods. J. Assoc. of Anal. Chem. 66:1158-1162.
- Malle, P., G. Nowogrocki, R. Tailliez. 1983. Relationship between deterioration index and rates of total volatile basic nitrogen for marine fish. Science des Aliments, 3:311-322.
- Malle, P., and S. H. Tao. 1987. Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation. J. food Protect. 50:756-760.
- Mendes, M. H. M., and F. M. Lajolo. 1975. Evolucao das bases volateis totais e da trimetilamina em pescados e o seu uso como indicador de qualidade. Rev. Farm. Bioquim. Univ. 13:303-322.
- Morel, M. 1975. Inosine and hypoxanthine used as an index for estimating freshness of raw and canned fish. 6ème réunion des technologistes ouest Européens des produits de la pêche. Ostende. NL.
- Nerisson, P. 1976. L'histamine comme indicateur d'altération. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit. 39:471-482.
- Pantaleon, J., and R. Rosset. 1962. Contrôle de la qualité et de la salubrité due poisson et des coquillages. Association Vétérinaire d'Hygiène Alimentaire, 28 rue des Petits Hotels. 75010 Paris.
- Sainclivier, M. 1983. L'industrie alimentaire halieutique. vol. 1: Le poisson matiere première. Les causes d'altération du poisson et l'évaluation de l'état de fraîcheur. Bull. Soc. Techn. E. N.-S. Agro., Rennes, 4:167-259.
- Saito, T., K. Arai, and M. Matsuyoshi. 1959. Content of ATP-breakdown in fish. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 24:749-750.
- Shewan, J. M. 1937. The spoilage of haddock stored in ice. Rep. Food. Inv. Bd. Gr. Brit. 4:75-78.
- Shewan, J. M., and A. S. C. Ehrenberg. 1957. Volatile bases as quality indices of iced north sea cod. J. Sci. Food Agric. 8:227-239.
- Shewan, J. M., D. M. Gibson, and C. K. Murray. 1971. Estimation of trimethylamine in fish muscle. Fish Insp. Qual. Contr. 71:183-186.
- Soudan, F., A. Daknof, J. Bazin, G. Chapel, G. Daspet, and R. Seynave. 1957. Appreciation de l'altération du poisson frais par un examen organoleptique systématique. Annal. Nutr. Alimentation. 11:1-24.
- Soudan, F. 1965. Conservation par le froid des poissons, crustacés et mollusques. Baillere et fils (ed.) Paris.
- Spinelli, J. 1971. Biochemical basis of fish freshness. process. Biochem. 6:3-6.
- Watanabe, K. 1965. Sardina congelada: alteracoes durante armazenamento a-18°C. Contrib. Inst. Oceanogr. Univ. S. Paul, Ser. Technologia, Sao Paulo, 3:1-12.
- Zamboni, C. Q. 1962. Verificacao da deterioracao da sardinha (*Sardinella aurita*) por microdifusao (metodo de Conway). Rev. Inst. Adolfo Lutz, Sao Paulo, 22:73-76.

RAPID DETERMINATION OF FISH FRESHNESS BY EVALUATION OF ATP DEGRADATION REFLECTED IN K VALUE (*)

DÉTERMINATION RAPIDE DE LA FRAÎCHEUR DU POISSON PAR ÉVALUATION DE LA DÉGRADATION DE L'ATP EXPRIMÉE PAR LE RAPPORT K

P. MALLE (1), Isabelle LE PEZENNEC (2)

SUMMARY

It has been suggested that fish freshness can be evaluated by measurement of ATP degradation products in fish muscle, expressed as the K value ($K = \text{inosine} + \text{hypoxanthine} / \text{IMP} + \text{inosine} + \text{hypoxanthine}$).

We have studied the value of this criterion using a simple colorimetric test (strip) and rapid determination of K by a method recently developed in Japan.

Tests on gutted salmon, and on intact mackerel and whiting stored on ice, show that the K value is closely related to the freshness index (respective correlation coefficients 0.93, 0.98, 0.98). Unlike the other criteria examined, K changed in the three species from the first days of storage. The K value therefore allows reliable evaluation of freshness throughout the period in which the fish is edible.

In the case of whiting, the K value and the total volatile basic nitrogen (TVBN) were two highly significant criteria of freshness (respective correlation coefficients: 0.98 and 0.98). In mackerel, and above all salmon, K was a more reliable criterion than TVBN (respective correlation coefficients: 0.98 and 0.93 for mackerel, and 0.93 and 0.87 for salmon).

Key-words: *K value, rapid test, freshness, fish, total volatile basic nitrogen.*

(1) Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires, Unité d'Etudes des Produits de la Pêche, rue Huret Lagache, 62200 Boulogne-sur-Mer, France.

(2) Centre d'Expérimentation et de Valorisation des Produits de la Mer, 15-17 rue de Magenta, 62200 Boulogne-sur-Mer, France.

(*) Translated from the French by Dr D. MARSH, 87 rue du Dessous des Berges, 75013 Paris.

RÉSUMÉ

La détermination objective de la fraîcheur du poisson repose essentiellement sur des tests microbiologiques (flore aérobie mésophile) ou chimiques (azote basique volatil total, triméthylamine, ...) qui, dans certains cas, ne sont pas suffisamment fiables.

La mesure des produits de dégradation de l'ATP dans le muscle de poisson, exprimée par la valeur K ($K = \text{inosine} + \text{hypoxanthine} / \text{IMP} + \text{inosine} + \text{hypoxanthine}$), constitue une approche différente et a été proposée pour déterminer la fraîcheur.

