



HAL
open science

Evaluation de la qualité des poissons frais par des approches chimiques

François Leduc

► **To cite this version:**

François Leduc. Evaluation de la qualité des poissons frais par des approches chimiques. Alimentation et Nutrition. Université des Sciences et Technologies (Lille 1), 2011. Français. NNT : . tel-02811367

HAL Id: tel-02811367

<https://hal.inrae.fr/tel-02811367>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE 1
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE ET SANTE

THESE
présentée par
François LEDUC

Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université
Sciences de la vie et de la santé
Spécialité : Biochimie

Evaluation de la qualité des poissons frais par des approches chimiques

Soutenue le 15 décembre 2011 devant la commission d'examen :

Président : Docteur Jean-Claude Michalski

Rapporteurs : Docteur Stéphanie Bordenave
Professeur Jérôme Lemoine

Examineurs : Docteur Jean Louis Berdagué
Docteur Guillaume Duflos
Professeur Ossarath Kol
Docteur Assi N'Guessan

Ces travaux ont été réalisés sous la direction du Pr Ossarath Kol de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 du CNRS (Directeur : Dr Jean-Claude Michalski), Université Sciences et Technologies de Lille, du Dr Assi N'Guessan du Laboratoire Paul Painlevé - UMR CNRS 8524 & Ecole Polytechnique Universitaire de Lille et du Dr Pierre Malle directeur du laboratoire des produits de la pêche de l'Anses de Boulogne sur mer (laboratoire d'accueil).

Nous avons bénéficié d'un cofinancement de la Région Nord-Pas de Calais et de l'Anses.

*A ma famille,
à ma compagne,
pour leur soutien et leur amour.*

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie plus particulièrement Madame le Docteur Stéphanie Bordenave et Monsieur le Professeur Jérôme Lemoine d'avoir accepté d'en être les rapporteurs. Je remercie également Messieurs les Docteurs Jean-Louis Berdagué, Assi N'Guessan, Guillaume Duflos et Monsieur le Professeur Ossarath Kol, qui ont bien voulu examiner ce travail. Merci à Monsieur le Docteur Jean-Claude Michalski qui me fait le plaisir de présider le jury de cette thèse.

Je remercie sincèrement mes encadrants autres qu'Ossarath Kol, Assi N'Guessan et Guillaume Duflos qui composent mon jury, les Docteurs Frédéric Krzewinski et Pierre Malle pour la confiance qu'ils m'ont accordée.

Je tiens à remercier plus particulièrement encore Monsieur le Docteur Pierre Malle pour l'accueil au sein de son laboratoire et de son encadrement de qualité et Monsieur le Docteur Guillaume Duflos pour son encadrement de qualité, sa psychologie et son optimisme inaltérable. « Merci Guillaume pour votre dynamisme, votre disponibilité de tous les instants et pour nos relations amicales en dehors du travail »

Un grand merci au Dr Jean-Louis Berdagué ainsi qu'à toute son équipe de l'INRA de Clermont-Ferrand / Theix pour cette collaboration fructueuse. Merci Jean-Louis pour vos conseils précieux. Merci à Pascal Tournayre, Nathalie Kondjoyan et Frédéric Mercier.

Merci aussi aux Dr Françoise Leroi et Papa Abdoulaye Fall de l'IFREMER de Nantes pour cette collaboration.

Bien sûr un grand merci à toute l'équipe de « l'ANSES de Boulogne sur mer » pour leur aide, leur soutien et tous les très bons moments passés au cours de ces 3 années. Merci à Sophie, Karine, Corinne, Colette, Graziella, Régine, Stéphanie, Mélanie, Typhaine, Marie Ange, Cindy, Odile, Sylvie, Charlotte, Gaëlle, Sabine, Virgine, Jean Marc, Guylaine et Clémence.

Merci à toute ma famille et à mes amis pour leur soutien. Un grand merci à Julie pour tout son amour.

Abréviations

ACP : analyse en composante principale
ADP : adénosine diphosphate
AGPI : acides gras polyinsaturés
AMP : adénosine monophosphate
ANOVA : analyse de variance
ANP : azote non protéique
ATP : adénosine triphosphate
CAF : calcium activated factor
CAH : classification ascendante hiérarchique
DG : diglycéride
DH : headspace dynamic
DHA : acide docosahexaénoïque
DMA : diméthylamine
EPA : acide eicosapentaénoïque
FA : formaldéhyde
GC : chromatographie gazeuse
HS : headspace static
Hx : hypoxanthine
IMP : inosine monophosphate
Ino : inosine
LOX : lipoxigénase
MG : monoglycérides
MS : spectrométrie de masse
OTMA : oxyde triméthylamine
QIM : quality index method
RLM : régression linéaire multiple
SPME : micro-extraction en phase solide
SSO : specific spoilage organisms
TG : triglycérides
TMA : triméthylamine

Table des matières

Remerciements	4
Table des matières	6
Avant-propos.....	7
Introduction.....	10
Généralités	13
Chapitre I : La qualité du poisson	13
1. Les lipides	13
2. Les protéines	16
3. Les glucides	17
4. Les extraits azotés non protéiques	18
5. Les vitamines et sels minéraux	20
Chapitre II : Les changements post-mortem du poisson influençant la qualité	22
1. Les changements sensoriels.....	22
2. Les altérations autolytiques.....	23
3. Les changements microbiologiques.....	30
4. Les changements au niveau des lipides	36
Chapitre III : Les différentes méthodes de caractérisation de la qualité d'un poisson	48
1. Les méthodes sensorielles	48
2. Les méthodes physiques	49
3. Les méthodes microbiologiques	53
4. Les méthodes chimiques et biochimiques.....	53
Chapitre IV : Les composés volatils	67
1. Le développement de l'arôme du poisson	67
2. L'odeur du poisson.....	68
3. L'identification d'indicateurs odorants de qualité.....	71
4. Les composés volatils rencontrés	72
5. Les différentes méthodes d'extraction utilisées pour l'analyse des composés volatils des produits de la mer	78
6. Les différents outils analytiques des composés volatils	83
Chapitre V : Etude statistique	88
1. Analyse descriptive	88
2. Analyse prédictive.....	90
Présentation des résultats	92
Résultats.....	94
1 ^{ère} partie : Etude préliminaire des composés volatils	94
2 ^{ème} partie : Etude des composés volatils de la chair de poisson frais	105
3 ^{ème} partie : Application de la méthode HS-SPME-GC-MS à une autre problématique que la fraîcheur et à une autre matrice (crevette)	130
Conclusions & Perspectives.....	155
Bibliographie	160

Avant-propos

La fraîcheur est un paramètre déterminant de la qualité sanitaire du poisson. S'agissant d'une matrice très altérable, l'évaluation objective de sa fraîcheur est essentielle pour les opérateurs de la filière mais également pour les services d'inspection. Il convient donc de disposer d'outils performants pour déterminer précisément le niveau d'altération. L'objectif est de proposer une méthode qui permet de déterminer la qualité des poissons de manière fiable et objective dès les premiers stades d'altération.

Contexte socio-économique

La consommation annuelle des produits aquatiques est passée de 12 kg par personne en 1975 à 25 kg/personne en 1988 pour atteindre actuellement environ 35 kg. La production française des produits de la pêche est d'environ 800 000 tonnes pour une valeur de 1 025 M€ correspondant à 38 000 emplois directs intervenant dans la filière depuis la pêche jusqu'à la transformation.

Enjeu régional

Le port de Boulogne sur mer est le premier port de pêche français mais aussi le premier centre européen de transformation des produits de la pêche. Cette activité économique est primordiale pour la Région Nord Pas de Calais. Cette filière est depuis une dizaine d'années en pleine mutation à la fois pour faire face aux problèmes de ressources mais aussi pour s'adapter aux marchés concurrentiels. Toutes les forces en présence (chambre de commerce et d'industrie, communauté d'agglomération, département et région) se mobilisent pour soutenir cette filière. Le pôle de compétitivité « AQUIMER » permet aussi de faire le lien entre les différents acteurs régionaux et nationaux (industriels, chercheurs,...). La création d'une unité mixte technologique (UMT) regroupant un centre technique (Haliomer), l'Anses, l'université du Littoral Côte d'Opale, et Ifremer renforce aussi la synergie des partenaires scientifiques dédiés à cette filière à Boulogne sur mer.

Enjeu sanitaire

A Boulogne sur mer, le laboratoire des produits de la pêche de l'Anses développe des sujets de recherches en microbiologie, en physicochimie et en parasitologie. La construction d'un nouveau laboratoire en 2008 (avec le soutien du Conseil régional, de la Communauté européenne, de la Communauté d'agglomération de Boulogne sur mer et du Conseil général) témoigne de l'intérêt reconnu de ces activités de recherche sur les produits de la pêche face aux enjeux sanitaires nationaux. Le laboratoire est accrédité par le Cofrac pour ses démarches qualité en microbiologie et en physico-chimie. Il est par ailleurs laboratoire national de référence pour l'histamine et *Vibrio*.

Il est important d'ajouter également que la direction scientifique de l'Anses soutient la thématique qualité-fraîcheur des produits de la pêche. L'Anses a validé le sujet de la thèse et participe à son cofinancement.

Partenaires - collaborations

Le laboratoire dans lequel se déroule la thèse est un partenaire de « l'UMT 08 : fraîcheur et qualité des produits aquatiques » qui bénéficie d'un financement régional ARCIR sur cette thématique (ces démarches ayant été labellisées par le pôle Aquimer). Au niveau national, nous avons des contacts avec l'Ifremer de Nantes qui aborde aussi la qualité mais sur des matrices différentes et l'INRA de Clermont Ferrand qui possède des compétences analytiques reconnues sur les composés volatils étudiés. Au niveau international, le laboratoire participe activement au groupe de travail physico-chimie du WEFTA (association de laboratoires européens travaillant sur la qualité des produits de la mer).

Contexte de la thèse

Le travail de cette thèse rentre dans le cadre d'un des axes de Recherche du Laboratoire de Boulogne sur mer qui porte sur l'évaluation de l'altération du poisson par des marqueurs chimiques. Le projet a été financé durant 3 années (2008-2011) par un cofinancement de la Région Nord Pas de Calais et de l'ANSES et a été dirigé par un comité de pilotage constitué du Dr Ossarath Kol (Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle - UMR CNRS 8576), du Dr Pierre Malle (Directeur du Laboratoire des produits de la pêche - ANSES de Boulogne sur mer), du Dr Assi N'Guessan (Laboratoire Paul Painlevé - UMR CNRS 8524 & Ecole

Polytechnique Universitaire de Lille), du Dr Frédéric Krzewinski (Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle - UMR CNRS 8576) et du Dr Guillaume Duflos (Directeur adjoint et responsable de l'unité physico-chimie du Laboratoire des produits de la pêche - ANSES de Boulogne sur mer).

Introduction

Le poisson est essentiellement consommé à l'état frais. En effet, le poisson frais est l'élément le plus important aussi bien sur les marchés locaux qu'internationaux. Il est impossible d'obtenir un produit sain et de qualité à base de poisson si l'opérateur n'utilise pas un poisson frais comme matière première. Ce concept de base est nécessaire pour que les marchés en produits de la mer soient approvisionnés en produits de bonne qualité.

Les poissons sont caractérisés par une diversité d'espèces très importante. Pour comprendre la complexité des mécanismes d'altération, il faut ajouter à cette variabilité des substrats l'hétérogénéité des microflore bactériennes dont la composition est essentiellement liée à l'origine des poissons et à leur environnement. Les premiers changements survenant *post mortem* dans le poisson sont dus aux enzymes tissulaires et digestives et à l'oxydation des lipides, c'est ensuite le développement bactérien qui est le responsable essentiel de la dégradation du poisson. L'altération met en jeu un ensemble de processus microbiologiques, chimiques et physiques. Plusieurs approches permettent d'évaluer le niveau d'altération ou de fraîcheur du poisson. Elles sont d'ordre sensoriel, microbiologique et chimique.

La fraîcheur étant le paramètre déterminant de la qualité sanitaire du poisson, son évaluation objective est essentielle. Dans ce contexte, le travail de cette thèse porte sur la mise en place d'un outil performant pour déterminer précisément la qualité des poissons de manière fiable et objective dès les premiers stades d'altération.

Dans un premier temps, l'état des connaissances sur la qualité en général du poisson du fait de sa composition particulière (chapitre I) sera présenté, ainsi que les changements (sensoriels, autolytiques, microbiologiques, lipidiques) post-mortem du poisson influençant sa qualité (chapitre II). Dans un second temps, les différentes méthodes (sensorielle, physique, microbiologique, chimique et biochimique) de caractérisation de la qualité du poisson (chapitre III) seront passées en revue. Par rapport à toutes ces méthodes déjà mises en place qui ont leurs qualités et leurs limites, nous avons décidé de développer l'étude des composés volatils de la chair du poisson parallèlement à des analyses sensorielles pour

caractériser la qualité du poisson. Une description détaillée sera exposée sur les composés volatils (chapitre IV) du poisson incluant leurs rôles sur le développement de l'arôme et de l'odeur du poisson, leurs structures, leurs fonctions chimiques et leurs provenances. Seront présentées d'autre part les différentes méthodes d'analyse des composés volatils (méthodes d'extraction et outils analytiques). Dans ce même chapitre notre démarche d'étude des composés volatils sera développée : méthode d'extraction et d'analyse utilisée. Enfin la démarche de l'analyse statistique des résultats (chapitre V) sera présentée pour identifier des indicateurs potentiels de qualité (fraicheur et altération) et pour créer un modèle de prédiction de la qualité.

Les résultats des travaux de thèse seront ensuite présentés en plusieurs parties à l'aide d'articles scientifiques.

La première partie présentera une étude préliminaire montrant les résultats obtenus avec l'utilisation d'une méthode d'extraction et d'analyse des composés volatils de différents poissons (merlan, limande sole, maquereau et grande vive) mise en place au sein du laboratoire de l'ANSES (ex AFSSA) de Boulogne sur mer. A partir de ces résultats, une démarche statistique a été utilisée pour caractériser de potentiels marqueurs de qualité du poisson. Ces études ont été valorisées sous forme d'une publication avec l'analyse des composés volatils du merlan.

La seconde partie décrira l'optimisation de la méthode d'extraction « Headspace Static – Solid Phase Micro Extraction (HS-SPME) » et de l'outil analytique « Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) » des composés volatils de la chair du poisson à partir de la méthode existante. A partir de cette optimisation, une étude sera présentée sur les composés volatils de diverses espèces de poissons frais « bar commun, dorade royale, cabillaud, saumon » avec une analyse statistique permettant d'aboutir à un modèle de prédiction de la qualité du poisson. Dans ce même chapitre, une autre méthode d'analyse sera exposée « Dynamic Headspace – Purge and Trap (DH) » suivie d'une chromatographie gazeuse couplée à la fois à une spectrométrie de masse mais aussi à de l'olfactométrie (GC-MS/80). Ce volet fait l'objet d'une collaboration avec l'équipe de recherche de l'INRA de Clermont Ferrand / Theix sous la direction du Dr Jean Louis Berdagué où nous sommes intéressés aux odeurs du poisson.

La troisième partie sera consacrée à l'application de la méthode d'analyse des composés volatils en HS-SPME-GC-MS pour différencier : dans un premier temps un produit frais d'un produit ayant subi une congélation - décongélation et dans un second temps des crevettes cuites tropicales bioconservées ou non en collaboration avec l'Ifremer de Nantes.

La dernière partie de cette thèse présentera une synthèse des conclusions de ces travaux et des perspectives à venir.

Chapitre I : La qualité du poisson

La composition globale dans la plupart des poissons et crustacés est principalement de l'eau, des protéines et des lipides. Dans la chair du poisson, ces constituants représentent environ 98%, et les autres constituants mineurs comprennent les glucides, les vitamines et les minéraux (Sikorski, Lolakowska *et al.* 1990). Cependant, la composition chimique du poisson varie généralement selon les saisons, les zones géographiques, les stades de maturité et la taille. La composition spécifique du poisson lui donne une qualité nutritionnelle et sensorielle que recherchent et apprécient les consommateurs.

1. Les lipides

Les lipides de poisson se distinguent des lipides d'autres animaux ou de végétaux par leur forte teneur en acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série des oméga 3, notamment les acides eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA). Ces acides gras possèdent des propriétés nutritionnelles recherchées et sont impliqués dans la prévention des maladies cardiovasculaires, cancéreuses et inflammatoires (Rose and Connolly 1999; Kamal-Eldin and Yanishlieva 2002).

1.1 Sites des dépôts lipidiques

Chez le poisson, il existe plusieurs sites de dépôts lipidiques dont les principaux sont le foie, le muscle, le tissu adipeux périviscéral et le tissu adipeux sous cutané (Sheridan 1988). Cette répartition peut varier selon les espèces. La composition en lipides est un critère pratique de distinction des poissons.

Tableau I : Distinction de différentes espèces de poissons en fonction de leur teneur en lipides dans les muscles (en g de lipides pour 100g de muscle). D'après Ackman (1994).