L'intérêt de ce critère est étudié à l'aide d'un test colorimétrique simple (bandelette) et rapide (temps de révélation 10/15 min) de détermination de K, mis au point récemment au Japon. L'évolution de K en fonction de l'indice de fraîcheur (fig. 3) est comparée à celle d'autres paramètres : ABVT, TMA et flore aérobie mésophile (fig. 4, 5 et 6). Des essais sont effectués sur du saumon éviscéré, du maquereau et du merlan non éviscérés, conservés en glace.

Les résultats montrent que la valeur K est en étroite relation avec l'indice de fraîcheur de ces trois produits (coefficients de corrélation respectifs : 0,93/0,98/0,98). Contrairement aux autres critères pris en compte, K évolue, pour les trois espèces considérées, dès les premiers jours de conservation (fig. 1 et 2). La valeur K permet donc une évaluation fiable de l'état de fraîcheur pendant toute la durée où le poisson reste consommable.

Dans le cas du merlan (poisson maigre), la valeur K et l'azote basique volatil total sont deux critères tout à fait significatifs du niveau de fraîcheur (coefficients de corrélation respectifs : 0,98 et 0,98). Par contre, pour le maquereau et surtout pour le saumon (poissons gras), K constitue un critère plus fiable que l'ABVT (respectivement 0,98 et 0,93 pour le maquereau, 0,93 et 0,87 pour le saumon).

Le test rapide ne nécessite aucun matériel de laboratoire particulier et les résultats obtenus semblent reproductibles pour un même opérateur.

Mots clés : valeur K, test rapide, fraîcheur, poisson, azote basique volatil total.

1 - INTRODUCTION

Objective determination of fish freshness essentially depends on microbiological or chemical tests, which evaluate the microflora of muscle tissue or assess muscle degradation. With whole, refrigerated fish, a detailed organoleptic inspection (SOUDAN *et al.*, 1957) may suffice for freshness determination. With filleted or frozen fish, however, additional laboratory tests are indispensable. For all fish, whether refrigerated or frozen, whole or filleted, there has been an increasing need for objective assessment criteria, for industrial quality control of raw materials, and for commercial definition of specifications.

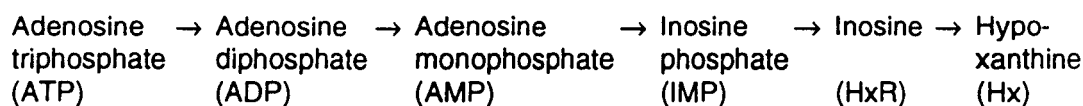
Apart from those designed to assess eating quality, the microbiological tests used for fish evaluate mesophilic aerobic microflora. In practice, this evaluation

has been found wanting in terms of spoilage, notably because the dominant flora in fish is psychrotrophic. Reference microbiological analyses also have the major drawback of requiring long incubation periods.

Assessment of freshness by chemical analysis remains awkward, despite much research (CONNELL, 1986). Numerous authors have acknowledged the value of determination of total volatile basic nitrogen (TVBN) and of trimethylamine (TMA) (BOURY, 1936; FARBER and CEDERQUIST, 1953; SHEWAN and EHRENBURG, 1957; HILLIG *et al.*, 1960; PANTALEON and ROSSET, 1962).

We have studied the correlation between the spoilage index for fish and TVBN (MALLE *et al.*, 1983) and have proposed normalisation of the determination and use of TVBN (MALLE *et al.*, 1989). Sanitarians value the assay of volatile amines, and this criterion is frequently used, despite its inadequacies. Chemical determinations of hydrogen sulphide, propionic or butyric acid, indole, hypoxanthine, and histamine (NERISSON, 1976) are subject to even greater criticism and are only of value in special cases. With the development of a rapid and efficient method of extraction, HPLC assay of biogenic amines will provide very reliable information on the degree of spoilage.

Measurement of ATP degradation products constitutes a different approach. It takes into account the effect of autolysis and is therefore of value from the first stages of storage onwards, i.e. even before development of microbial populations. ATP degradation produces a successive sequence of compounds:



The work of SAITO *et al.* (1959) showed that it is preferable to use the sum of the inosine (HxR) and hypoxanthine (Hx) contents rather than Hx alone. These authors suggest determining the ratio of the HxR+Hx over the sum of the ATP degradation products. The K value can be defined in the following simplified form:

$$K (\%) = \frac{\text{inosine} + \text{hypoxanthine}}{\text{IMP} + \text{inosine} + \text{hypoxanthine}} \times 100$$

Until now, this ratio has been evaluated by chromatography (UCHIYAMA and KAKUDA, 1984), but as this determination is both costly and time-consuming it has been little used. A colorimetric method using a test strip and based on enzymatic reactions has been developed for assay of ATP metabolites. Japanese investigators have demonstrated the existence of a highly significant correlation between the determinations by enzymatic methods and those made by HPLC (UDA *et al.*, 1983; NEGISHI and ISAO, 1989). This rapid test has allowed us to evaluate the reliability of the K value as a criterion of fish freshness.

2 - MATERIALS AND METHODS

Fish

Three common fish species of three different families were studied: salmon (*Salmo salar*), mackerel (*Scomber scombrus*), and whiting (*Merlangus merlangus*).

Determination of the freshness index (organoleptic inspection)

The degree of freshness was assessed on the basis of EEC regulation n°103/76, using the organoleptic rating of appendix A of EEC regulation n°2455/70.