Poissons maigres (< 2 %)	Poissons à taux intermédiaires (4-8 %)	Poissons gras (> 8 %)
Cabillaud	Limande	Sardine
Lieu noir	Turbot	Maquereau
Merlan	Sole	Saumon

Les poissons maigres stockent principalement la matière grasse dans le foie (40 à 70 %); les muscles de ces poissons sont pauvres en lipides (5 %). Les poissons gras stockent une forte quantité des lipides au niveau musculaire. La teneur la plus élevée se situe vers la tête et diminue vers la queue et inversement pour les poissons maigres. En effet, la part de lipides présente dans les muscles, plus de 10 % des lipides totaux, est supérieure à celle trouvée dans le foie. Les graisses sont sous forme de globules gras extracellulaires dans les muscles et forment des couches sous la peau et dans la cavité abdominale (Corraze and Kaushik 1999). Les poissons à teneur en lipides intermédiaire sont généralement des poissons plats qui accumulent leurs graisses dans le foie mais aussi dans leurs muscles et dans d'autres tissus tels que le tissu adipeux périviscéral.

La teneur en lipides des muscles dépend de la nature du muscle considéré. Pour les poissons maigres, les muscles rouges contiennent environ deux fois plus de lipides que les muscles blancs. Pour les poissons gras comme le maquereau (*Scomber australicus*), la teneur en lipides du muscle rouge atteint 19,6 g de lipides pour 100 g de muscle et celle du muscle blanc est de 3,9 g pour 100 g de muscle (Body and Vlieg 1989).

La peau peut contenir de fortes quantités de graisses selon les espèces, jusqu'à 50 g de lipides pour 100 g de peau chez le maquereau. Les poissons gras, selon la saison, peuvent également présenter une importante couche de graisse sous-cutanée. La partie ventrale entourant la cavité viscérale et les tissus abdominaux sont généralement riches en lipides.

1.2 Nature des lipides

La teneur et la composition lipidique des poissons varient avec l'âge, le cycle sexuel, l'alimentation et les facteurs environnementaux tels que la température et la salinité de l'eau (Corraze and Kaushik 1999).

Les lipides des muscles des poissons maigres contiennent des triglycérides (35 % des lipides totaux) et une forte proportion de phospholipides (65 %) intimement associés aux protéines car constitutifs des membranes cellulaires.

Dans le groupe des poissons gras, la teneur en lipides des muscles varie de 1 à 25 g pour 100 g de muscle. Les lipides sont surtout constitués de lipides neutres, essentiellement des triglycérides. Les diglycérides et monoglycérides étant essentiellement issus de l'hydrolyse des triglycérides au sein du muscle sont présents en très faibles quantités. Les divers acides gras sont répartis d'une manière très hétérogène conduisant ainsi à une grande variété d'espèces moléculaires de triglycérides. Cependant, la répartition entre la position 2 et les positions 1 et 3 du glycérol est régie par la longueur des chaînes et l'insaturation : les acides gras les plus insaturés ou à plus courte chaîne occupent préférentiellement la position 2.

Les lipides polaires, essentiellement des phospholipides, représentent de 10 à 20 g/100 g de lipides totaux. Ils jouent un rôle structural et fonctionnel dans les membranes cellulaires. Ils sont essentiellement représentés par la phosphatidyléthanolamine (plus de 30 % des phospholipides totaux), et la phosphatidylcholine (plus de 50 % des phospholipides totaux). Ces phospholipides contiennent généralement de fortes proportions d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne.

Le stéroïde le plus répandu est le cholestérol, sa teneur varie également en fonction des saisons ; pour le maquereau elle peut varier de 36,5 mg/100 g de chair en août à 61,9 mg/100 g en juin (Krzynowek, Murphy *et al.* 1990).

2. Les protéines

Les protéines des tissus musculaires du poisson peuvent être divisées en trois groupes :

- les protéines structurelles (actine, myosine, tropomyosine et actomyosine), qui constituent de 70 à 80 % de la teneur totale en protéines (comparée à 40 % chez les mammifères). Ces protéines sont solubles dans des solutions salines de force ionique relativement élevée (0,5 M),
- les protéines sarcoplasmiques (myoalbumine, globuline et enzymes) qui sont solubles dans des solutions salines neutres de force ionique faible (< 0,15M). Cette fraction représente de 25 à 30 % des protéines,
- les protéines du tissu conjonctif (collagène) qui constituent environ 3 % des protéines chez les téléostéens et environ 10 % chez les sélaciens (comparé à 17 % chez les mammifères).

Les protéines structurelles constituent le système contractile responsable du mouvement des muscles. La composition en acides aminés est approximativement la même que pour les protéines correspondantes dans le muscle des mammifères bien que les propriétés physiques puissent être légèrement différentes.

La majorité des protéines sarcoplasmiques sont des enzymes participant au métabolisme de la cellule, comme la transformation anaérobie de l'énergie du glycogène en ATP. Si les organites à l'intérieur des cellules musculaires sont rompus, cette fraction de protéine peut également contenir les enzymes métaboliques situées à l'intérieur du réticulum endoplasmique, des mitochondries et des lysosomes.

Les protéines dans la fraction sarcoplasmique conviennent pour différencier entre espèces de poisson car chacune développe un profil électrophorétique caractéristique quand elle est séparée par électrophorèse. La méthode a été présentée par Lundstrom (1980) et a été utilisée par de nombreux laboratoires et pour de nombreuses espèces de poissons.

Les propriétés chimiques et physiques des protéines de collagène sont différentes dans les tissus tels que la peau, la vessie natatoire et le myocomme dans le muscle (Mohr, 1971). En général, les fibrilles de collagène forment une structure délicate en réseau avec une complexité variable dans les tissus conjonctifs suivant un schéma similaire à celui trouvé chez les mammifères. Cependant dans le poisson, le collagène est bien plus instable à la

chaleur et contient moins de liaisons croisées que le collagène des vertébrés à sang chaud. Le taux d'hydroxyproline est en général plus bas chez les poissons que chez les mammifères, bien que l'on ait pu observer une variation totale de 4,7 à 10 % du collagène (Braekkan 1976; Sato, Yoshinaka *et al.* 1989).

Les protéines du poisson renferment tous les acides aminés essentiels et comme les protéines du lait, des œufs et de la viande, ont une très haute valeur biologique (Tableau II).

Tableau II : Pourcentage d'acides aminés essentiels de différentes protéines

Acide aminé	Poisson	Lait	Boeuf	Oeuf
Lysine	8,8	8,1	9,3	6,8
Tryptophane	1,0	1,6	1,1	1,9
Histidine	2,0	2,6	3,8	2,2
Phénylalanine	3,9	5,3	4,5	5,4
Leucine	8,4	10,2	8,2	8,4
Isoleucine	6,0	7,2	5,2	7,1
Thréonine	4,6	4,4	4,2	5,5
Méthionine-cystéine	4,0	4,3	2,9	3,3
Valine	6,0	7,6	5,0	8,1

Valeur biologique, source : Braekkan (1976)

Le poisson est une excellente source d'acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) et peut par conséquent, améliorer de façon significative la valeur biologique dans des régimes basés essentiellement sur les céréales.

3. Les glucides

Les glucides peuvent aussi être divisés en trois groupes : les sucres (mono- et disaccharides), les oligosaccharides (3 à 9 monosaccharides), et les polysaccharides (plus de 9). La teneur en glucides dans le muscle du poisson est faible (Mendel, Kemp *et al.* 1954; Schulz, Liese *et al.* 2005) et est influencée par les conditions de capture, qui peut conduire à l'épuisement des réserves de glycogène et ainsi à une diminution du niveau de glucide. Dans les conditions anoxiques post mortem, le glycogène continu d'être métabolisé, résultant de l'augmentation de l'acide lactique avec l'abaissement du pH.

4. Les extraits azotés non protéiques

Les extraits azotés peuvent être définis comme étant des composés de nature non protéique, solubles dans l'eau, de poids moléculaires faibles et renfermant de l'azote. Cette fraction ANP (azote non protéique) constitue de 9 à 18 % de l'azote dans les téléostéens.

Les composants principaux de cette fraction sont des bases volatiles telles que l'ammoniaque et l'oxyde de triméthylamine (OTMA), la créatine, les acides aminés libres, les bases nucléotides et bases puriques et, dans le cas des poissons cartilagineux, l'urée.

Le tableau III ci-dessous donne une liste de quelques composants de la fraction ANP de différents poissons et des viandes de volaille et de mammifères.

Tableau III : Principales différences dans les extraits de muscles

Constituant en mg/ 100g poids humide ¹	Poisson		Crustacés		Volaille	Muscle de mammifère
	Cabillaud	Hareng	Requin	Homard	Muscle de la cuisse	
Extrait total	1200	1200	3000	5500	1200	3500
Acides aminés libres :						
Totaux	75	300	100	3000	440	350
Arginine	<10	<10	<10	750	<20	<10
Glycine	20	20	20	100-1000	<20	<10
Acide glutamique	<10	<10	<10	270	55	36
Histidine	<1,0	86	<1,0	---	<10	<10
Proline	<1,0	<1,0	<1,0	750	<10	<10
Créatine	400	400	300	0	---	550
Bétaïne	0	0	150	100	---	---
Oxyde de triméthylamine	350	250	500-1000	100	0	0
Ansérine	150	0	0	0	280	150
Carnosine	0	0	0	0	180	200
Urée	0	0	2000	---	---	35

¹ L'unité dans ce tableau indique le poids moléculaire total du constituant (Shewan 1974).

La composition de la fraction ANP varie d'une espèce à l'autre mais également au sein d'une même espèce suivant la taille, la saison, l'échantillon de muscle.

L'OTMA constitue une part importante et caractéristique de la fraction ANP dans les espèces marines et mérite plus d'attention. Ce composant se trouve dans toutes les espèces de poissons marins, à des taux variant de 1 à 5% du tissu musculaire (poids net) mais est pratiquement absent chez les poissons d'eau douce et les organismes terrestres (Anderson and Fellers 1952; Hebard, Flick *et al.* 1982). Une exception dans la perche du Nil et le tilapia a été trouvée où jusqu'à 150 à 200 mg d'OTMA/100 g de poisson frais a été mesuré. Stroem, Olafsen *et al.* (1979) ont montré que l'OTMA est formé par biosynthèse dans certaines

espèces de zooplancton. Ces organismes possèdent une enzyme (TMA mono-oxygénase) qui oxyde la triméthylamine (TMA) en OTMA. La TMA se trouve généralement dans les plantes marines de même que de nombreuses autres amines méthylées (monométhylamine et diméthylamine). Les poissons qui mangent du plancton peuvent obtenir leur OTMA en se nourrissant de zooplancton (origine exogène).

Le système TMA-oxydase est localisé dans les microsomes des cellules et utilise la présence de phosphate nicotinamide adénine dinucléotide (NADPH):

Il est surprenant que cette mono-oxygénase puisse être répandue largement chez les mammifères (où une hypothèse évoque qu'elle fonctionne comme un détoxifiant) alors que la plupart des poissons ne présentent qu'une activité très faible ou indécélable de cette enzyme. Des recherches japonaises (Kawabata 1953) montrent qu'il existe un système de réduction de l'OTMA dans le muscle rouge de certains pélagiques. La quantité d'OTMA dans le tissu musculaire dépend de l'espèce, de la saison, et des zones de pêche. En général, le taux le plus élevé est rencontré dans les sélaciens et les céphalopodes (de 75 à 250 mg N/100 g); les cabillauds ont un taux intermédiaire (de 60 à 120 mg N/100 g) tandis que les poissons plats et les pélagiques ont des taux plus faibles. Une vaste compilation de données est fournie par Hebard, Flick *et al.* (1982). Selon Tokunaga (1970), les poissons pélagiques (sardine, thon, maquereau) ont leurs concentrations la plus forte en OTMA dans le muscle rouge alors que les poissons démersaux à chair blanche ont un pourcentage bien plus important dans le muscle blanc.

Chez les sélaciens, l'OTMA jouerait un rôle d'osmorégulation et il a été démontré que le transfert de petites raies dans un mélange d'eau douce et d'eau de mer (1:1) produisait une réduction de 50% de l'OTMA intracellulaire. Le rôle de l'OTMA chez les téléostéens est plus incertain.

Quantitativement le principal constituant de la fraction ANP est la créatine. Dans un poisson au repos, la plus grande partie de la créatine est phosphorylée et fournit de l'énergie pour la contraction musculaire.

La fraction ANP contient également une teneur assez importante en acides aminés libres. Ceux-ci représentent 630 mg/100 g de muscle blanc dans le maquereau (*Scomber scombrus*), de 350 à 420 mg/100 g dans le hareng (*Clupea harengus*) et de 310 à 370 mg/100 g dans le

capelan (*Mallotus villosus*). L'importance relative de ces acides aminés varie selon les espèces. La taurine, l'alanine, la glycine et les acides aminés contenant l'imidazole semblent prédominer dans la plupart des poissons. Parmi ces acides aminés à noyau imidazole, l'histidine a beaucoup attiré l'attention car elle peut être microbiologiquement décarboxylée en histamine. Les espèces actives à chair rouge comme le thon et le maquereau ont une forte teneur en histidine.

5. Les vitamines et sels minéraux

La teneur en vitamines et sels minéraux est spécifique aux espèces et peut, de plus, varier selon la saison. En général, la chair du poisson est une bonne source de vitamines B et également, dans le cas des espèces grasses, de vitamines A et D. Quelques espèces d'eau douce comme la carpe ont une grande activité thiaminase et, de ce fait, leur teneur en thiamine est généralement basse. En ce qui concerne les éléments minéraux, la chair du poisson est considérée comme une source appréciable de calcium et de phosphore en particulier mais également de fer, cuivre et sélénium. Les poissons d'eau de mer ont une forte teneur en iode. Les tableaux IV et V donnent une liste des teneurs en vitamines et en éléments minéraux. A cause de la variation naturelle de ces éléments, il est impossible de donner des chiffres exacts.

Tableau IV : Vitamines du poisson

Poisson	A (UI/g)	D (UI/g)	B ₁ (thiamine) (mg/g)	B ₂ (riboflavine) (mg/g)	Niacine (mg/g)	Acide pantothénique (mg/g)	B ₆ (mg/g)
Filet de cabillaud	0-50	0	0,7	0,8	20	1,7	1,7
Filet de hareng	20-400	300-100	0,4	3,0	40	10	4,5
Huile de foie de morue	200-10000	20-300	---	3,4	15	4,3	---

Tableau V : Quelques minéraux présents dans le muscle du poisson

Élément	Moyenne (mg/100g)	Intervalle (mg/100g)
Sodium	72	30-134
Potassium	278	19-502
Calcium	79	19-881
Magnésium	38	4,5-452
Phosphore	190	68-550

La teneur en vitamines est comparable à celle des mammifères sauf pour les vitamines A et D que l'on trouve en grandes quantités dans la chair des espèces grasses et en abondance dans le foie de certaines espèces comme le cabillaud et le flétan.

Dans le poisson d'aquaculture, les taux de vitamines et de sels minéraux sont censés refléter la composition en éléments entrant dans la nourriture du poisson bien que les données relevées doivent être interprétées avec beaucoup de précautions (Maage, Julshamn *et al.* 1991). Pour protéger les acides gras polyinsaturés oméga 3, considérés comme très importants pour la santé tant du poisson que de l'homme, la vitamine E a été ajoutée dans l'aliment du poisson en tant qu'antioxydant. Il a été démontré que le niveau de vitamine E dans les tissus du poisson correspondait à sa concentration dans son alimentation (Waagbø, Sandnes *et al.* 1993).

Chapitre II : Les changements post-mortem du poisson influençant la qualité

Après la mort, la qualité initiale du poisson se modifie. Plusieurs mécanismes, qui sont répertoriés dans ce chapitre, se produisent et engendrent la détérioration du poisson.

1. Les changements sensoriels

Les changements sensoriels sont ceux perçus par les sens, c'est-à-dire : apparence, odeur, texture et goût. Les premières modifications sensorielles du poisson pendant le stockage concernent l'apparence et la texture. Le goût caractéristique des espèces se développe normalement pendant les deux premiers jours de la conservation sous glace.

Le changement le plus important est l'établissement de la *rigor mortis*. Immédiatement après la mort, le muscle est totalement détendu et la texture élastique et souple dure habituellement quelques heures, après quoi le muscle se contracte. Quand il durcit, le corps se raidit et le poisson est alors en état de *rigor mortis*. Cet état dure habituellement un jour ou plus et alors la *rigor* disparaît, ce qui détend le muscle à nouveau et le rend souple mais il n'est plus aussi élastique qu'avant la *rigor*. Le rapport entre l'apparition et la disparition de la *rigor* varie d'une espèce à l'autre et est affecté par la température, la manutention, la taille et la condition physique du poisson.

Il est admis généralement que l'apparition et la durée de la *rigor mortis* sont plus rapides à température élevée mais des observations, surtout sur le poisson tropical, ont montré un effet inverse de la température sur l'apparition de la *rigor*. Il est évident que, dans ces espèces, l'apparition de la *rigor* est accélérée à 0°C par rapport à 10°C, ce qui correspond bien à une stimulation des changements biochimiques à 0°C (Poulter, Curran *et al.* 1982; Iwamoto, Yamanaka *et al.* 1987). Cependant Abe and Okuma (1991) ont fourni une explication à ce phénomène en démontrant que l'apparition de la *rigor mortis* chez la carpe (*Cyprinus carpio*) dépend de la différence entre la température de l'eau et celle du stockage. Quand la différence est importante, le délai entre la mort et l'apparition de la *rigor* est court et vice versa.

La *rigor mortis* s'installe immédiatement ou très rapidement après la mort quand le poisson est affamé et que les réserves de glycogène sont épuisées ou si le poisson est fatigué.

Outre l'apparition de la *rigor mortis*, les changements sensoriels du poisson et donc de sa qualité est surtout lié aux changements autolytiques, bactériologiques et lipidiques.

2. Les altérations autolytiques

Il a été établi, depuis de nombreuses années, qu'il existe au moins deux types d'altération du poisson : bactérienne et enzymatique. Uchiyama and Ehira (1974) ont montré que dans le cabillaud et l'albacore, les changements enzymatiques affectant la fraîcheur du poisson précédaient les changements de qualité microbiologique et étaient sans rapport avec ceux-ci. Dans certaines espèces (encornets, harengs), les altérations enzymatiques précèdent et par conséquent dominant la détérioration du poisson réfrigéré. Chez d'autres espèces, l'autolyse contribue, à des degrés différents, à l'altération de la qualité et s'ajoute au processus de dégradation microbienne.

2.1 Production d'énergie post mortem dans le muscle

Au moment de la mort du poisson, l'apport d'oxygène dans le muscle est interrompu du fait que le sang n'est plus pompé par le cœur et ne circule plus au travers des branchies où il est enrichi en oxygène, dans le poisson vivant. Du fait qu'il n'y a plus d'oxygène disponible pour une respiration normale, la production d'énergie à partir d'aliments ingérés est très réduite. Le glycogène ou la graisse sont oxydés ou "brûlés" par les enzymes des tissus dans une série de réactions qui, en phase ultime, produisent du gaz carbonique (CO₂), de l'eau et un composé organique riche en énergie, l'adénosine triphosphate (ATP). Ce type de respiration se réalise en deux étapes: l'une anaérobie et l'autre aérobie. Cette dernière dépend de la présence continue d'oxygène (O₂) qui ne peut provenir que du système circulatoire. La plupart des crustacés sont capables de respirer hors de l'élément aquatique en absorbant l'oxygène atmosphérique pendant de courtes périodes.

Dans des conditions d'anaérobiose, l'ATP peut être synthétisée selon deux autres voies importantes à partir de la créatine phosphate ou de l'arginine phosphate. La première source d'énergie est réservée aux muscles des vertébrés (téléostéens) tandis que la dernière

est caractéristique de quelques invertébrés comme les céphalopodes (encornets et poulpes). Dans les deux cas, la production d'ATP cesse quand la créatine ou l'arginine phosphates sont épuisées. Il est intéressant de noter que l'octopine est le produit final du métabolisme anaérobie des céphalopodes. Elle n'est pas acide (contrairement au lactate) et, de ce fait, tout changement de pH post mortem dans ces animaux n'est pas relié à la production d'acide lactique à partir du glycogène.

Pour la plupart des poissons téléostéens, la glycolyse est la seule voie possible de production d'énergie après l'arrêt du cœur. Ce procédé particulièrement inefficace a essentiellement comme produits finaux les acides lactiques et pyruvique. De plus, la glycolyse produit de l'ATP, mais seulement 2 moles pour chaque mole de glucose oxydé comparée aux 36 moles d'ATP produites pour chaque mole de glucose si les produits finaux glycolytiques sont oxydés en aérobose dans le mitochondrion de l'animal vivant. Ainsi, après la mort, le muscle anaérobie ne peut pas maintenir son niveau normal d'ATP et, quand le niveau intracellulaire décline de 7 à 10 mmol/g à 1.0 mmol/g de tissu, le muscle entre en *rigor mortis*. La glycolyse post mortem provient de l'accumulation d'acide lactique qui à son tour abaisse le pH du muscle. Dans le cabillaud, le pH diminue de 6,8 à un pH final de 6,1 à 6,5. Chez certaines espèces de poissons, le pH final peut être plus bas : dans les gros maquereaux, le pH final de *rigor* peut être aussi bas que 5,8-6,0. Il peut même atteindre 5,4-5,6 dans le thon et le flétan. Cependant, des niveaux de pH aussi bas ne sont pas courants dans les téléostéens marins. Ces pH sont rarement aussi bas que ceux observés post mortem dans les muscles des mammifères. Par exemple, le muscle de boeuf atteint souvent des niveaux de pH de 5,1 au moment de la *rigor mortis*. La quantité d'acide lactique produite est en rapport avec la quantité de glucide (glycogène) accumulée dans le tissu vivant. En général, le muscle de poisson contient un taux assez faible de glycogène comparé aux mammifères et donc il se forme bien moins d'acide lactique après sa mort. Son état nutritionnel, le stress et la fatigue avant la mort auront également un impact important sur les niveaux du glycogène stocké et par la suite sur le pH final post mortem. En règle générale, un poisson bien reposé et bien nourri contiendra plus de glycogène qu'un poisson épuisé. Une étude sur la loche japonaise (Chiba, Hamaguchi *et al.* 1991) a montré que quelques minutes seulement de stress avant capture produisaient une baisse de 0,50 unités de pH en trois heures alors que, dans un poisson qui ne s'est pas débattu, le pH diminuait uniquement de 0,10 unités dans le même

temps. Les mêmes auteurs ont également montré que la saignée du poisson réduisait de façon significative la production post mortem d'acide lactique.

La réduction du pH post mortem du muscle du poisson affecte les propriétés physiques du muscle. Quand le pH chute, la charge nette des protéines musculaires est réduite, causant leur dénaturation partielle et la perte d'une partie de leur capacité de rétention d'eau. Le tissu musculaire, en état de *rigor mortis*, perd son humidité à la cuisson et est particulièrement inapte à un traitement ultérieur par la chaleur, du fait de sa dénaturation par la chaleur qui augmente la perte d'eau. Celle-ci a un effet néfaste sur la texture du muscle du poisson et Love (1975) a montré qu'il y a un rapport inverse entre la dureté du muscle et le pH, des niveaux de dureté inacceptables (accompagnés de pertes d'eau à la cuisson) se produisant à des niveaux très faibles de pH.

2.2 Autolyse et catabolisme de nucléotide

La *rigor mortis* survient quand le niveau de l'ATP dans le muscle chute à 1,0 mmole/g. L'ATP n'est pas seulement une source d'énergie puissante nécessaire à la contraction musculaire chez l'animal vivant mais elle agit également comme agent plastifiant. La contraction musculaire en soi est contrôlée par le calcium et une enzyme l'ATP-ase que l'on trouve dans chaque cellule musculaire. Quand les niveaux intracellulaires de Ca^{2+} sont $> 1mM$, l'ATP-ase activée par le Ca^{2+} réduit la quantité de l'ATP musculaire libre, ce qui conduit à l'interaction entre les principales protéines contractiles, l'actine et la myosine. Ceci produit finalement la contraction du muscle, le rendant dur et inextensible. Un poisson en état de *rigor mortis* ne peut normalement pas être fileté ou traité car la carcasse est trop raide pour être manipulée et est souvent déformée, rendant impossible le traitement mécanique.

La disparition de la *rigor* est un processus qui n'a pas encore été entièrement élucidé mais qui produit toujours le ramollissement (détente) du tissu musculaire. Elle serait reliée à l'activation d'une ou de plusieurs enzymes naturelles du muscle, digérant certains composants du complexe de *rigor mortis*. Le ramollissement du muscle durant la résolution de la *rigor* (et éventuellement les processus d'altération) coïncide avec les changements autolytiques. Une des premières modifications qu'on décèle est la dégradation des composés reliés à l'ATP de manière plus ou moins prévisible après la mort. La figure 1 illustre la dégradation de l'ATP pour former l'adénosine diphosphate (ADP), l'adénosine

monophosphate (AMP), l'inosine monophosphate (IMP), l'inosine (Ino) et l'hypoxanthine (Hx). La dégradation des catabolites de l'ATP s'effectue de la même manière dans la plupart des poissons, mais la vitesse de chaque réaction individuelle (d'un catabolite à l'autre) varie beaucoup d'une espèce à l'autre et elle coïncide souvent avec le niveau perceptible de la dégradation déterminé par des analystes entraînés. Saito, Arai *et al.* (1959) ont été les premiers à observer ce schéma et à développer une formule pour la fraîcheur du poisson basée sur ces changements autolytiques :

$$K\% = \frac{[Ino] + [Hx]}{[ATP] + [ADP] + [AMP] + [IMP] + [Ino] + [Hx]} \times 100$$

[ATP], [ADP], [AMP], [IMP], [Ino] et [Hx] représentent les concentrations relatives de ces composants dans le muscle du poisson, mesurées à différentes périodes pendant la conservation au froid.

Le paramètre K ou indice de "fraîcheur" donne une estimation de fraîcheur relative basée principalement sur les altérations autolytiques qui se produisent pendant la conservation post mortem du muscle. Par conséquent, plus la valeur de K est élevée, plus le niveau de fraîcheur est bas. Malheureusement, certaines espèces de poissons comme le cabillaud d'Atlantique atteignent une valeur maximum de K de loin supérieure à la durée de conservation déterminée par des juges entraînés. De ce fait, K n'est pas considéré une valeur fiable en tant qu'indicateur de fraîcheur pour tous les poissons de mer. De même, la dégradation des catabolites de nucléotides n'est qu'une coïncidence dans les changements perceptibles de la fraîcheur et n'est pas reliée nécessairement à la cause de la détérioration de la fraîcheur, du fait que l'on considère que seul l'Hx aurait un effet direct sur l'arrière-goût amer du poisson altéré (Hughes and Jones 1966). Aujourd'hui, il est considéré généralement que l'IMP est responsable du goût recherché de poisson frais qui n'existe que dans les produits de la mer de première qualité. Aucun des catabolites de nucléotides n'est considéré comme ayant un rapport avec les changements perceptibles de texture pendant le processus autolytique excepté bien sûr l'ATP dont la perte est associée à la *rigor mortis*.

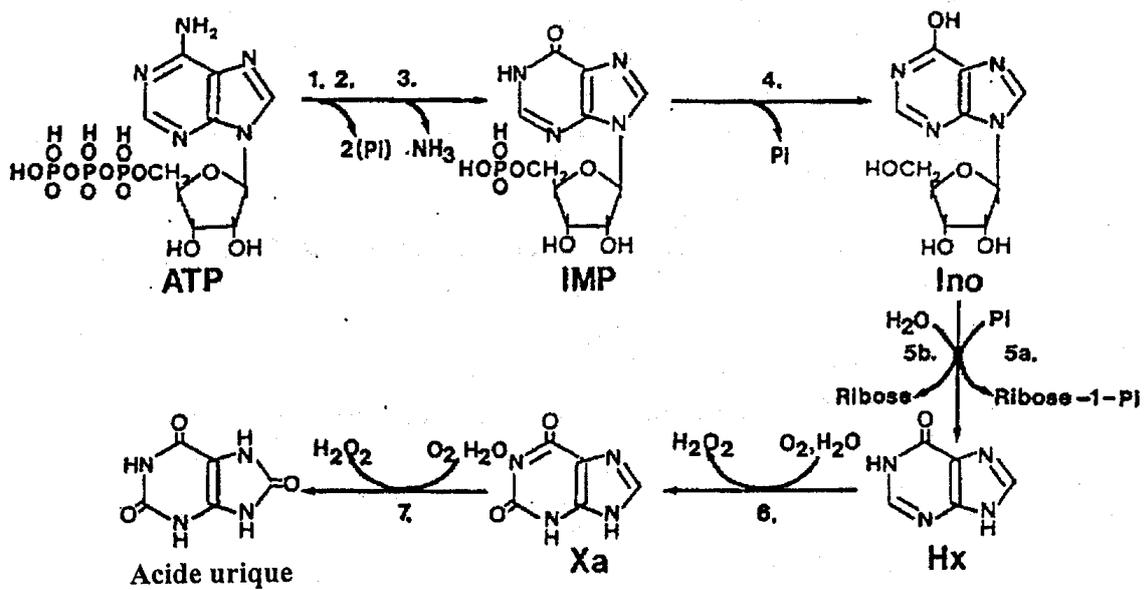


Figure 1 : Dégradation post mortem de l'ATP dans le muscle de poisson. Les enzymes comprennent: 1. ATP-ase; 2. Myokinase; 3. AMP désaminase; 4.IMP phosphohydrolase; 5a. Nucléoside phosphorylase; 5b. Inosine nucléosidase; 6,7. Xanthine oxydase. Source : Gill (1992)

Plusieurs méthodes rapides ont été mises au point pour déterminer les catabolites de nucléotides individuels ou des combinaisons incluant l'indice de fraîcheur.

2.3 Autolyses et enzymes protéolytiques

De nombreuses protéases ont été isolées des muscles du poisson et les effets de la dégradation protéolytique sont souvent reliés à un ramollissement considérable du tissu. Un des effets les plus notables de la protéolyse autolytique est peut-être l'éclatement de l'abdomen chez les espèces pélagiques (poissons gras) comme le hareng et le capelan. L'autolyse accélérât le développement des bactéries d'altération en fournissant un environnement favorable à leurs croissances (Aksnes and Brekken 1988).

Botta, Kennedy *et al.* (1992) ont trouvé que l'autolyse de la cavité viscérale (éclatement abdominal) des harengs était d'avantage reliée à la manutention physique qu'à des facteurs biologiques comme la taille du poisson, les aliments dans les viscères ou la quantité de rogne. En particulier, pour le hareng, les opérations de congélation et décongélation, le temps de décongélation à $15^{\circ}C$ et le temps de stockage sous glace influent plus sur l'éclatement abdominal que les facteurs biologiques.

2.3.1 Cathepsines

Les cathepsines sont des protéases "acides" habituellement rassemblées dans des organites appelées lysosomes. Dans le tissu vivant, les protéases lysosomiques sont responsables de la dégradation des protéines aux endroits lésés. Les cathepsines sont pour la plupart inactives dans les tissus vivants mais sont libérées dans les jus des cellules à la suite d'accidents physiques ou de congélation - décongélation post mortem du muscle.

Les cathepsines D et L jouent un rôle majeur dans la dégradation autolytique des tissus du poisson du fait que la plupart des autres cathepsines ont une plage d'activité étroite de pH bien trop basse pour être significative physiologiquement.

2.3.2 Calpaines

Un second groupe de protéases intracellulaires appelées "calpaines" ou "calcium activated factor" (CAF) a été associé à l'autolyse du muscle du poisson; retrouvée dans les viandes, les poissons à nageoires et les crustacés. Il est connu depuis près d'un siècle que la tendreté, probablement le critère le plus important pour la qualité de la viande rouge, est associée à sa maturation post mortem. Les calpaines seraient les premières responsables de l'autolyse post mortem de la viande par la digestion des protéines en Z des myofibrilles. Ces calpaines sont des endopeptidases intracellulaires nécessitant cystéine et calcium. La plupart des calpaines sont actives au pH physiologique et il paraît donc raisonnable de suspecter leur importance dans le ramollissement du poisson pendant la conservation au froid. Alors que la dureté est rarement un problème dans du poisson non congelé, le ramollissement par autolyse est un sérieux problème diminuant sa valeur commerciale.

Les calpaines du poisson digèrent la myosine (particulièrement la myosine à chaîne longue) pour former un fragment initial avec un poids moléculaire d'environ 150 000 Da (Muramoto, Yamamoto *et al.* 1989). Les mêmes auteurs ont démontré que les calpaines du poisson sont nettement plus actives à basse température que ne le sont les calpaines de mammifères, et que les vitesses de dégradation dépendent de l'espèce, étant très élevés dans le cas des myosines les plus sensibles à la chaleur. De ce fait, les espèces de poisson adaptées aux environnements plus froids sont plus sensibles à l'autolyse par les calpaines que les espèces provenant des eaux tropicales. Bien que des calpaines ont été identifiées dans plusieurs espèces de poisson y compris la carpe (Toyohara, Makinodan *et al.* 1985), le tilapia et la

crevette (Wang, Ma *et al.* 1993) ainsi que le thon, le maigre, la dorade rose et la truite (Muramoto, Yamamoto *et al.* 1989) pour ne citer que celles-là, à ce jour peu de travaux ont été réalisés pour démontrer une relation de cause à effet entre l'activité des calpaines et la texture telle que mesurée par voie instrumentale.

2.3.3 Collagénases

Jusqu'à présent, tous les changements autolytiques post mortem décrits ont concerné les changements à l'intérieur de la cellule musculaire elle-même. Cependant la chair des poissons téléostéens est divisée en blocs de cellules musculaires séparées en lamelles ou myotomes par un tissu conjonctif appelé myocomme. Chaque cellule musculaire ou fibre est enveloppée d'un tissu conjonctif qui se fixe au myocomme, aux extrémités des cellules, au moyen de fines fibrilles de collagène. Pendant la conservation au froid, ces fibrilles se détériorent (Bremner and Hallett 1985). Des mesures instrumentales de la texture du muscle de truite réfrigérée diminuaient quand la quantité de collagène de type V était solubilisée, sans doute du fait de l'action autolytique des enzymes collagénases autolytiques (Sato, Ohashi *et al.* 1991). Ce sont ces enzymes qui produisent le "clivage" ou la destruction du myotome durant la conservation de longue durée sous glace ou de brève durée à haute température. Pour le cabillaud de l'Atlantique, lorsque l'on atteint 17°C, le clivage est inévitable, sans doute à cause de la dégradation du tissu conjonctif et de la contraction rapide du muscle due à une *rigor* à haute température.