Mesophilic aerobic microbial count

Aerobic microflora were counted in PCA agar incubated at 30°C according to the methodology of appendix II of the order of 21 December 1979.

TVBN assay by steam distillation

This method was proposed by the Codex Alimentarius Committee and was tested by BILLON *et al.* (1979).

TMA assay

The steam distillation method used for TVBN determination was modified for TMA assay. Before distillation, 20 ml of formaldehyde (at least 37%) was added to the filtrate to block the primary and secondary amines (MALLE and TAO, 1987).

Determination of K value

The K value was determined by a colorimetric method (Fresh-Tester Transia) using a test strip containing two bands corresponding respectively to the evaluation of inosine + hypoxanthine (A) and IMP (B):

	A		B	
--	---	--	---	--

A dorsal muscle sample (between 0.2 and 0.5 g) was homogenised in a mortar with 5 ml of buffer solution (FII reagent supplied with the assay kit).

The strip was immersed in the suspension and was then shaken so that a uniform film of liquid covered bands A and B. The strip was then placed in darkness at room temperature for 10 to 15 minutes. The colours of bands A and B were then compared with those of the standard to determine the corresponding K value.

Experimental protocol

— Salmon (gutted)

A homogeneous batch of decapitated, gutted salmon stored in melting ice was analysed on D2 (day of receipt at the laboratory), and then on D5, D8, D11, D15 and D18 (D0 : day of capture).

At each stage, three salmon were analysed and the following parameters were determined for each: Fresh Tester score (n=5), mesophilic aerobic microbial count (30°C) (n=3), TVBN (n=2), and sensory analysis (n=1).

— Mackerel and whiting (non-gutted)

Homogeneous batches of whole, non-gutted mackerel and whiting stored in melting ice were analysed on D2 (day of receipt at the laboratory), and then on D4, D7, D9, D11, D13 and D15 (D0 : day of capture).

At each stage, three fishes were analysed and the following parameters were determined for each: Fresh Tester score (n=3), mesophilic aerobic microbial count (30°C) (n=2), TVBN (n=1), trimethylamine (n=1) and sensory testing (n=1).

3 - RESULTS

3.1 Change in K value during storage in ice

Case of gutted fish: salmon

The results presented in figure 1 express the K value of muscle tissue of gutted salmon as a function of the number of days of storage in ice. The coefficients of variation (%) of K calculated from five determinations on a given fish ranged between 0 and 11.1, with a mean of 5.1.

Case of non-gutted fish: mackerel and whiting

Figure 2 illustrates how K changed with time for mackerel and whiting stored in ice.

3.2 Time course of K as a function of the freshness index and comparison with trends in other parameters

Time course of K as a function of freshness index for the three species

Figure 3 illustrates the correlation between the K value and the EEC freshness index for salmon, mackerel and whiting. It can be seen that for a given freshness index, the K values are not identical for the three species. The curves are not superimposable and the K values are therefore specific. Nonetheless, the trends in K value are similar in the three species.

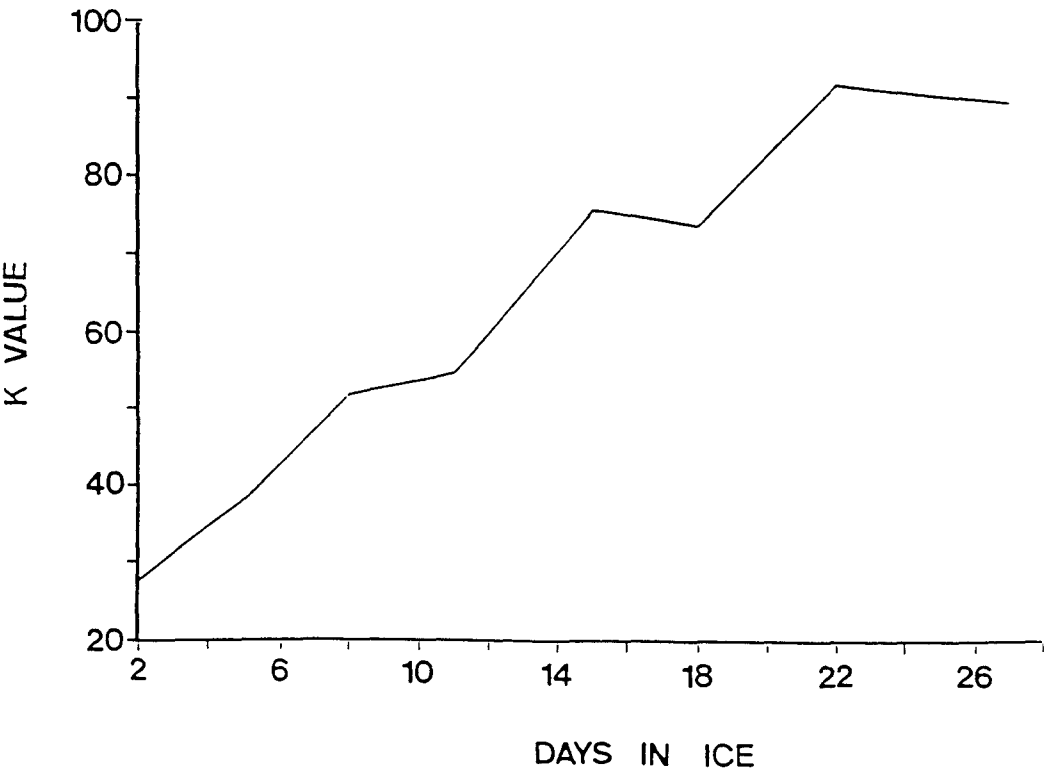


Figure 1
Change in K value in salmon muscle during storage in ice

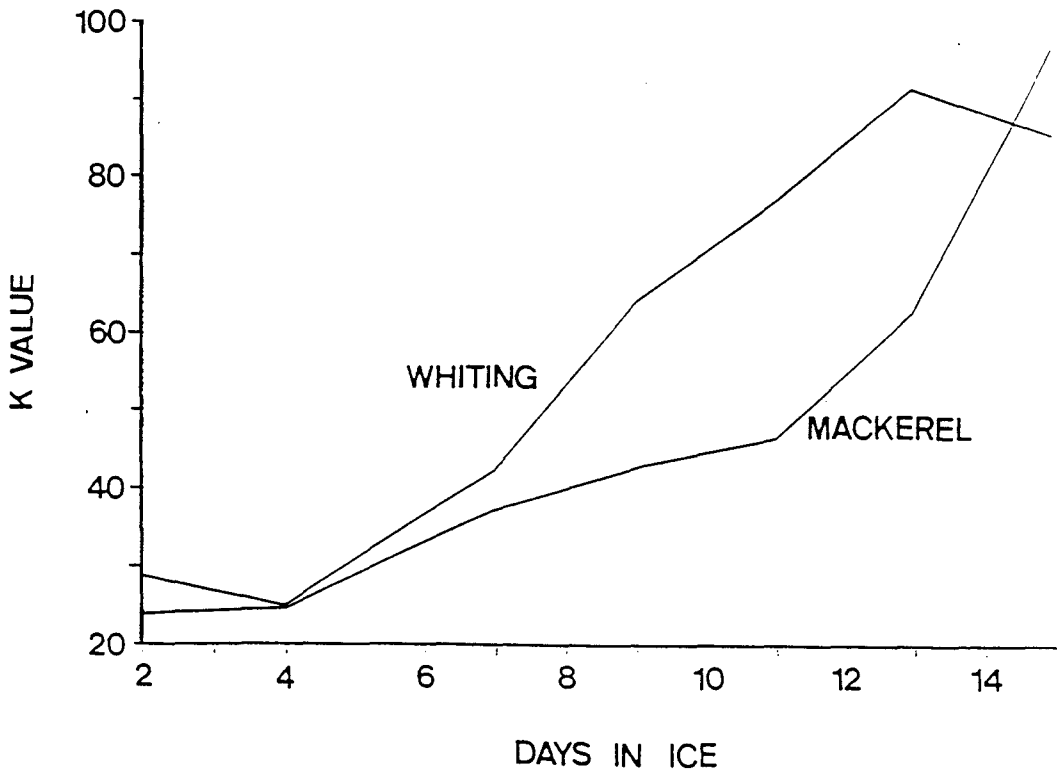


Figure 2
Change in K value in fish muscle during storage in ice

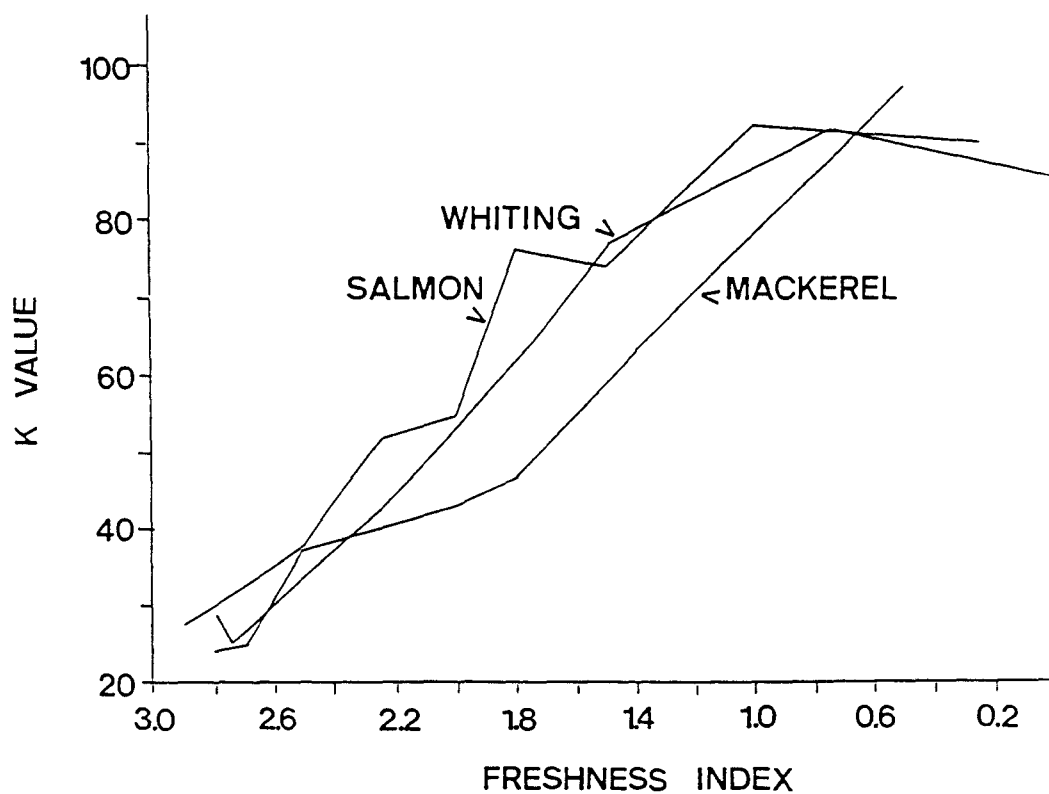


Figure 3
Correlation between K value in fish muscle and freshness index

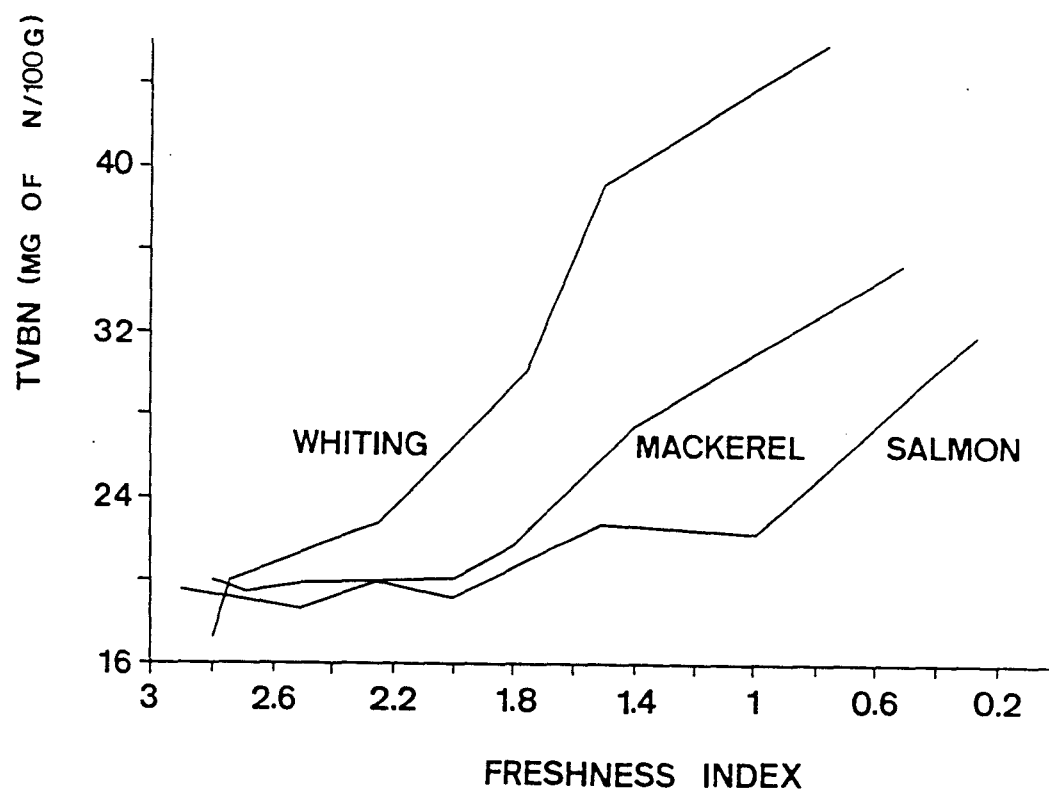
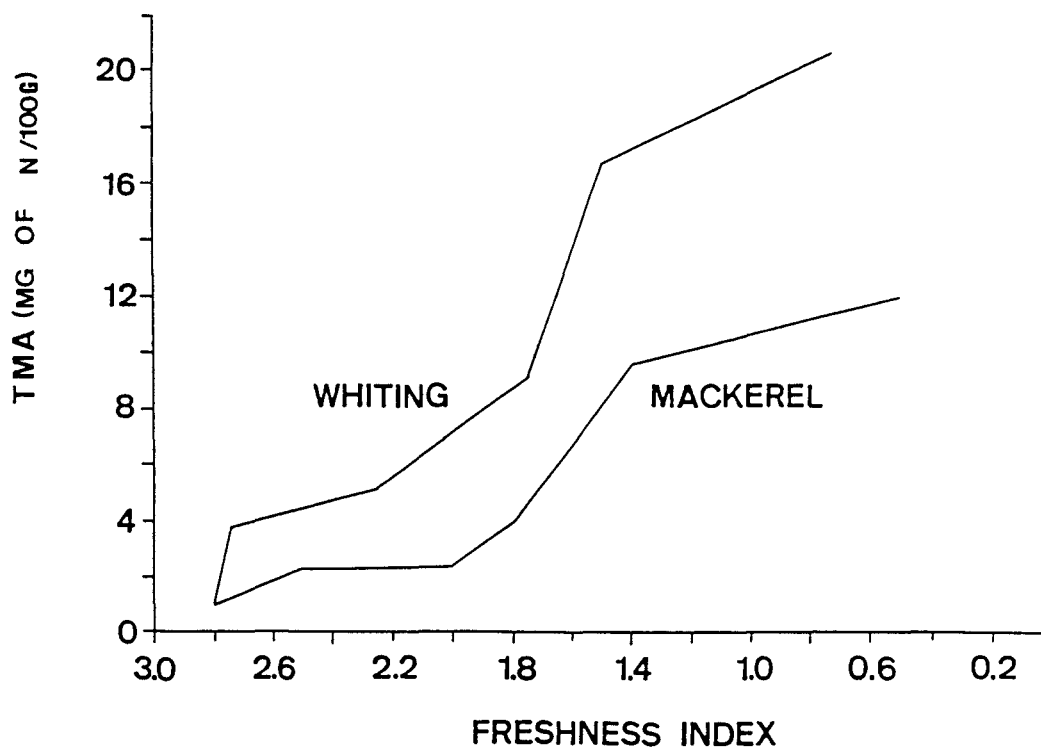


Figure 4
Correlation between TVBN in fish muscle and freshness index

**Figure 5**

Correlation of TMA content in fish muscle and freshness index

Comparison with changes in TVBN

Figure 4 illustrates for the three species the considerably differing curves of TVBN content as a function of freshness index. Note that the choice of fish species was dictated by considerations relating to TVBN: whiting represents species in which TVBN content closely reflects the degree of spoilage, mackerel illustrates the case of fatty fish in which changes in TVBN are often less significant in terms of quality assessment, and salmon is one of the exceptional species in which TVBN is an unreliable criterion. Given this background, the observed divergences are not surprising and do not call into question the validity of this criterion in many species.