2.4 Altérations autolytiques pendant la conservation du poisson congelé

La réduction de l'oxyde triméthylamine (OTMA), un composé osmorégulateur dans de nombreux poissons téléostéens marins, est habituellement due à l'action bactérienne. Mais, dans certaines espèces le tissu musculaire contient une enzyme musculaire capable de dégrader l'OTMA en diméthylamine (DMA) et formaldéhyde (FA):

Il est important de noter que la quantité de formaldéhyde produite est équivalente à la diméthylamine formée mais possède une importance plus grande du point de vue commercial. Le formaldéhyde provoque des liaisons croisées des protéines musculaires, ce

qui durcit le muscle et lui fait perdre rapidement sa capacité de rétention d'eau. L'enzyme responsable du durcissement provoqué par la formaldéhyde est appelée OTMA-ase ou OTMA déméthylase et est très communément trouvée dans les gadidés. La plupart des OTMA déméthylases connues à ce jour sont liées aux membranes et deviennent actives quand les membranes du tissu sont déchirées par la congélation ou artificiellement par dissolution par détergent. Le muscle rouge a un taux d'activité plus élevé que le muscle blanc alors que d'autres tissus comme les reins, la rate et la vessie natatoire sont extrêmement riches en cette enzyme. Il est donc important que le poisson haché soit complètement débarrassé des organes tels que les reins chez les gadidés pour éviter le durcissement au cours du stockage en congélation. L'enzyme OTMA-ase a été isolée de la fraction microsomique dans le muscle de merlu (Parkin and Hultin 1986) ainsi que de la membrane lysosomique dans les tissus rénaux (Gill, Conway *et al.* 1992). Le durcissement du muscle de merlu congelé est lié à la quantité de formaldéhyde produite et que le taux de production de FA est le plus important aux températures les plus fortes de congélation (Gill, Keith *et al.* 1979). De plus, il a été constaté que l'importance du durcissement dû au FA est augmenté par la mauvaise manutention infligée au poisson avant la congélation et par les variations de température au cours de la conservation en congelé. Les moyens les plus pratiques pour prévenir la production autolytique de FA sont de conserver le poisson à des températures inférieures à -30°C pour réduire les variations de température dans la chambre froide et d'éviter les manipulations brutales ou l'application de pression physique sur le poisson avant de le congeler.

3. Les changements microbiologiques

3.1 Flore bactérienne du poisson vivant

Les micro-organismes se trouvent sur toute la surface externe (peau et branchies) et dans les intestins des poissons vivants et fraîchement pêchés. Le nombre varie énormément allant de 10^2 à 10^7 UFC (unités formant colonies)/cm² de surface de peau (Liston 1980) et de 10^3 à 10^9 UFC/g de branchies ou d'intestins (Shewan 1962).

La flore bactérienne du poisson fraîchement pêché dépend de l'environnement dans lequel il a été capturé, plus que de l'espèce de poisson (Shewan 1977). Le poisson pêché dans des

eaux propres et froides a une charge bactérienne plus faible que celle du poisson pêché dans les eaux chaudes. Des charges importantes, de l'ordre de 10^7 UFC/cm² sont trouvées sur les poissons provenant d'eaux chaudes polluées. La flore bactérienne dominante des eaux froides et tempérées a un caractère psychrotrophe, ces bactéries sont capables de se développer à 0°C mais avec un optimum de croissance aux environs de 25°C (Morita 1975). Par contre les mésophiles sont isolées en nombre important à partir des poissons des eaux plus chaudes. La microflore des poissons d'eaux tempérées est dominée par les bactéries psychrotrophes à Gram négatif en forme de bâtonnets appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella* et *Flavobacterium*. Les membres des familles des *Vibrionaceae* (*Vibrio* et *Photobacterium*) et des *Aeromonadaceae* (*Aeromonas* spp.) sont aussi des bactéries aquatiques courantes et typiques de la flore du poisson (Tableau VI). Des bactéries à Gram positif comme *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* et corynéformes peuvent être également trouvées en quantités variables, mais ce sont généralement les bactéries à Gram négatif qui prédominent.

Tableau VI : Flore bactérienne du poisson capturé dans des eaux propres non polluées

Gram-négative	Gram-positive
<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Moraxella</i>	<i>Clostridium</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Micrococcus</i>
<i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Coryneforms</i>
<i>Cytophaga</i>	
<i>Vibrio</i>	
<i>Photobacterium</i>	
<i>Aeromonas</i>	

Les eaux marines contiennent des bactéries qui ont un besoin important de sodium pour leur croissance, notamment *Vibrio*, *Photobacterium* et *Shewanella*.

Dans les eaux polluées, des charges élevées d'*Enterobacteriaceae* ont été trouvées. Ces organismes disparaissent toutefois rapidement dans des eaux tempérées propres. Cependant, il a été constaté que *Escherichia coli* et *Salmonella* peuvent survivre très longtemps dans les eaux tropicales et, une fois introduits, peuvent devenir indigènes de l'environnement (Fujioka, Tenno *et al.* 1988).

La taxonomie de *Shewanella putrefaciens* a souvent prêté à confusion. Cet organisme était à l'origine associé au groupe *Achromobacter* puis classé plus tard dans le genre *Pseudomonas* groupe IV de *Shewan* sur la base du pourcentage en guanine + cytosine (GC %), Il a été ensuite transféré dans le genre *Alteromonas*, puis classé dans un nouveau genre, *Shewanella* sur la base de l'homologie 5S rRNA (MacDonnell and Colwell 1985). De même il a été suggéré que le genre *Aeromonas* spp. qui était un membre de la famille des *Vibrionaceae* soit transféré dans sa propre famille, les *Aeromonadaceae* (Colwell, Macdonell *et al.* 1986). Des études japonaises ont décelé une charge élevée de micro-organismes dans le tractus gastro-intestinal du poisson bien supérieure à celle des eaux environnantes, ce qui indique la présence d'une niche écologique favorable à ces micro-organismes. De même, Larsen, Jensen *et al.* (1978) ont trouvé jusqu'à 10^7 UFC/g de bactéries du type *vibrio* dans l'appareil intestinal du cabillaud et Westerdahl, Olsson *et al.* (1991) en ont isolé un grand nombre dans les intestins du turbot. *Photobacterium phosphoreum* qui peut être isolé de la surface du poisson, se rencontre également en grand nombre dans l'appareil gastro-intestinal de certaines espèces de poissons (Dalgaard 1993). Certains auteurs pensent que la microflore de l'appareil gastro-intestinal est simplement le reflet de l'environnement et de l'alimentation.

3.2 Invasion microbienne

La chair du poisson sain, vivant ou fraîchement pêché est stérile car le système immunitaire du poisson empêche les bactéries de se multiplier et proliférer. A la mort du poisson, le système immunitaire s'effondre et les bactéries peuvent proliférer librement.

Le poisson s'altère à des vitesses très variables. Certains auteurs expliquent ce fait par des différences dans les propriétés de la surface du poisson. Les peaux des poissons ont des textures très différentes. Ainsi, le merlan (*Merlangius merlangus*) et le cabillaud (*Gadus morhua*) qui ont un tégument très fragile s'abiment rapidement comparés à différents poissons plats comme le carrelet qui possède un derme et un épiderme très robustes. Ces derniers ont de plus une couche épaisse de mucus qui comprend plusieurs substances antibactériennes tels que des anticorps et des enzymes bactériolytiques (Murray and Fletcher 1976; Hjelmeland, Christie *et al.* 1983). L'altération résultant davantage de la diffusion des bactéries de la cavité abdominales et des branchies plutôt que de celles de la

peau, la vitesse d'altération est liée à la nature de ces bactéries et à la spécificité des matrices.

3.3 Evolutions de la microflore au cours du stockage et l'altération par rapport aux organismes spécifiques d'altération

Pendant la conservation sous glace, les bactéries vont doubler pratiquement chaque jour et, après 2 à 3 semaines, elles auront atteint $10^8 - 10^9$ UFC/g de chair ou par cm^2 de peau. Pendant la conservation à température ambiante, elles atteignent près de 10^7-10^8 UFC/g en 24 heures. Les bactéries des poissons capturés dans les eaux tropicales passeront souvent par une phase de latence de 1 à 2 semaines si le poisson est conservé sous glace, après quoi la croissance exponentielle commence. Au cours de la dégradation, le niveau bactérien des poissons tropicaux est semblable à celui observé sur les espèces de poissons des eaux tempérées (Gram 1990; Gram, Wedell-Neergaard *et al.* 1990).

Si le poisson glacé est conservé dans des conditions anaérobies ou dans une atmosphère contenant du CO_2 , le nombre de bactéries psychrotrophes telles que *S. putrefaciens* et *Pseudomonas* est souvent bien plus faible, c'est-à-dire 10^6-10^7 UFC/g, que sur le poisson conservé en aérobiose.

La composition de la microflore varie également de façon très importante pendant le stockage. Ainsi, dans la conservation sous glace en aérobiose, la flore est composée presque exclusivement de *Pseudomonas* spp. et *S. putrefaciens* après 1 à 2 semaines. Ceci serait dû à leur temps de génération relativement court à basse température (Morita 1975; Devaraju and Setty 1985) et se vérifie pour toutes les études menées sur du poisson qu'il soit tropical, ou d'eaux tempérées. A température ambiante (25°C), la microflore au stade de l'altération est dominée par les mésophiles, notamment des *Vibrionaceae*, et par des *Enterobacteriaceae* si les poissons sont pêchés dans des eaux polluées.

Une distinction claire doit être réalisée entre les termes « flore totale » et « bactéries d'altération » car la première décrit simplement les bactéries présentes dans le poisson quand il s'altère tandis que la seconde constitue le groupe spécifique qui produit les odeurs et les goûts désagréables associés à la dégradation. Chaque espèce possède une microflore d'altération spécifique dont le niveau sera en rapport avec la durée de conservation (Figure 2).

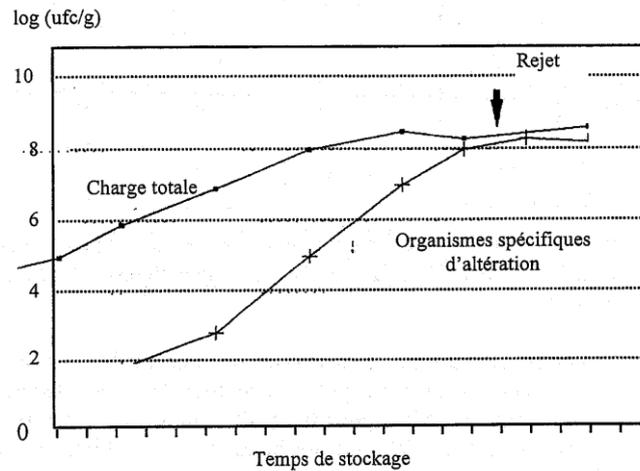


Figure 2 : Evolutions de la flore totale et des bactéries spécifiques d'altération au cours de la conservation (Dalgaard 1993)

Dalgaard (1993) a isolé des bactéries au moment du rejet sensoriel. Des cultures bactériennes pures ou en mélanges sont étudiées dans des substrats stériles de poisson et classées en fonction de leur potentiel d'altération, c'est-à-dire leur capacité à produire des changements sensoriels (odeurs indésirables) et chimiques typiques du produit altéré. Enfin, les souches sélectionnées sont testées pour évaluer leur pouvoir d'altération, c'est-à-dire pour vérifier si leur taux de croissance et leur production qualitative et quantitative d'odeurs indésirables sont similaires aux mesures effectuées sur les produits altérés.

Pour sélectionner les bactéries potentielles d'altération dans une flore de détérioration, un essai qualitatif évaluant la capacité des bactéries à produire du H_2S et/ou réduire l'OTMA peut être utilisé. Un milieu de culture permettant de détecter la réduction de l'OTMA en TMA par un changement de la couleur d'un indicateur redox et la formation de H_2S par formation d'un précipité noir de FeS , a été mis au point par Gramet *al.* (1987) et Malleet *al.* (1998).

Shewanella putrefaciens a été identifiée comme la bactérie responsable de l'altération du poisson des eaux tempérées conservé en aérobiose sous glace. Si le produit est emballé sous vide, *P. phosphoreum* participe à l'altération et devient la bactérie spécifique de l'altération du poisson emballé sous CO_2 . La flore d'altération du poisson des mers tropicales est composée presque exclusivement de *Pseudomonas* spp. et *S. putrefaciens*. Quelques espèces de *Pseudomonas* sont responsables de l'altération des poissons tropicaux d'eau douce stockés sous glace (Gram, Wedell-Neergaard *et al.* 1990) et constituent avec *S.*

putrefaciens les bactéries d'altération des poissons marins tropicaux conservés sous glace (Gram 1990).

Le tableau VII donne un aperçu des bactéries spécifiques d'altération du poisson frais conservé sous glace et à température ambiante.

Tableau VII : Microflore dominante et bactéries d'altération identifiées sur du poisson blanc frais (cabillaud) au moment de son altération (Huss 1994).

Température de stockage	Atmosphère d'emballage	Microflore dominante	Organismes Spécifiques d'Altération
0°C	Aérobie	Psychrotrophes Gram-négative, bâtonnets incapables de fermentation (<i>Pseudomonas Spp.</i> , <i>S. putrefaciens</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Acinetobacter</i>)	<i>S. putrefaciens</i> <i>Pseudomonas</i>
	Vide	Bâtonnets Gram-négatifs; psychrotrophes ou à caractère psychrophile (<i>S. putrefaciens</i> , <i>Photobacterium</i>)	<i>S. putrefaciens</i> <i>P. phosphoreum</i>
	Emballage sous atmosphère modifiée (EAM)	Bâtonnets capables de fermentation Gram-négatifs à caractère psychrophile (<i>Photobacterium</i>) Bâtonnets psychrotrophes incapables de fermentation (1 à 10% de la flore, <i>Pseudomonas</i> , <i>S. putrefaciens</i>) Bâtonnets Gram-positifs (bactéries lactiques)	<i>P. phosphoreum</i>
5°C	Aérobie	Bâtonnets psychrotrophes Gram-négatifs; (<i>Vibrionaceae</i> , <i>S. putrefaciens</i>)	<i>Aeromonas spp.</i> <i>S. putrefaciens</i>
	Vide	Bâtonnets psychrotrophes Gram-négatifs (<i>Vibrionaceae</i> , <i>S. putrefaciens</i>)	<i>Aeromonas spp.</i> <i>S. putrefaciens</i>
	EAM	Bâtonnets psychrotrophes Gram-négatifs (<i>Vibrionaceae</i>)	<i>Aeromonas spp.</i>
20/30°C	Aérobie	Bâtonnets capables de fermentation masophyles Gram-négatifs (<i>Vibrionaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>)	<i>Aeromonas spp.</i> Mobile (<i>A. hydrophila</i>)

3.4 Changements biochimiques produits par le développement bactérien durant la conservation et l'altération

La comparaison des composés chimiques qui se développent dans le poisson au cours de sa dégradation naturelle et dans le poisson stérile a montré que la plupart des composés volatils sont produits par les bactéries (Shewan 1962). Ceux-ci comprennent la triméthylamine, les composés soufrés volatils, les aldéhydes, les cétones, esters, hypoxanthine et autres composés de faible poids moléculaire.

Les substrats pour la production des composés volatils sont les glucides (par exemple lactate et ribose), les nucléotides (par exemple inosine monophosphate et inosine) et d'autres molécules azotées non protéiques ANP. Les acides aminés sont des substrats particulièrement importants pour la formation des sulfures et de l'ammoniaque.

Les micro-organismes retirent bien plus d'énergie de l'oxydation aérobie que de la fermentation anaérobie. Ainsi, l'oxydation totale d'une mole de glucose (ou autre hexose) par les cycles de Krebs produit 6 moles de CO₂ et 36 moles d'ATP, alors que la fermentation d'une mole de glucose donne seulement 2 moles d'ATP et 2 moles d'acide lactique. Le développement aérobie initial dans le poisson est dominé par les bactéries utilisant les glucides comme substrat et l'oxygène comme accepteur final d'électrons avec production également de CO₂ et H₂O.

4. Les changements au niveau des lipides

Comme expliqué dans le chapitre précédent, les lipides du poisson sont connus pour leurs qualités nutritionnelles et leurs bienfaits sur la santé humaine. Cependant, les acides gras polyinsaturés sont très sensibles aux réactions d'oxydation. L'hydrolyse et l'oxydation sont les principales voies d'altérations des lipides au cours de la conservation et de la transformation des poissons. Ces modifications affectent la qualité physico-chimique et sensorielle du poisson.