Comparison with changes in TMA

TMA contents were determined for two species: mackerel and whiting. The specific nature of this chemical criterion is confirmed by the results illustrated in figure 5. TMA content was a function of freshness index, but the trends were different for the two species.

Comparison with changes in mesophilic aerobic flora (MAF)

The mesophilic aerobic flora count is shown in figure 6 as a function of freshness index and in figure 7 as a function of the duration of storage in ice. The effect of gutting is apparent from the changes noted for the gutted salmon, and those observed with non-gutted mackerel and whiting.

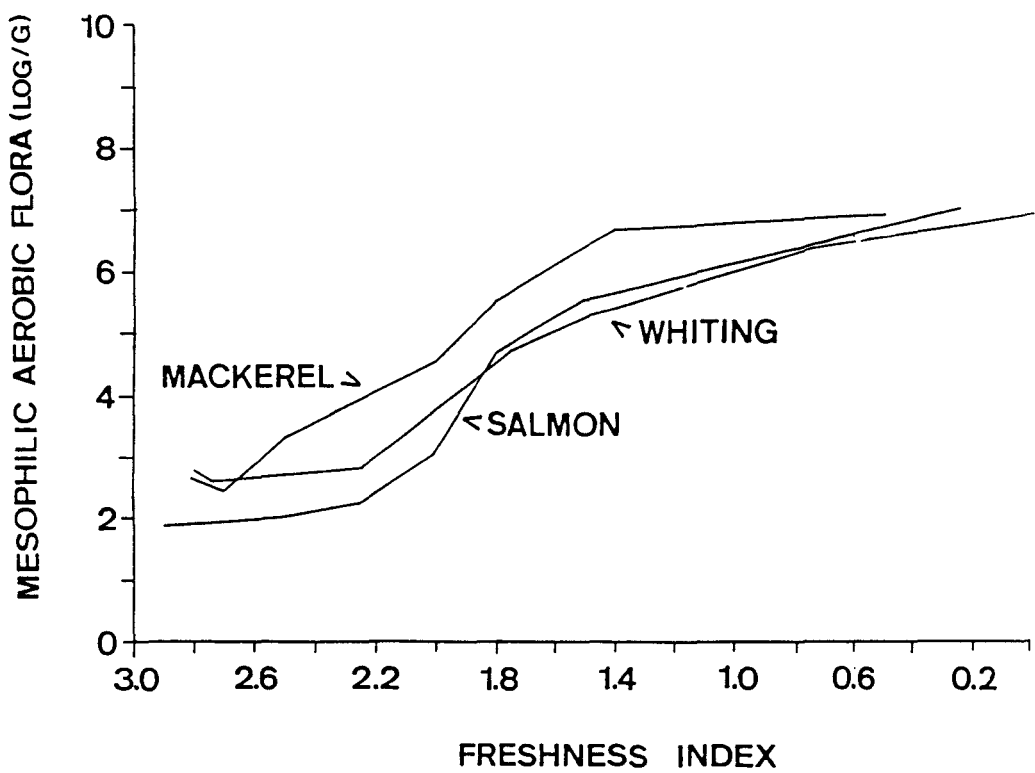


Figure 6
Mesophilic aerobic flora count in fish muscle as function of freshness index