4.1 La lipolyse

La lipolyse intervient au sein des muscles de poisson pendant la phase *post mortem* et est associée à la dégradation du muscle de poisson au cours de la transformation et de la conservation (Shewfelt 1981).

L'hydrolyse des lipides est principalement le fait d'enzymes lipolytiques tissulaires. Chez le poisson, il s'agit des lipases (EC 3.1.1.3) et de la phospholipase A2 (EC 3.1.1.4) et la phospholipase B (EC 3.1.1.5). Les lipases hydrolysent les liaisons esters des glycérides et libèrent à partir des triglycérides (TG) des acides gras (AGL), des diglycérides (DG) et des monoglycérides (MG). La phospholipase A2 hydrolyse la liaison ester en position 2 du glycérol dans les phospholipides. La phospholipase B attaque la liaison ester en position 1 ou 2 du glycérol. La phospholipase A isolée du muscle de lieu noir (*Pollachius virens*) présente une activité optimale à 37-42°C et à pH 8,5-9 (Audley, Shetty *et al.* 1978). Ces activités enzymatiques dépendent du site de dépôt lipidique, elles sont plus importantes dans le muscle rouge que dans le muscle blanc du maquereau (Shewfelt 1981; Hwang and Regenstein 1993). Ces enzymes sont très actives entre -4°C et 4°C (Aubourg, Medina *et al.* 1998; Aubourg, Sotelo *et al.* 1998). L'hydrolyse des lipides au sein de la chair de maquereau réfrigérée (2-3°C) sous vide durant 15 jours conduit à la formation quantitative d'acide gras libres, de 1,2-diglycérides, de lysophosphatidylcholine et lysophosphatidyléthanolamine (Hwang and Regenstein 1993). Bien que l'activité des phospholipases diminue après 7 jours de stockage sous glace (2-3°C) l'activité des lipases continue au-delà de 15 jours (Hwang and Regenstein 1993; Aubourg, Medina *et al.* 1998). L'activité lipolytique, bien que faible, persiste lors de la conservation à l'état congelé. Ainsi, des acides gras sont libérés après au moins 300 jours de conservation à -18°C des filets et de la chair de Merlu blanc du Cap (*Merluccius capensis*) (De Koning and Mol 1990). Plus les températures de conservation sont basses, plus la cinétique de formation des acides gras libres est ralentie. Ainsi cette cinétique est plus rapide au cours de la conservation à -5°C par rapport à une conservation à -18°C. Bien que la cinétique de formation des acides gras libres soit faible à -40°C, l'activité lipolytique continue après 145 et 245 jours de stockage à -40°C de la chair de merlu blanc du Cap (De Koning and Mol 1990). Ces enzymes sont inactivées par la cuisson (Hwang and Regenstein 1993).

Les travaux de Han and Liston (1987) réalisés sur des microsomes de muscle de truite arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii*) suggèrent l'existence d'une corrélation entre l'oxydation des lipides et l'activité de la phospholipase A2. D'après Aubourg (2001; 2001a), les acides gras libres ont un effet pro-oxydant sur les lipides de poisson.

Ces réactions de lipolyse induisent une dégradation de la qualité du produit (Shewfelt 1981). L'hydrolyse enzymatique des lipides neutres joue un rôle clef dans la détérioration des propriétés sensorielles du saumon au cours de son stockage à l'état congelé (Refsgaard, Brockhoff *et al.* 2000).

De plus, les acides gras libres provenant de l'activité de ces enzymes interagissent avec les protéines favorisant leur dénaturation et conduisent à l'altération du produit (Dyer and Fraser 1959).

4.2 L'oxydation des lipides

La stabilité du muscle vis à vis de l'oxydation dépend de la localisation, de la composition, de la concentration et de la réactivité de trois facteurs : les substrats et les catalyseurs de l'oxydation et les antioxydants (Decker and Xu 1998). Au niveau des tissus vivants, il existe des mécanismes naturels de contrôle de l'oxydation afin de prévenir la destruction oxydative des lipides membranaires, des protéines et des acides nucléiques. Ainsi, il existe une régulation des systèmes prooxydants et antioxydants qui permet de maintenir la balance entre les facteurs impliqués dans les réactions d'oxydation. La régulation des facteurs pro et antioxydants est perturbée à la mort de l'animal et durant le stockage et la transformation des muscles. Ce dérèglement induit des changements des propriétés biochimiques du muscle (Hultin 1994). Ces modifications sont caractérisées notamment par une augmentation de la teneur en fer libre (Decker and Hultin 1990), une activation des protéines héminiques (Kanner, German *et al.* 1987), la dégradation des membranes (Huang, Hultin *et al.* 1993). Ces différents facteurs favorisent le développement des réactions d'oxydation qui induisent la dégradation des propriétés biochimiques, organoleptiques et nutritionnelles de l'aliment (Frankel 1998).

Les facteurs qui influencent l'oxydation des lipides sont nombreux. Il s'agit de facteurs intrinsèques tels que la composition en acides gras des lipides (nombre et position des insaturations), la présence de prooxydants (hème, ions métalliques, enzymes) ou

d'antioxydants naturels (tocophérols, caroténoïdes...) et des facteurs externes tels que la température, la lumière, la pression partielle en oxygène, l'activité de l'eau, les conditions de stockage et de transformation (Hsieh, Kinsella *et al.* 1989).

4.2.1 Mécanismes généraux de l'oxydation des lipides

L'oxydation des lipides peut résulter de plusieurs voies réactionnelles en fonction du milieu et des agents initiateurs :

- l'auto-oxydation catalysée par la température, les ions métalliques, les radicaux libres ;
- la photo-oxydation, initiée par la lumière en présence de photosensibilisateurs ;
- l'oxydation enzymatique initiée par la lipoxygénase.

L'auto-oxydation

L'oxydation des lipides est une réaction auto-catalytique. Il s'agit d'un enchaînement de réactions radicalaires se déroulant en trois étapes (Figure 3). Une première réaction produit un radical libre par élimination d'un hydrogène de l'acide gras (initiation). Puis les réactions s'enchaînent pour produire plusieurs radicaux libres (propagation) qui se combinent pour former des composés non radicalaires (terminaison).

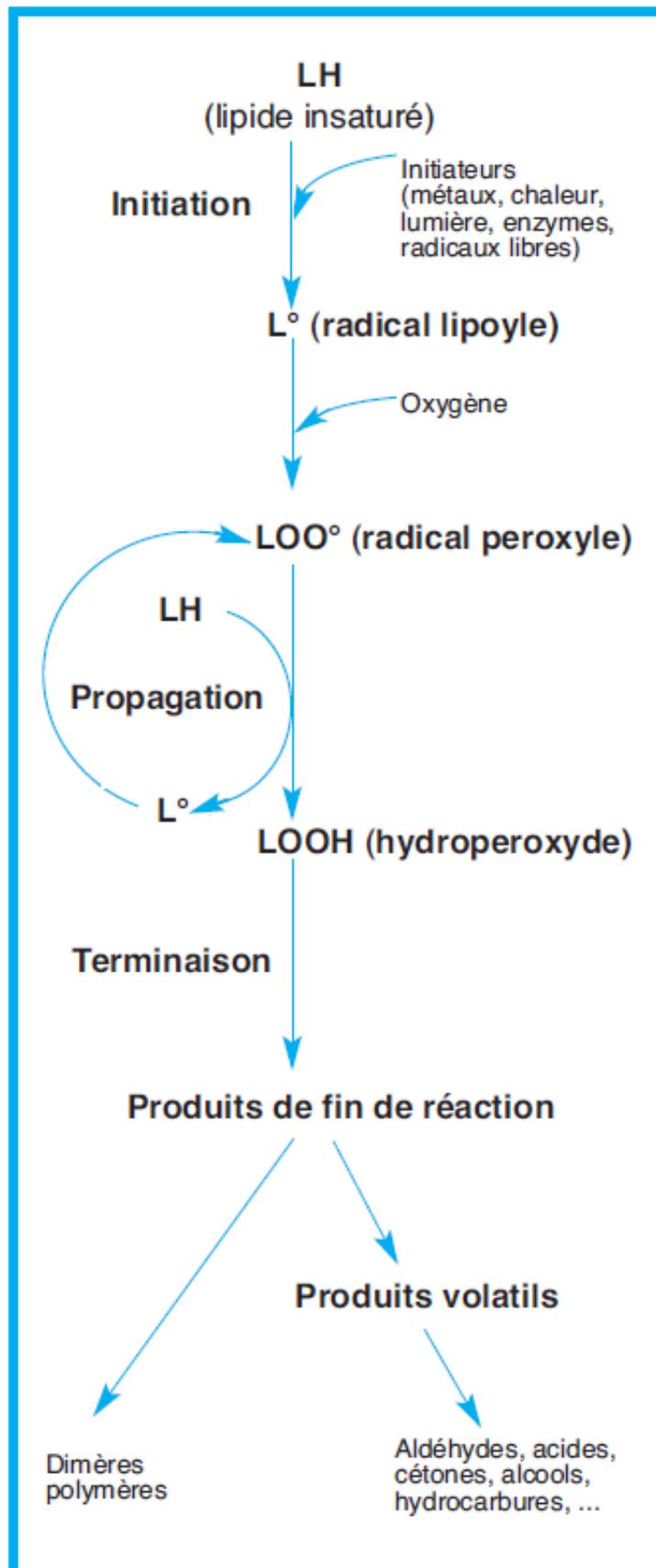


Figure 3 : Schéma général de l'oxydation des lipides

Mécanisme réactionnel de l'oxydation des lipides :

INITIATION : En présence d'un initiateur (I), les lipides insaturés (RH) perdent un atome d'hydrogène pour former un radical libre de lipide (radical, lipoyle).

(1)

Ce mode d'initiation, favorisé par une élévation de température, peut être produit par des radiations ionisantes, des générateurs chimiques, des systèmes enzymatiques ou chimiques produisant des espèces activées de l'oxygène, ou de traces métalliques.

PROPAGATION : Les radicaux libres formés fixent l'oxygène moléculaire et forment des radicaux libres peroxydes instables (2) qui peuvent réagir avec une nouvelle molécule d'acide gras pour former des hydroperoxydes (3).

(réaction rapide) (2)

(réaction lente) (3)

TERMINAISON : Les radicaux formés réagissent entre eux pour conduire à un produit qui n'est pas un radical libre.

(4)

(5)

(6)

Les hydroperoxydes peuvent également se décomposer par scission homolytique de la liaison O-O pour former un radical alcoyl et un radical hydroxyl. Le radical alcoyl réagit avec d'autres substrats et propage la réaction en chaîne. Il peut également subir une scission carbone-carbone de part et d'autre du radical pour former un radical alkyl et un radical vinyl. Le radical alkyl peut réagir avec un hydrogène, un radical hydroxyl ou une molécule d'oxygène générant ainsi des hydrocarbures, des alcools et d'autres hydroperoxydes. Le radical vinyl peut réagir avec un radical hydroxyl, un radical hydrogène ou l'oxygène moléculaire pour générer des aldéhydes et des hydrocarbures.

Photo-oxydation

La photo-oxydation est une voie importante de production d'hydroperoxydes en présence d'oxygène, d'énergie lumineuse et de photosensibilisateurs tels que les hémoprotéines ou la riboflavine (Hultin 1992). Les photosensibilisateurs (Sens) absorbent l'énergie lumineuse et passent à l'état triplet excité (Sens³) (Hultin 1994). Les photosensibilisateurs interviennent dans l'oxydation des lipides selon deux types de mécanismes (Frankel 1998).

Les photosensibilisateurs de type I, telle que la riboflavine, agissent comme les radicaux libres initiateurs. Dans leur état triplet, elles arrachent un atome d'hydrogène ou un électron aux molécules lipidiques pour former un radical capable de réagir avec l'oxygène (7).

(7)

Selon le second mécanisme, les molécules photosensibles de type II, telles que la chlorophylle et l'érythrosine, réagissent dans leur état excité (Sens³) avec l'oxygène triplet (8) auquel elles transfèrent leur énergie pour donner de l'oxygène singulet (¹O₂).

(8)

L'oxygène singulet ainsi formée est très électrophile et peut réagir directement sur un acide gras insaturé (RH) formant ainsi un hydroperoxyde ROOH (9).

(9)

Par la suite interviennent les réactions radicalaires en chaîne de l'auto-oxydation. Les hydroperoxydes ainsi formés sont différents de ceux formés par auto-oxydation (Frankel 1998).

Voie enzymatique

Le phénomène d'oxydation des acides gras insaturés peut être d'origine enzymatique. Les deux enzymes principalement impliquées sont la lipoxygénase et la cyclooxygénase (Hultin 1994). La lipoxygénase catalyse l'insertion d'une molécule d'oxygène sur un acide gras insaturé selon une réaction stéréospécifique et aboutit à la formation d'hydroperoxydes. Elle agit spécifiquement sur les acides gras non estérifiés. Son activité est donc souvent couplée avec celle des lipases et phospholipases (Figure 4).

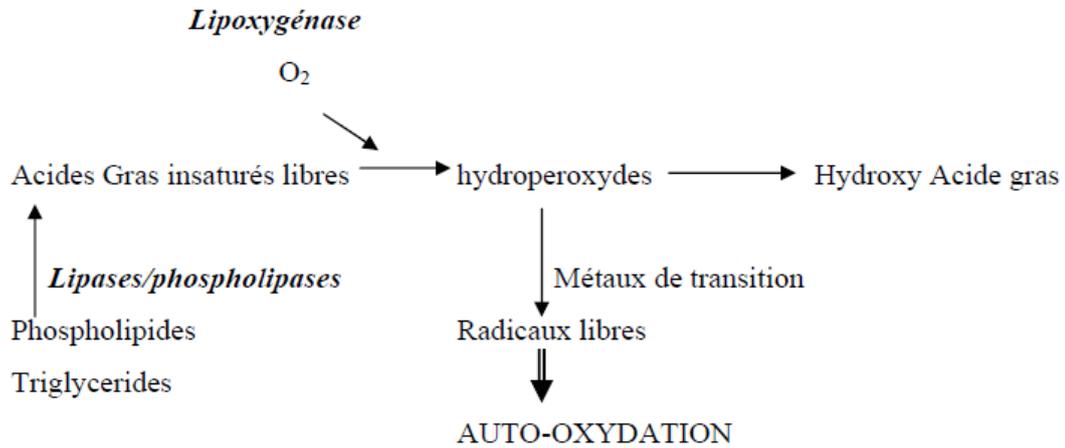


Figure 4 : Mécanisme d'initiation de la peroxydation des lipides par l'activité lipoxigénasique (German, Chen *et al.* 1985)

La cyclooxygénase est une lipoxygénase qui incorpore deux molécules d'oxygène au niveau d'un acide gras pour former des hydroperoxydes spécifiques. Les cycloxygénases catalysent la formation *in vivo* des prostaglandines et thromboxanes et les lipoxygénases celle des leucotriènes. Les substrats de la lipoxygénase de poisson sont les AGPI comme l'acide arachidonique (C20 : 4 ω 6), l'EPA (C20 : 5 ω 3) et le DHA (C22 : 6 ω 3) (Josephson and Lindsay 1986).

L'oxydation enzymatique se produit même à basse température. Durant le stockage à l'état congelé l'activité enzymatique est très faible. Cependant, une fois la décongélation amorcée et des températures de 0°C à 4°C atteintes, il semblerait que cette activité reprenne et s'accroisse (Frankel 1998). Cette activité lipoxygénasique est surtout présente au niveau des branchies et de la peau du poisson (German, Chen *et al.* 1985). Chez le poisson, les lipoxygénases présentes seraient les 12-lipoxygénase, 15-lipoxygénase et 9-lipoxygénase dont l'activité conduit à la formation des 12-hydroperoxydes, 15-hydroperoxydes et 9-hydroperoxyde. Les activités des 12-lipoxygénase, 15-lipoxygénase, et 9-lipoxygénase ont été mises en évidence au sein de la peau de hareng (*Clupea haerengus*) et de sardine (*Sardina pilchardus*), avec une activité prédominante de la 12-lipoxygénase (Medina, Satué-Gracia *et al.* 1999).

L'activité de la 12-lipoxygénase est également présente dans les muscles de maquereaux (Saeed and Howell 2001).

La décomposition de l'acide arachidonique-12-hydroperoxyde issu de l'activité lipoxygénasique des ouies de truite conduit à la formation de 2-nonénal, 1-octène, 1-octen-3-ol, 2-octène, 2-octen-1-ol. La décomposition de l'acide eicosapentaénoic-12-hydroperoxyde conduit à la formation du 2,6-nonadiénal, 1,5-octadien-2-ol et 2,5-octadien-1-ol (Hsieh and Kinsella 1989b).

Au cours de la période *post mortem* et de la transformation des poissons, des lipoxygénases seraient libérées par la peau et généreraient des hydroperoxydes de lipides au sein des muscles (Rhee 1988). Ces hydroperoxydes participeraient à l'initiation et à la propagation de l'oxydation. Cette voie enzymatique de peroxydation nécessite la présence de cofacteurs et un pH situé entre 6 et 7 dans le cas des muscles de poisson (Rhee 1988).

Les lipoxygénases du poisson sont inactivées à des températures supérieures à 60°C, pour lesquelles l'oxydation non enzymatique est favorisée. Ces enzymes peuvent être inhibées par les tocophérols (vitamine E) qui sont des antioxydants naturels.

4.2.2 Les initiateurs de l'oxydation des lipides

La phase d'initiation de l'oxydation des lipides peut être déclenchée par plusieurs facteurs : les formes activées de l'oxygène, les enzymes, les métaux ou la chaleur (Hsieh and Kinsella 1989; Hultin 1994; Frankel 1998).

4.2.3 Produits formés au cours de l'oxydation des lipides

L'oxydation des lipides de poisson conduit à la formation de produits primaires : hydroperoxydes, radicaux libres, diènes conjugués, très instables et rapidement décomposés en produits secondaires : aldéhydes, alcools, cétones. Ainsi, lors du développement des réactions d'oxydation vont successivement apparaître les produits primaires et secondaires de l'oxydation.

Produits primaires

Des radicaux libres sont formés au cours des phases d'initiation et de propagation de la réaction d'oxydation des lipides. Ces espèces très instables et très réactives sont des composés cytotoxiques susceptibles d'induire des altérations des molécules d'ADN

(Kanazawa, Sawa *et al.* 2000) et des protéines. Les diènes conjugués, se forment par réarrangement des doubles liaisons du radical lipoylé des acides gras polyinsaturés. Les hydroperoxydes sont des produits intermédiaires de l'oxydation des lipides sans odeur spécifique, ils se décomposent rapidement. Ce sont les précurseurs des composés volatils.

Produits secondaires

La scission des produits primaires de l'oxydation conduit à la formation de composés secondaires souvent volatils. Ces composés sont responsables des odeurs propres aux poissons. Les poissons frais sont caractérisés par une odeur d'herbe coupée, caractéristiques des composés carbonylés et des alcools issus de la dégradation des acides gras polyinsaturés probablement par voie enzymatique (Josephson, Lindsay *et al.* 1984).

Une grande variété de composés carbonylés (aldéhydes, cétones, alcools) caractérise les odeurs des lipides oxydés des poissons. Il s'agit notamment de l'hexanal caractéristique de la note « herbe coupée », du 1-octen-3-ol et 1,5-octadien-3-one qui ont une note « champignon ».

Ce sont ces produits secondaires volatils qui vont nous intéresser dans notre objectif de caractériser la qualité du poisson avec une approche chimique.

Produits d'interaction entre les produits d'altération des lipides et les protéines

Les hydroperoxydes et les produits secondaires issus de l'oxydation des lipides interagissent avec les protéines et les acides aminés. Ces interactions ont un impact important sur la dégradation des propriétés fonctionnelles, sensorielles et nutritionnelles des aliments (Pokorny 1977). La nature de ces interactions dépend du stade de l'oxydation des lipides c'est à dire de la teneur en hydroperoxydes ou en produits secondaires (Ladikos and Lougovois 1990).

Les hydroperoxydes sont très réactifs avec les groupements aminés et sulphydryles des protéines. La réaction d'un hydroperoxyde avec un groupe α -aminé conduit à la formation d'un aldéhyde tandis que la réaction d'un hydroperoxyde avec un groupe ϵ -aminé libre d'une lysine conduit à la formation d'une imine. Les modifications chimiques induites par les

interactions entre les hydroperoxydes de lipides et les protéines se traduisent par des polymères protéine-protéine, des produits d'addition lipide-protéine, et des dégradations d'acides aminés plus particulièrement lysine, cystéine, méthionine, tryptophane (Gardner 1979).

Les composés carbonylés, notamment les aldéhydes, issus de l'oxydation des lipides réagissent avec les groupements aminés des protéines et forment ainsi des bases de Schiff. Les aldéhydes réagiraient préférentiellement avec les groupements thiol des cystéines et les groupements ϵ -aminé des lysines (Gardner 1979). Les réactions du malonaldéhyde, produits secondaires de l'oxydation des lipides avec les protéines conduit à la formation de groupements carbonyles au niveau des chaînes d'acides aminés (Burcham and Kuhan 1996). La solubilité, les propriétés émulsifiantes et rhéologiques sont affectées par les réactions entre les produits d'oxydation des lipides et les protéines.

Les liaisons contractées entre les produits d'oxydation des lipides et les protéines sont de trois types : liaison covalente, liaison ionique, liaison hydrogène entre les groupements polaires des lipides oxydés et les protéines (Pokorny 1977).

4.3 Altération des lipides lors de la conservation

L'altération des lipides est favorisée au cours des procédés de conservation et de transformation des muscles de poisson. La dégradation des antioxydants naturels, l'activation des catalyseurs et les autres mécanismes d'altération *post-mortem* interviennent rapidement au sein du muscle de poisson.

4.3.1 Conservation sous glace de la matière première

Les produits de la mer sont des denrées très périssables et nécessitent une rapide réfrigération afin de limiter leur altération. Il est recommandé de les consommer et de les transformer rapidement après capture afin de limiter le développement bactérien et l'apparition d'odeur désagréable. Leur durée de vie varie en fonction des espèces considérées et dépend de la température de conservation et de l'état initial du poisson. La qualité initiale du poisson dépend de ses habitudes alimentaires, des conditions de

croissance, de la saison, des conditions de pêche comme par exemple l'écrasement en fond de chalut ou de cale (Garthwaite 1992).

Après la mort des poissons, les lipoxygénases seraient libérées par la peau et généreraient des hydroperoxydes de lipides au sein des muscles (Rhee 1988). Ces hydroperoxydes participent à l'initiation et à la propagation de l'auto-oxydation. Cette voie de peroxydation enzymatique nécessite la présence de cofacteurs tels que le NADH et un pH optimal situé entre 6 et 7 dans le cas des muscles de poisson (Rhee 1988).

Au cours de la conservation à l'état réfrigéré ou sur glace différentes réactions biochimiques ont lieu induisant la formation d'amines et d'hypoxanthine, d'acides gras libres, de composés volatils, et des modifications physico-chimiques du muscle (Nunes, Batista *et al.* 1992; Nunes, Cardinal *et al.* 1992). Les mécanismes de dégradation des lipides au cours de la conservation des poissons font intervenir la voie enzymatique de l'oxydation par les lipoxygénases mais également les réactions d'oxydation catalysées par des facteurs tels que les métaux et les pigments héminiques. L'activité enzymatique de la 12-lipoxygénase est très élevée au cours des premières 24 heures de conservation sous glace de la sardine puis diminue fortement par la suite tandis que l'activité de la 15-lipoxygénase diminue de 50% en moins de 24 heures de conservation sous glace (Medina, Satué-Gracia *et al.* 1999). Les protéines héminiques présentent une forte activité pro-oxydante au cours de la conservation des poissons sous glace (Richards, Kelleher *et al.* 1998).

Les composés primaires (hydroperoxydes) et secondaires (aldéhydes...) issus de l'oxydation des lipides interagissent avec les composés aminés (acides aminés, peptides, protéines, phospholipides) induisant la formation de composés d'interaction possédant des propriétés fluorescentes. Ainsi, si dans un premier temps, les teneurs en produits secondaires de l'oxydation des lipides (sr-TBA) augmentent au cours de la conservation sous glace des filets de poissons elle diminue par la suite (Undeland, Hall *et al.* 1999; Aubourg 2001). Cette baisse des quantités de sr-TBA résulte de l'interaction de ces molécules avec les protéines. La formation des composés fluorescents au cours de la conservation sous glace des filets de harengs (*Clupea harengus*) est plus importante dans la partie sous cutanée des filets que dans la partie ventrale (Undeland, Hall *et al.* 1999). Ces différences s'expliquent par une activité pro-oxydante supérieure au niveau de la partie sous cutanée riche en muscle rouge, en lipides, en hémoglobine et enzymes.

Chapitre III : Les différentes méthodes de caractérisation de la qualité d'un poisson

Les produits de la mer sont généralement considérés comme des aliments riches en protéines, pauvres en graisses et matières grasses saturées quand ils sont comparés à d'autres produits alimentaires animaux riches en protéines. La fraîcheur est le plus important attribut lors de l'évaluation de la qualité des produits de la mer et est très préoccupante dans le secteur. La qualité des poissons se dégrade après la mort en raison des réactions chimiques et des dégradations microbiennes. Le résultat de ces réactions entraîne une détérioration de la qualité sensorielle des produits de la mer. Les poissons sont riches en acides gras polyinsaturés, qui sont sensibles à l'oxydation des lipides. Elle conduit au développement des saveurs et des odeurs de rancissement non désirés dans un produit comestible. Du fait de leur haut degré d'insaturation, les acides gras du poisson sont moins résistants à l'oxydation que les autres animaux. Ce chapitre résume les méthodes utilisées pour évaluer la fraîcheur et la détérioration des poissons.

1. Les méthodes sensorielles

L'analyse sensorielle est le moyen le plus utilisé par le secteur des produits de la mer et les services d'inspections pour évaluer la fraîcheur et la qualité des poissons et produits de la pêche. L'analyse sensorielle constitue un outil de mesure immédiate, rapide et précis qui permet d'obtenir des informations pertinentes sur les aliments et des éléments pour comprendre le comportement des consommateurs. Cette discipline scientifique mesure, analyse et interprète les réactions humaines aux caractéristiques des aliments perçues par la vue, l'odorat, le goût, le toucher et l'ouïe. L'évaluation sensorielle est une estimation systématique de l'odeur, de la saveur, de l'aspect et de la texture des aliments.

Pendant les 50 dernières années de nombreux moyens ont été développés pour évaluer les poissons crus sur des bases sensorielles. En Europe, la méthode la plus utilisée est le tableau de cotation européen présenté dans la Directive européenne 2406/96. Quatre catégories de fraîcheur y sont établies : E, A, B et C correspondant aux différents niveaux d'altération. La catégorie E (extra) correspond au niveau de qualité le plus élevé, alors qu'au-dessous de B, le

poisson est considéré comme non comestible. Aujourd'hui, de nouveaux systèmes d'évaluations, plus rapides et plus performantes, sont utilisés pour différentes espèces, dont la méthode QIM (Quality Index Method).

Développée à l'origine en Australie, elle est basée sur les changements des caractéristiques sensorielles des poissons crus lors de leur altération. Des notes de 0 à 1 ; 0 à 2 ; ou 0 à 3 points de démérite (ou index) sont attribuées en fonction des changements se produisant au niveau de l'odeur, de la texture, de l'aspect des yeux, de la peau et des branchies. Les points ainsi attribués sont additionnés pour donner une note sensorielle globale ou QI (Quality Index). Comparée à une courbe de calibration, cette note permet d'estimer la fraîcheur en nombre de jour d'entreposage sous glace. En effet, le point fort de cette méthode est de permettre une estimation de la durée de conservation restante avec une précision satisfaisante.

De nombreuses tables de cotation QIM ont été développées pour différentes espèces. La morue, l'églefin, le sébaste, le lieu noir, la crevette, le saumon, la barbue, la plie, la sole, le turbot et le hareng sont inclus dans une version informatisée, développée dans le cadre du projet « Développement et mise en œuvre d'un système d'évaluation sensorielle informatisé (QimIT) pour l'évaluation de la fraîcheur du poisson » (CRAFT FAIR FA-S2-9063). Des tables de cotation QIM ont été développées pour d'autres espèces telles que le maquereau, le chinchard, la sardine et la dorade royale.

2. Les méthodes physiques

2.1 Analyse de la texture

L'analyse de texture des poissons et produits de la mer sont importantes pour la recherche, le contrôle de la qualité et le développement de produits dans l'industrie des produits de mer. Le muscle du poisson peut devenir mou ou pâteux à la suite d'une dégradation autolytique ou à la suite d'un stockage congelé. Le muscle du poisson a un niveau élevé de protéases qui commencent immédiatement à dégrader les protéines après la capture du poisson, au cours du process, puis est favorisé avec un mauvais stockage et à la cuisson (Aksnes 1989; Toyohara, Sakata *et al.* 1990). La texture comprend les caractéristiques les plus communes telles que la dureté, l'élasticité et la masticabilité des aliments. De

nombreuses méthodes mécaniques ont été utilisées pour mesurer la texture; cependant il existe peu d'accord pour désigner laquelle est la meilleure.

2.2 Le torrymètre

Le torrymètre a été développé en Ecosse dans la station de recherche Torry. Les propriétés diélectriques du poisson sont utilisées pour déterminer sa fraîcheur. Les propriétés diélectriques de la peau et du muscle du poisson se modifient de manière systématique durant la dégradation des tissus. Ces changements qui se produisent sont associés aux modifications de l'apparence, de l'odeur, de la texture, de la saveur durant l'altération et ont été utilisés comme des indicateurs de qualité avec la première version commerciale du Torrymètre en 1970 (Burt, Gibson *et al.* 1976). Une relation linéaire a été trouvée entre la lecture du Torrymètre et les attributs sensoriels pour le cabillaud, le hareng, le merlu, le merlan bleu, le flet, le maquereau, la dorade et la sole d'élevage sénégalaise (Burt, Gibson *et al.* 1976; Lupin, Giannini *et al.* 1980; Barassi, Boeri *et al.* 1981; Pivarnik, Kazantzis *et al.* 1990; Hattula, Luoma *et al.* 1995; Lougovois, Kyranas *et al.* 2003; Tejada, De las Heras *et al.* 2007). Cependant, Gelman, Drabkin *et al.* (2003) ont démontré que les mesures du Torrymètre sur 6 espèces d'origine différente étaient mal corrélées avec l'évaluation sensorielle. Le lavage à l'eau du poisson et sa concentration en graisse ont aussi un effet sur les propriétés diélectriques et tendent à faire varier les valeurs observées du Torrymètre (Pivarnik, Kazantzis *et al.* 1990).

2.3 L'intellectron Fischtester VI

Les principes de bases du Torrymètre (Royaume-Uni) et de l'Intellectron Fischtester VI (Allemagne) sont similaires, les propriétés électriques de la chair du poisson sont mesurées (résistance, conductivité, et capacité) (Jason and Richards 1975). Cette méthode est basée sur la conduction à travers la peau, par conséquent, fonctionne seulement sur du poisson entier et des filets avec leurs peaux. La congélation et la manutention mécanique peut affecter les mesures.

2.4 Le RT-Freshtester

Comme le Torrymètre et l'Intellectron Fischtester VI, le RT-Freshtester reflète les propriétés diélectriques du poisson, et ces mesures diminuent avec le temps de stockage. Le RT-Freshtester est rapide et non destructif, et permet de classer automatiquement 60-70 poissons par minute. Cependant, ces appareils ont besoins d'un étalonnage en fonction de la préparation des échantillons, la saison, les lieux de pêche et les procédures de manutentions du poisson. Ils sont inappropriés pour les poissons congelés et décongelés, partiellement gelé par réfrigération, et pour les poissons réfrigérés dans l'eau de mer (Dalgaard 2000).

L'inconvénient de ces 3 appareils est qu'ils sont couteux et restent très peu utilisés pour l'évaluation de la fraîcheur du poisson.

2.5 Le nez électronique

L'odeur, un indicateur de la fraîcheur du poisson, a été analysée par des juges ou la chromatographie gazeuse. Un nez électronique appelé FreshSense a été développé et distribué par Element-Bodvaki en Islande. Leur appareil utilise une méthode, rapide et non destructive, qui en mesurant les composés volatils indique l'altération de l'odeur dans les produits de la mer. FreshSense est basé sur un système d'échantillonnage statique et clos avec des capteurs électrochimiques de gaz, qui sont sensibles aux composés volatils. Les produits chimiques les plus impliqués dans l'odeur du poisson frais sont des alcools et carbonyles à longues chaînes, des bromophénols et des composés N-cycliques. Cependant, les alcools et carbonyles à courtes chaînes, les amines, les composés soufrés, aromatiques, N-cycliques et acides sont produits par la dégradation microbienne et l'oxydation des lipides durant le stockage des poissons (Olafsdottir, Hognadottir *et al.* 2000; Alimelli, Pennazza *et al.* 2007). Les concentrations de ces composés sont liées au degré d'altération. Différents nez électroniques ont été employés pour mesurer la fraîcheur du poisson avec des capteurs de gaz à oxydes métalliques semi-conducteurs, des capteurs électrochimiques (CO, H₂O, NO, SO₂ et NH₃), des résonateurs en quartz à cisaillement d'épaisseur, un capteur de gaz au diméthylamine (DMA) semi-conducteur et un prototype de capteur de gaz à l'état solide appelé le FishNose (Schweizer-Berberich, Vaihinger *et al.* 1994; Di Natale, Brunink *et al.* 1996; Olafsdottir, Martinsdottir *et al.* 1997a; Olafsdóttir, Martinsdóttir *et al.* 1997b; Haugen,

Chanie *et al.* 2006). Olafsdottir, Li *et al.* (2002) ont étudié la fraîcheur du sébaste et ont trouvé qu'il existe une bonne corrélation entre la réponse du capteur CO et la méthode QIM pour le sébaste conservé sous atmosphère modifiée. Tryggvadottir and Olaafsdottir (2000) ont aussi trouvé que les résultats des capteurs électroniques (CO, H₂O, NO, SO₂ et NH₃) pour l'églefin à différentes saisons montrent des tendances similaires. Des études sur les têtes et les filets de cabillaud ont aussi donné des résultats similaires et il a été constaté que le capteur CO montre de meilleures réponses. Di Natale, Olafsdottir *et al.* (2001) ont démontré que la combinaison de système de nez électronique basée sur différents capteurs technologiques améliore les performances comparé à une technologie simple pour la morue.