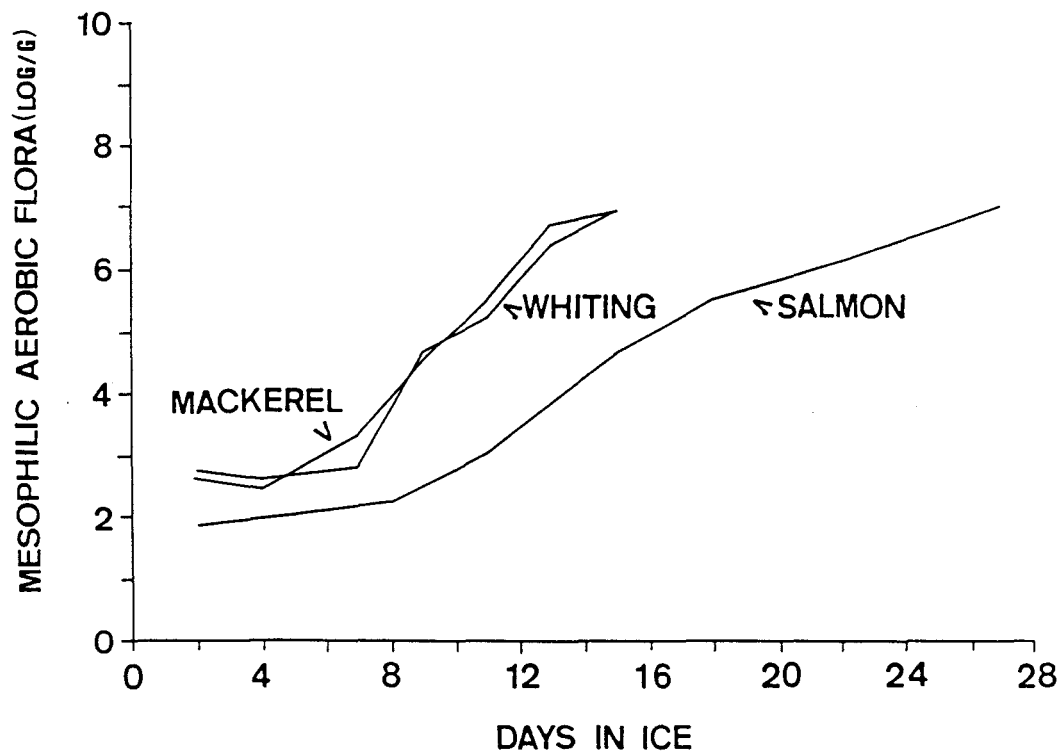


Figure 7
Changes in mesophilic aerobic flora count in fish muscle during storage in ice

3.3 Study of correlations

The coefficients of correlation between each of the criteria studied and the duration of storage are given in table 1, and those between the same criteria and the freshness index in table 2. For a given species, the degree of freedom (df) is the same, thus allowing direct comparison of values.

In the cases of salmon and mackerel, the correlation with the duration of storage was more significant for K (0.92 and 0.91) than for TVBN (0.82 and 0.80). The correlation with the freshness index was also more significant for K (0.93 and 0.98) than for TVBN (0.87 and 0.93). In the case of whiting, the significance of the correlations was essentially the same for the K value, TVBN and TMA. The coefficients of correlation with the total mesophilic flora count were always lower than those for the other criteria.

Analysis of the same results by distinguishing between two phases in the duration of storage shows that for salmon, the correlation between K and the freshness index was very significant in the first phase (freshness index greater than or equal to two): $r = 0.979$, a value greater than the level of significance (0.950, $p < 0.05$, $df = 2$). In contrast, the correlation between TVBN and freshness index was not at all significant in this phase. Comparable observations were made with mackerel and whiting.

Table 1
Correlation coefficients between each criterion (K, TVBN, TMA, MAF)
and number of days in ice

Criterion		K	TVBN	TMA	MAF
Species					
Salmon (gutted)	(df = 6)	0.92	0.82		0.70
Whiting (non-gutted)	(df = 4)	0.97	0.96	0.96	0.66
Mackerel (non-gutted)	(df = 5)	0.91	0.80	0.88	0.78

Table 2
Correlation coefficients between each criterion (K, TVBN, TMA, MAF)
and freshness index

Criterion		K	TVBN	TMA	MAF
Species					
Salmon (gutted)	(df = 6)	0.93	0.87		0.79
Whiting (non-gutted)	(df = 4)	0.98	0.98	0.96	0.78
Mackerel (non-gutted)	(df = 5)	0.98	0.93	0.94	0.90

4 - DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The significance of the K value has been studied as a function of both the duration of storage and the freshness index. The reliability of K has been assessed by comparison of changes in K with trends in classical, chemical and microbiological criteria, even if these criteria are sometimes justly criticised.

Comparison with TVBN and TMA revealed differences in the respective trends in these chemical criteria. TVBN altered little during the first stages of storage, but subsequent changes were increasingly significant as spoilage progressed. Changes in TMA occur earlier, but are essentially related to development of bacterial flora (BABITT, 1972).

The essential usefulness of the K value, in contrast, is that it changes from the start of storage. K reflects autolytic phenomena, which explains its reliability as an index of fish freshness prior to any bacterial growth in the muscle tissue. We observed a significant progression in the K value throughout the period in which the fish remained edible.

It is essential to realise during the interpretation of results that the observed trends in the different criteria vary between species. For example, apart from the basic distinction between selachians and teleosts, TVBN depends on the species, but remains quite similar in the teleosts (MENDES and LAJOLO, 1975). The trend in TVBN may, however, differ in fatty fish in general, and in this case is a debatable criterion, particularly in salmon. It has long been known that TMA content is species-dependent. The concentration of TMA oxide in muscle tissue is, for instance, specific (YAMADA, 1967), and the reduction of TMA oxide to TMA depends on many factors, notably pH and temperature. Because of this, the use of TMA alone as an assessment criterion is highly inadvisable.

Our study of K in three species confirms the specific character of this criterion as reported by numerous authors. In addition, we have shown within the limited framework of our study that for a given degree of spoilage K values are similar and changes in K occur in parallel.

Counts of mesophilic aerobic flora provide information on the microbiological quality of the fish. However, this criterion is open to criticism, notably because the dominant flora in fish from cold and temperate oceans is psychrotrophic (SHEWAN, 1977), and because there is no proof that mesophilic aerobic flora is determinant in the process of spoilage (VAN DEN BROEK *et al.*, 1984). To date, mesophilic aerobic flora has constituted a recognised criterion in the regulations, and we have used it to define two different models of microbiological development (gutted and non-gutted fish). It is, however, of limited value in determination of the reliability of the K value as a spoilage criterion.

Compared with the other criteria studied here, the K value was found to be a more reliable indicator of the degree of fish freshness at the start of storage and a good index of quality at different degrees of spoilage. Both K and TVBN allow good assessment of the freshness of whiting. In those species where TVBN is a less reliable (mackerel) or more variable (salmon) criterion, the K value provides complementary information (fatty fish) and can replace TVBN in the case of salmon.