2.6 Spectroscopie de réflectance dans l'infrarouge proche

La spectroscopie de réflectance dans l'infrarouge (NIR) proche a été utilisée dans diverses applications analytiques. La technique est caractérisée par sa vitesse et sa simplicité, elle a la capacité de mesurer de nombreux échantillons dans un délai court, elle peut être opérée sur la ligne, elle est non destructive, facile d'utilisation et nécessite peu de formation pour les opérateurs (Nilsen and Esaiassen 2005). Cette méthode a été appliquée pour déterminer la teneur en matières grasses, en eaux et en protéines dans le poisson (Downey 1996; Wold and Isaksson 1997; Nortvedt, Torrissen *et al.* 1998; Vogt, Gormley *et al.* 2002; Khodabux, L'Omelette *et al.* 2007), la teneur en acides gras libres (FFA) dans l'huile de poisson (Zhang and Lee 1997; Cozzolino, Murray *et al.* 2005), la capacité de rétention d'eau dans le muscle de poisson décongelé (Bechmann and Jørgensen 1998); et l'évaluation de la qualité du merlu rouge émincé congelé (Pink, Naczka *et al.* 1999), du cabillaud pêché à la palangre et au filet maillant (Nilsen and Esaiassen 2005), puis des filets de cabillaud décongelés et réfrigérés sous atmosphère modifiée (Bøknæs, Jensen *et al.* 2002).

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) est aussi une technologie rapide, non destructrice, installée sur la chaîne de production industrielle. Par contre, elle demande une manipulation importante de l'échantillon, qui entraîne un changement de la structure et des protéines dans le muscle. Comparer avec la FT-IR, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier à réflexion diffuse (DRIFT) présente des avantages, son utilisation est simple, rapide, sensible, peu coûteux, et nécessite de petites quantités d'échantillon. Pour la première fois, cette technique a été appliquée au muscle de sardines

conservées sous glace. Elle a permis d'évaluer la fraîcheur et la qualité de la sardine durant ce stockage sous glace (Rodriguez-Casado, Carmona *et al.* 2007).

3. Les méthodes microbiologiques

Le but des examens microbiologiques des produits de la pêche est d'évaluer la présence possible de bactéries ou d'organismes pouvant avoir des conséquences sur la santé publique et de donner une idée de la qualité hygiénique du poisson incluant la rupture de la chaîne du froid, l'hygiène au cours de la manutention et du traitement. Les données microbiologiques ne fournissent pas en général d'informations sur l'appétence ou la fraîcheur.

Les examens bactériologiques traditionnels sont complexes, longs, coûteux et requièrent des compétences pour leur exécution et l'interprétation des résultats.

4. Les méthodes chimiques et biochimiques

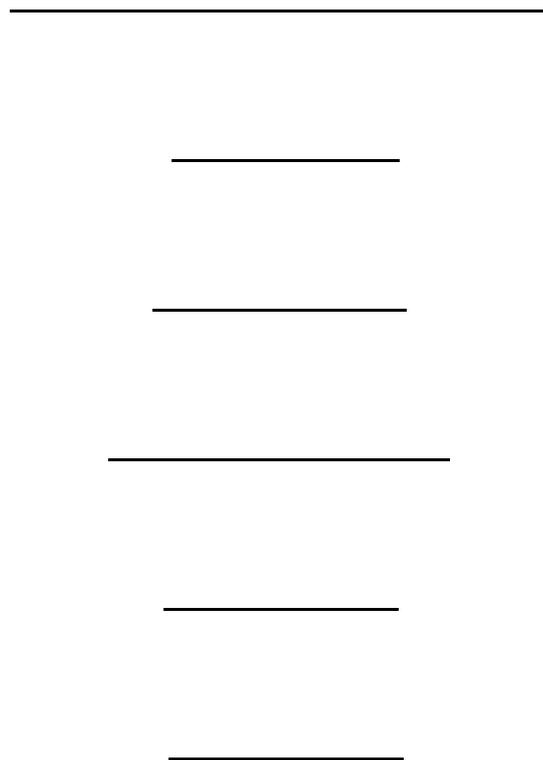
Les méthodes chimiques et biochimiques pour l'évaluation de la qualité des produits de la mer sont plus fiables et plus précises, depuis qu'ils éliminent les opinions personnelles sur la qualité des produits. Ces méthodes objectives doivent être en corrélation avec la qualité sensorielle, et les composés chimiques qui sont déterminés doivent augmenter ou diminuer comme la détérioration microbienne ou les procédés d'autolyse (Huss 1995). A l'heure actuelle, la méthode la plus utilisée pour évaluer la fraîcheur du poisson est combinée avec plusieurs mesures obtenues par différentes méthodes et corrélée les résultats avec l'analyse sensorielle (Olafsdóttir, Martinsdóttir *et al.* 1997b). Les procédures les plus utilisées pour mesurer objectivement la qualité des produits de la mer sont données dans ce paragraphe.

4.1 ATP et ses produits de dégradation

La *rigor mortis* se produit dans les tissus musculaires après la mort et est associée à la rigidité du muscle ou de la chair. Ce processus résulte de la dégradation de l'adénosine triphosphate (ATP), qui est la principale source d'énergie pour l'activité métabolique. Il a été indiqué qu'il existe une corrélation entre le catabolisme nucléotidique et la perte de fraîcheur. La dégradation nucléotidique reflète à la fois l'action des enzymes autolytiques et l'action bactérienne (Huss 1995). La dégradation de l'ATP jusqu'à l'acide urique a été

schématisée dans le chapitre précédent (Figure 1 p 28). La phase initiale de la réaction catalysée par des enzymes endogènes se met en place rapidement, conduisant à l'accumulation d'adénosine diphosphate (ADP) et inosine monophosphate (IMP). L'oxydation de l'hypoxanthine (Hx) en xanthine et acide urique est plus lente et est le résultat de l'activité des enzymes endogènes et de l'activité microbienne (Kennish and Kramer 1987). L'IMP est associé à la saveur de poisson frais, alors que l'inosine et Hx reflète une mauvaise qualité (Howgate 2005).

Les concentrations d'ATP et des ces produits de dégradation ont été utilisés comme indicateurs de fraîcheur de plusieurs espèces de poisson (Chang, Chang *et al.* 1998; Kyrana and Lougovois 2002; Özogul, Özyurt *et al.* 2005; Özogul, Özogul *et al.* 2006; Kuda, Fujita *et al.* 2007).



La valeur K comprend les produits intermédiaires de dégradation et varie suivant les espèces de poissons (Ryder, Buisson *et al.* 1984; Murata and Sakaguchi 1986). Depuis qu'il a été démontré que les nucléotides adénosine sont presque convertis en IMP après 24h post mortem, Karube, Matsuoka *et al.* (1984) ont proposé une valeur K_i , qui exclue l'ATP, l'ADP et

l'AMP. Cependant, dans plusieurs espèces ATP, ADP et AMP demeurent même après 2 semaines (Karube, Matsuoka *et al.* 1984). Avec certaines espèces, il a été montré que la valeur K_i augmentait rapidement puis restait constante même si la qualité/fraicheur continuait de diminuer (Luong, Male *et al.* 1991). Par conséquent la valeur K est supérieure aux autres. La valeur G proposée par Burns, Ke *et al.* (1985) est supérieur à la valeur K_i dans le cabillaud d'atlantique conservé sous glace. En plus, des valeurs H ont été décrites par Luong, Male *et al.* (1992) comme un indice de la qualité/fraicheur. La valeur H , dans le cabillaud du pacifique conservé sous glace, a tendance à augmenter régulièrement, indiquant sa supériorité sur la valeur K_i (Luong, Male *et al.* 1992). Gill, Thompson *et al.* (1987) ont aussi proposé la valeur Fr pour le thon à nageoire jaune. Ces résultats montrent que mesurer la concentration d'un seul produit de dégradation nucléotidique pour déterminer la qualité de fraîcheur d'un poisson n'est pas approprié, mais de mesurer la concentration de l'ATP et de ces produits de dégradation peut être utile dans la détermination de la qualité de la fraîcheur (Botta 1995). La valeur P a été décrite par Shahidi, Chong *et al.* (1994). La détermination des valeurs G et P ont été utile avec les poissons maigres. Cependant, c'est difficile d'obtenir des valeurs G et P significatives avec les poissons gras détériorés en raison du rancissement. Il a été reporté que les valeurs K et les autres (excepter F) augmentent linéairement dans le turbot (Özogul, Özogul *et al.* 2006), la dorade royale (Alasalvar, Taylor *et al.* 2002) et l'anguille (Özogul, Özyurt *et al.* 2005). Le taux de dégradation nucléotidique varie selon les espèces, le stress à la capture, la manipulation, la saison et les conditions de stockage (Luong and Male 1992).

Plusieurs méthodes ont été proposées pour l'analyse des nucléotides mais la méthode par HPLC reste la plus fiable d'entre elles. Les valeurs K , K_i , G , P et H ont été calculées selon les procédures décrites par Saito, Arai *et al.* (1959), Karube, Matsuoka *et al.* (1984), Shahidi, Chong *et al.* (1994), Luong, Male *et al.* (1992) et Gill, Thompson *et al.* (1987).

4.2 pH

Le pH est aussi un paramètre important qui montre la diminution de la qualité de la chair durant le stockage. Le procédé technologique est influencé par le développement de la *rigor*, la température post mortem, et le pH (Greaser and Pearson 1999). Le pH post mortem varie de 5,5 à 7,1 suivant la saison, les espèces et d'autres facteurs (Haard 2002). Un pH faible est

utilisé comme un indicateur de stress au moment de l'abattage de beaucoup d'animaux. Un pH initial faible est associé avec une augmentation de stress à l'abattage (Morzel and Van De Vis 2003; Özogul, Özyurt *et al.* 2005). C'est causé par la diminution des réserves énergétiques, principalement le glycogène, avec la production de lactate. Puisque l'activité des enzymes dépend du pH, il affecte les réactions qui se déroulent pendant le stockage du poisson. Un pH relativement faible peut entraîner une diminution des liaisons d'eau dans les myofibrilles, affectant la diffusion de lumière et l'apparence du poisson. Un pH faible favorise aussi l'oxydation des myoglobines et des lipides (Haard 2002).

4.3 Azote Basique Volatil Total (ABVT)

Dans les produits de la mer, l'ABVT comprend principalement la triméthylamine (TMA, produit par les bactéries d'altération), l'ammoniac (produit par désamination des acides aminés et des catabolites de nucléotides), la diméthylamine (DMA, produit par les enzymes autolytiques durant la congélation). Ces indicateurs ne sont pas performants sur toutes les espèces. Ce sont plus des indicateurs qui reflètent les stades d'altération plutôt que la fraîcheur mais ils restent encore utilisés de nos jours.

Cet axe de recherche a fait l'objet des premiers travaux (Malle and Poumeyrol 1989) effectués au sein du laboratoire de l'ANSES de Boulogne sur mer, où s'est déroulé la thèse.

Une méthode mesurant l'ABVT et la TMA est détaillée dans les résultats avec l'article 4 : **Leduc F., N'Guessan A., Krzewinski F., Duflos G., Kol O. and Malle P.** "Differentiation of fresh and frozen-thawed fishes (whole and fillets) European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*), Cod (*Gadus morhua*) and salmon (*Salmo salar*) using volatile compounds by solid-phase microextraction gas chromatography- mass spectrometry". Journal of the Science of Food and Agriculture. Submitted: 25-May-2011.

4.4 Triméthylamine (TMA)

A la suite de la mort du poisson, les bactéries agissent sur l'OTMA via l'enzyme OTMA déméthylase pour produire la TMA, qui est considérée comme la principale cause de mauvaises odeurs dans les produits de la pêche (Olafsdottir, Martinsdottir *et al.* 1997; Olafsdóttir, Martinsdóttir *et al.* 1997). La TMA peut être utilisée comme un indicateur de

l'altération mais pas comme un indicateur de fraîcheur. Cependant son utilité dépend de la période de l'année, de la localisation de la pêche, du stade de l'altération, du type de stockage et procédé, et des méthodes d'analyses employées.

Plusieurs méthodes analytiques ont été développées pour mesurer la TMA, DMA ou encore ABVT : la distillation à vapeur (Malle and Poumeyrol 1989), la microdiffusion Conway et titration (Conway 1947), une méthode colorimétrique, la photométrie (Zhi, Rios *et al.* 1995), une méthode HPLC (Malle, Valle *et al.* 1996), une méthode GC (Veciana-Nogues, Albalá-Hurtado *et al.* 1996), une méthode d'électrophorèse capillaire (Timm and Jørgensen 2002), une méthode de débit d'injection de diffusion de gaz (Dhaouadi, Monser *et al.* 2007), biocapteur à l'aide de l'enzyme flavin-containing monooxygenase type 3 (Mitsubayashi, Kubotera *et al.* 2004), et capteur semi conducteur basé sur le vert de bromocresol (Pacquit, Lau *et al.* 2006).

4.5 Diméthylamine (DMA)

Comme expliqué précédemment, le poisson contient de l'OTMA, qui est converti en TMA par les bactéries. Durant le stockage réfrigéré ou congelé du poisson, quand la croissance bactérienne est inhibée, cette réaction est remplacée par l'action d'une enzyme pour se convertir lentement en DMA et formaldéhyde (Huss 1995; Simeonidou, Govaris *et al.* 1997). La formation de ces produits peut causer des changements de qualité importante durant une congélation longue. La quantité de DMA produite dépend de l'espèce, de la température et du temps de stockage. La DMA peut être utilisé comme un indicateur d'altération durant la congélation de plusieurs espèces comme le merlu (Rey-Mansilla, Sotelo *et al.* 2001).

4.6 Formaldéhyde

Le formaldéhyde contenu dans les produits de la pêche est considéré comme non toxique, mais qui peut réagir avec plusieurs composés chimiques comme des résidus d'acide aminé et des composés de faible poids moléculaires, qui entraîne la dénaturation des protéines (Nielsen and Jorgensen 2004). Le formaldéhyde contenu dans les produits de la pêche congelés est généralement utilisé comme un indicateur d'altération, spécialement pour les

gadidés. Bianchi, Careri *et al.* (2007) ont réalisé des études sur la quantification de formaldéhyde sur différentes espèces de poisson avec différents modes de conservation.

4.7 Amines biogènes

La concentration d'amines biogènes a été rapportée comme étant une méthode fiable de mesure de la qualité du poisson, selon les espèces examinées (Yamanaka, Shiomi *et al.* 1989; Rodríguez, Besteiro *et al.* 1999; Özogul, Taylor *et al.* 2002). La formation d'amines biogènes résulte de la dégradation microbienne durant un long stockage du poisson, et la concentration de celles-ci augmente avec la durée de stockage (Da Silva, Pinho *et al.* 2002; Özogul and Özogul 2006; Özogul, Özogul *et al.* 2006). Les amines biogènes sont générées par la décarboxylation microbienne des acides aminés libres spécifiques dans le poisson et les crustacés (Rawles, Flick *et al.* 1996). Les plus importantes amines biogènes produites après la mort du poisson sont l'histamine, la putrescine, la cadaverine, la tyramine, la tryptamine, la 2-phényléthylamine, la spermine, la spermidine et l'agmatine. L'importance d'estimer la concentration en amines biogènes dans le poisson et les produits à base de poisson est liée à leurs impacts sur la santé humaine et la qualité du produit. Depuis que nous savons que les amines sont produites par l'altération bactérienne, leurs teneurs sont considérées comme des indices de l'altération plutôt que de la fraîcheur (Mackie, Pirie *et al.* 1997). De plus, les désavantages d'utiliser les amines biogènes comme un indice de qualité de la fraîcheur sont que leurs absences n'indiquent pas nécessairement un produit de haute qualité (Gill 1990). Parmi les amines biogènes, l'histamine est potentiellement dangereuse et est l'agent causant des intoxications histaminiques (Morrow, Margolies *et al.* 1991). D'autres, surtout putrescine et cadaverine, sont rapportés pour augmenter la toxicité de l'histamine. La consommation de produits de la mer contenant de fortes quantités de ces amines peut avoir des effets toxicologiques, et peut encore plus poser des problèmes pour les personnes sensibles (Bodmer, Imark *et al.* 1999). Les concentrations dangereuses d'histamines sont 5 mg / 100 g de poisson pour les USA (Food and Drug Administration 1996) et 20 mg / 100 g pour l'UE (EEC 1991). La teneur en amines biogènes dans le poisson dépend de l'espèce, de la teneur en acides aminés libres, de la présence de microorganismes décarboxylase positif, du moment de la capture et du contenu de la flore microbienne dans l'estomac à la mort qui varie suivant les saisons (Rodríguez, Besteiro *et al.* 1999).