This study was undertaken to verify the validity of a test which is both simple and rapid (15 minutes), speed being an undeniable advantage for on-site measurements. In fact, the test does not depend on classical laboratory techniques but on the use of a colorimetric method not requiring any particular equipment. Implementation of the test does, however, require control of temperature for the enzymatic reactions involved and of lighting for reading of the results. As interpretation of the results involves comparison with a standard, it can be considered repeatable when performed by the same investigator.

It was found to be necessary to allow development of the reactive strip for between 10 and 15 minutes in darkness, since a longer period may result in a colour change. The correspondance between certain observed shades of colour and the reference shades was not always satisfactory but the results were nonetheless unaffected.

The K value provides an accurate reflection of autolytic phenomena. When fish are not gutted, bacteria invade the muscle tissue earlier and the results obtained show that K changes more rapidly than in gutted fish. K therefore seems to encompass both autolysis and bacterial degradation, and can thus be considered a reliable index of fish freshness at different stages of storage. When TVBN gives a reliable assessment, the K value provides additional confirmation; when TVBN is unreliable it can be replaced by K. Current work on biogenic amines will in the medium-term allow completion of data on volatile amines (GOUYGOU *et al.*, 1989). Compared with these criteria, K is of particular value due to the fact that it takes into account enzyme mediated muscle degradation.

Received March 19, 1991. Accepted September 30, 1991.

ACKNOWLEDGEMENTS

Acknowledgements to the technical staff of the laboratories and to the Marketing and Research departements of TRANSIA.

REFERENCES

- BABITT J.K., 1972. Decomposition of TMA oxide and changes in protein extractibility during frozen storage of minced and intact hake (*Merluccius productus*) muscle. *J. Agric. Food Chem.*, **20**, 1052-1054.
- BILLON J., OLLIEUX N., TAO S.H., 1979. Etude d'une nouvelle méthode de dosage de l'azote basique volatil total pour l'évaluation qualitative des produits de la pêche. *Rev. Tech. Vét. Aliment.*, **149**, 13-17.
- BOURY M., 1936. L'altération du poisson. *Rev. Travaux Off. Pêches Maritimes*, **9**, 401-419.
- CONNELL J.J., 1986. *Control of fish quality*. Second ed. Fishing News Books Ltd. Farnham, Surrey, England.
- FARBER L., CEDERQUIST A., 1953. The determination of volatile reducing substances as an aid in quality control of fish products. *Food Technol.*, **7**, 478-480.
- GOUYGOU J.P., MARTIN C., SINQUIN C., DURAND P., 1989. Determination of biogenic amines in fish. *Océanis*, **15**, 599-604.
- HILLIG F., SHELTON Jr. L.R., LOUCHREY J.N., FITZGERALD B.F., 1960. Chemical indices of decomposition in flounder. *J. Ass. Offic. Agr. Chem.*, **43**, 755-759.
- MALLE P., NOWOGROCKI G., TAILLIEZ R., 1983. Corrélation entre l'indice d'altération et l'azote basique volatil total pour divers poissons marins. *Sci. Aliments*, **3**, 311-322.
- MALLE P., VANELLE A.M., PETIT A., 1989. Teneur en azote basique volatil total du tissu musculaire des poissons marins. *Rec. Méd. Vét.*, **165**, 395-402.
- MALLE P., TAO S.H., 1987. Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation. *J. Food Prot.*, **50**, 756-760.
- MENDES M.H.M., LAJOLO F.M., 1975. Evolução das bases voláteis totais e da trietilamina em pescados e o seu uso como indicador de qualidade. *Rev. Farm. Bioquim Univ.*, **13**, 303-322.
- NEGISHI S., ISAO K., 1989. An enzymatic assay method for IMP determination using IMP dehydrogenase and an application of the principle to a test paper method. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 1591-1597.
- NERISSON P., 1976. L'histamine comme indicateur d'altération. *Rev. Travaux Inst. Pêches Maritimes*, **39**, 471-482.
- PANTALEON J., ROSSET R., 1962. Contrôle de la qualité et de la salubrité du poisson et des coquillages. Association Vétérinaires d'Hygiène Alimentaire, 28 rue des Petits Hôtels, Paris.
- SAITO T., ARAI K., MATSUYOSHI M., 1959. A new method for estimating the freshness of fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **24**, 749-750.
- SHEWAN J.M., EHRENBURG A.S.C., 1957. Volatile bases as quality indices of iced North Sea cod. *J. Sci. Food Agric.*, **8**, 227-239.
- SHEWAN J.M., 1977. The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. In: *Handling, processing and marketing of tropical fish*, 51-66. Tropical Products Inst., London.
- SUDAN F., DAKNOF A., BAZIN J., CHAPEL G., DASPET G., SEYNAVE R., 1957. Appréciation de l'altération du poisson frais par un examen organoleptique systématique. *Ann. Nutr. Aliment.*, **11**, 1-24.
- UCHIYAMA H., KAKUDA K., 1984. A simple and rapid method for measuring K value, a fish freshness index. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **50**, 263-267.
- UDA F., HAYASHI E., UCHIYAMA H., KAKUDA K., 1983. Colorimetric method for measuring K value, an index for evaluating freshness of fish. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, n°111, aug.
- VAN DEN BROEK M.J.M., MOSSEL D.A.A., MOL H., 1984. Microbiological quality of retail fresh fillets in the Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.*, **1**, 53-61.
- YAMADA K., 1967. Occurrence and origine of trimethylamine oxide in fishes and marine invertebrates. *Bull. Jap. Sci. Fish.*, **33**, 591-603.