Par le biais des réactions de décarboxylation, la tyrosine produit la tyramine, l'histidine l'histamine, et l'arginine conduit à la putrescine. La cadaverine est dérivée de la lysine, la tryptamine du tryptophane, et la 2-phényléthylamine de la phénylalamine. La putrescine est aussi un intermédiaire des voies métaboliques qui mène à la spermidine et spermine (Moret and Conte 1996). L'indice de qualité QI et l'indice d'amine biogénique (BAI) ont été proposées par Mietz et Karmas (1977) et Veciana-Nogues *et al.* (1997) pour déterminer la qualité du poisson. Les formules sont les suivantes :

Qi est basée sur les augmentations de la putrescine, la cadaverine et l'histamine et les diminutions de la spermine et la spermidine durant le stockage du poisson, alors que la BAI est basée seulement sur les augmentations de l'histamine, la putrescine, la cadaverine et la tyramine. Il existe plusieurs techniques d'analyse utilisées pour déterminer la concentration en amines biogènes, dont la chromatographie sur couche mince (Shalaby 1995), la HPLC (Mietz and Karmas 1977; Hwang, Chang *et al.* 1997), la GC (Feier and Goetsch 1993), l'électrophorèse capillaire (Arce, Rios *et al.* 1997), et l'utilisation de biocapteurs (Poli, Zampacavallo *et al.* 2000). Parmi ces techniques, la CLHP est la plus performante car elle est plus sensible, fiable et reproductible.

4.8 Méthodes de mesures de l'altération des lipides

4.8.1 Analyse des produits formés par la lipolyse

Les produits résultants de l'hydrolyse enzymatique des lipides sont des acides gras libres, des monoglycérides, des diglycérides et des lysophospholipides.

La chromatographie en phase gazeuse des lipides neutres triméthylsilylés puis injectés permet de séparer et quantifier les différents composés résultant de la lipolyse des triglycérides. Cependant ce type d'analyse nécessite d'extraire les lipides, puis les classes de

lipides sur colonne de silice par exemple. Enfin les lipides neutres sont triméthylsilylés suivi de l'injection des dérivés TMS en chromatographie en phase gazeuse.

Les glycérides partiels peuvent également être séparés par chromatographie en couche mince en présence d'étalons internes. Les différentes fractions sont récupérées après séparation et sont injectées en chromatographie en phase gazeuse afin de séparer, identifier et quantifier les esters méthyliques d'acides gras de chaque fraction.

La séparation et l'identification des phospholipides de la fraction de lipides polaires peuvent, par exemple, être réalisée par HPLC afin de déterminer la formation des lysophospholipides. D'autres techniques permettent de quantifier globalement les acides gras libres présents dans une huile. Il s'agit de méthodes titrimétriques telle que la méthode normalisée ou colorimétrique. Par exemple, le dosage colorimétrique des acides gras libres qui forment un savon avec l'acétate de cuivre en présence de pyridine. Le savon ainsi formé possède un maximum d'absorption dans le benzène à une longueur d'onde de 715 nm (Lowry and Tinsley 1976).

La spectroscopie infrarouge permet de déterminer la teneur en acides gras libres au sein d'huiles et d'extraits lipidiques. Cependant la méthode est peu sensible car le groupe carboxylique C=O présente une bande à 1711 cm^{-1} , qui se traduit par un épaulement lorsque la proportion d'acides gras libres est faible par rapport aux lipides totaux (Guillén and Cabo 1997).

4.8.2 Mesure de l'oxydation des lipides

Lors des études de cinétique d'oxydation des lipides, l'état d'avancement de la réaction peut être évalué par la mise en évidence de la disparition des substrats de l'oxydation.

Afin de déterminer l'état d'oxydation d'un aliment il est nécessaire de mesurer simultanément les quantités des produits primaires et secondaires résultant de l'oxydation des lipides. Une grande variété de méthodes est disponible en fonction de l'information et de la précision recherchées et du substrat étudié (Dobarganes and Velasco 2002). Seules les plus fréquemment rencontrées dans les études portant sur l'oxydation des lipides de poissons sont présentées.

Analyse des substrats de l'oxydation

L'étude de la consommation d'oxygène permet de suivre les phases d'initiation et de propagation de la réaction. Les méthodes de mesure sont manométriques (mesure de la pression partielle en oxygène), polarographique (mesure de la consommation d'oxygène), chromatographiques ou gravimétriques par mesure de l'augmentation du poids consécutive à la fixation d'oxygène. Ce type d'analyse est employé pour déterminer les cinétiques d'oxydation des lipides en système modèle pour des tests accéléré d'oxydation ou dans le cas de conservation d'échantillons en emballage étanche. Mais il n'est pas utilisé pour déterminer les degrés d'oxydation d'un produit.

La cinétique de disparition d'un ou plusieurs acides gras peut être étudiée. L'analyse des acides gras est réalisée après extraction des lipides, méthylation des acides gras et chromatographie en phase gazeuse. La difficulté consiste à extraire quantitativement la matière grasse et à minimiser les pertes au niveau des réactions de méthanolyse (Berset and Cuvelier 1996).

Mesure des produits primaires

Les produits primaires de l'oxydation des lipides peuvent être analysés à l'aide de nombreuses techniques présentant de grandes différences au niveau de leur sensibilité, leur facilité d'utilisation, et la nature de la matrice. Si certaines techniques fonctionnent sur des systèmes « simples », comme des huiles, elles ne sont pas forcément adaptées à des systèmes plus complexes tels que le poisson et ses produits transformés.

Détermination des diènes conjugués

Les produits primaires de l'oxydation des lipides contenant des doubles liaisons conjuguées peuvent être quantifiés par spectrométrie UV (Corongiu, Banni *et al.* 1994). En effet, l'oxydation des acides gras polyinsaturés s'accompagne d'un déplacement des doubles liaisons qui passent de la position malonique à la position conjuguée. Les diènes conjugués absorbent à 232-233 nm et les triènes conjugués à 268 nm, ils peuvent être déterminés par mesure de l'absorbance à ces longueurs d'onde. Cette méthode est rapide une fois les lipides du produit à analyser extraits, mais peu spécifique (Gray 1978).

Elle convient bien pour le suivi des premiers stades de l'oxydation des lipides dans des systèmes simplifiés ou pour des systèmes biologiques. Cependant cette mesure est moins

adaptée aux milieux complexes tels que le muscle ou des aliments solides dans lesquels les risques d'interférences sont nombreux. Un fort bruit de fond résultant d'interférences entre les lipides natifs et les diènes conjugués peut être observé et perturber les mesures (Berset and Cuvelier 1996). La détermination d'un indice ($I=A_{233\text{ nm}}/A_{215\text{ nm}}$) proposé par Klein (1970) permet de limiter l'interférence de ce bruit de fond en mesurant l'absorbance à 214-215 nm correspondant au point isobestique des lipides.

Dosage des hydroperoxydes

Les hydroperoxydes sont des produits intermédiaires instables qui sont rapidement dégradés pour donner des composés hydroxylés et carbonylés. Les concentrations en hydroperoxydes mesurées correspondent en fait à la différence entre formation et décomposition des peroxydes. Les concentrations en hydroperoxydes peuvent être déterminées à l'aide de nombreuses méthodes à adapter en fonction du substrat étudié. Deux groupes de méthodes peuvent être distingués : les méthodes analytiques permettent de déterminer la concentration en hydroperoxydes et les techniques chromatographiques permettant d'identifier et de quantifier la nature et les teneurs en hydroperoxydes spécifiques (Dobarganes and Velasco 2002). Ces méthodes chromatographiques comme la chromatographie liquide haute performance couplée à la détection par chemiluminescence (Koskas, Cillard *et al.* 1983; Yang, Qiang *et al.* 1991) et la chromatographie en phase gazeuse (Van Kuijk, Thomas *et al.* 1990) couplée à la spectrométrie de masse et des méthodes spectroscopiques comme la résonance magnétique nucléaire (Frankel, Neff *et al.* 1990) et infra rouge (Ruíz, Canada *et al.* 2001) permettent de caractériser les hydroperoxydes dans les systèmes biologiques. Ces techniques sont reproductibles et sensibles mais complexes et inadaptées à des analyses de routine. La spectroscopie en proche infrarouge appliquée directement sur des lipides est rapide, non destructive et les résultats sont bien corrélés avec les méthodes iodométriques et colorimétriques, mais l'appareillage reste coûteux (Yildiz, Wehling *et al.* 2003).

Les méthodes les plus utilisées pour déterminer les teneurs en hydroperoxydes sont les méthodes iodométriques et colorimétriques. La méthode iodométrique consiste à mesurer l'iode produit par l'oxydation de l'iodure de potassium par les peroxydes présents. L'iode formé est dosé par une solution titrée de thiosulfate de sodium. Cependant, cette méthode normalisée nécessite une quantité de lipides assez importante. De plus, l'oxygène de l'air, la

présence de lumière et l'absorption de l'iode par les acides gras insaturés interfèrent sur le dosage (Frankel 1998). Les méthodes colorimétriques sont basées sur le principe de l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} par les hydroperoxydes présents. La méthode au thiocyanate de fer (Shantha and Decker 1994) est basée sur l'oxydation des ions ferreux en ions ferriques en présence de peroxydes suivi d'une mesure spectrophotométrique du complexe formé entre les ions ferriques et le thiocyanate. La méthode au xylénol orange (Wolff and Lester 1994) repose sur l'oxydation en milieu acide des ions ferreux en ions ferriques par les hydroperoxydes de l'échantillon. Le complexe coloré formé entre les ions ferriques et le xylénol orange possède un maximum d'absorption à 560-580 nm. Ces différentes techniques colorimétriques ont été mises au point sur des huiles purifiées (Burat and Bozkurt 1996) ou des liposomes (Jiang, Woollard *et al.* 1991). Elles sont sensibles, rapides et nécessitent une plus faible quantité de lipides que la méthode iodométrique mais elles requièrent une extraction préalable des lipides. Or l'extraction des lipides effectuée en présence d'oxygène, peut générer elle-même des hydroperoxydes et/ou induire la décomposition des hydroperoxydes présents. Une méthode modifiée du dosage des hydroperoxydes par le xylénol orange réalisée sur des extraits tissulaires de mammifères sans extraction des lipides préalable a été proposée par Hermes-Lima *et al.* (1995).

Mesure des produits secondaires

Dosage des composés aldéhydiques

La nature des aldéhydes et leurs proportions relatives dépendent beaucoup de l'acide gras oxydé. Deux méthodes colorimétriques sont employées couramment pour les doser : l'indice de *p*-anisidine et le test à l'acide thiobarbiturique.

La détermination de l'indice de *p*-anisidine repose sur le principe qu'en milieu acétique la *p*-anisidine donne un complexe coloré en jaune avec des diénals conjugués. L'indice de *p*-anisidine est défini comme 100 fois l'absorbance mesurée à 350 nm, d'une solution résultant de la réaction de 1 g de lipides dans 100 mL de solvant contenant la *p*-anisidine.

Le test à l'acide 2-thiobarbiturique repose sur la formation d'un complexe coloré rose résultant de la réaction entre une molécule de malonaldéhyde et deux molécules d'acide 2-thiobarbiturique. Le complexe coloré formé absorbe à 532-535 nm. De nombreuses adaptations de cette méthode ont été proposées (Vincke, 1970; Guillén-Sans and Guzmàn-

Chozas, 1998; Wang *et al.* 2002). Des aldéhydes tels que les 4-hydroxy-alcenal, les 2,4-alcadiénal, les 2-alcenal réagissent également avec l'acide 2-thiobarbiturique pour former un complexe coloré (Sun *et al.* 2001). C'est la raison pour laquelle le terme de « substances réactives à l'acide thiobarbiture (sr-TBA) est employé. La réaction du TBA est réalisée en milieu acide (pH 1-2) et à haute température (70°C-100°C) pour accélérer la vitesse de réaction et augmenter la sensibilité. Certaines substances de nature glucidique sont susceptibles d'interférer avec le test.

Dosage des composés volatils

Le dosage des composés volatils sera expliqué dans le chapitre IV.

4.9 Analyse des composés résultant de l'interaction entre les produits d'altération des lipides et les protéines

4.9.1 Détermination des composés fluorescents

La fluorescence est le phénomène qui résulte de l'émission de photons par une molécule après excitation de cette molécule par une radiation lumineuse dans l'UV ou le visible. La fluorescence représente un outil d'analyse puissant du fait de sa grande sensibilité et spécificité. Cette technique permet d'obtenir des informations sur la présence de molécule fluorescente et sur leur environnement.

Deux dispositifs permettent de mesurer l'intensité de fluorescence : la spectroscopie de fluorescence à angle droit pour laquelle l'observation de la luminescence est faite à 90° de la direction d'excitation, et la spectroscopie de fluorescence en mode frontal pour laquelle la luminescence est mesurée sur la même face que celle qui reçoit l'excitation. La première technique est adaptée à l'étude des solutions tandis que la deuxième permet l'étude de milieu turbide ou pâteux.

Les chromophores fluorescents produits à partir de phospholipides oxydés et d'esters d'acides gras oxydés en présence de phospholipides possèdent une fluorescence maximale à une longueur d'onde d'excitation (λ_{ex}) de 365 nm et une à longueur d'onde d'émission (λ_{em}) de 435-440 nm. Les bases de Schiff résultant d'interaction avec le malonalaldéhyde et les phospholipides présente une fluorescence maximale à $\lambda_{ex} = 400$ nm et $\lambda_{em} = 475$ nm. Des

spectres de fluorescence à des $\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$ et $\lambda_{ex} = 420 \text{ nm}$ résultent d'interactions entre les produits primaires et secondaires de l'oxydation des lipides avec l'ADN en présence de métaux de transition et d'agents réducteurs. Les bases de Schiff résultent d'interaction entre les produits d'oxydation des lipides et différentes molécules présentes aboutissant à un mélange de chromophores aux propriétés fluorescentes très proches.

Différentes techniques de fluorescence ont été utilisées pour déterminer les interactions entre les produits d'oxydation des lipides et les autres composés au sein du muscle de poisson au cours de la conservation. La mesure en fluorescence à angle droit est réalisée sur la phase organique et/ou aqueuse résultant de l'extraction des lipides par un mélange chloroforme/méthanol. Une solution de sulfate de quinine est utilisée pour calibrer l'appareil.

Ce type d'analyse réalisé sur du thon après cuisson et au cours de la conservation des sardines a montré que le rapport des intensités de fluorescence mesurées à $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 393/463 nm et 327/415 nm est un bon indicateur de la qualité du poisson (Aubourg, Sotelo *et al.* 1998). La fluorescence observée est attribuée aux composés de type base de Schiff résultant des interactions entre les protéines et les produits d'oxydation des lipides.

La mesure de la fluorescence en mode frontal est réalisée directement sur l'échantillon (solide, pâteux, visqueux...) et ne nécessite donc pas d'extraction préalable. Cette technique utilisée sur du muscle de sardine délipidé mis en présence d'huile de sardine à permis de mettre en évidence la présence de deux pics de fluorescence (I : ex.370 nm, em.460 nm et II : ex.450 nm, em.500 nm). Le deuxième pic est corrélé aux mesures d'altération des lipides (Hasegawa, Endo *et al.* 1992). Les mesures de fluorescence en mode frontal sur des filets de merlan bleu conservé 249 jours à -5°C , -10°C , -15°C et -20°C indiquent une augmentation de l'intensité de fluorescence mesurée à 370/460 nm, d'autant plus rapide que la température de conservation est élevée (Davis 1982). Une étude de Dufour, Frenchia *et al.* (2003) a montré la possibilité d'utiliser la spectrométrie en fluorescence frontale pour déterminer un indice de qualité des filets de poisson avant leur transformation.

4.9.2 Détermination de l'altération des protéines

Différentes méthodes peuvent être mises en œuvre afin de déterminer le niveau d'altération des protéines résultant d'interactions avec les produits d'altération des lipides.

La méthode la plus couramment utilisée consiste à déterminer la teneur en groupements carbonyles des protéines. La méthode conventionnelle est basée sur une méthode colorimétrique qui mesure la formation d'hydrazone après réaction de la dinitrophenylhydrazine (DNP) avec les groupements carbonyles (Levine, Garland *et al.* 1990). Cependant cette méthode nécessite de nombreuses étapes de lavage responsables d'une mauvaise reproductibilité. Afin d'augmenter la reproductibilité et la sensibilité de cette méthode, une technique ELISA basée sur la reconnaissance du complexe protéine-DNP par un anticorps anti-DNP biotinylé a été mise au point par Buss, Chan *et al.* (1997). Les résultats de cette méthode sont en accord avec ceux obtenus par la méthode colorimétrique, mais la méthode ELISA est plus sensible et nécessite une plus faible quantité de protéines. L'altération des protéines peut également être évaluée en ciblant les acides aminés particulièrement touchés par l'oxydation.

Chapitre IV : Les composés volatils

Les composés volatils jouent un rôle important dans les caractéristiques de qualité de l'odeur et de l'acceptabilité du consommateur au poisson. La compréhension du développement de l'odeur par des processus chimiques, biochimiques et microbiologiques dans le poisson est importante pour permettre de contrôler les différents facteurs intrinsèques qui influencent la formation de produits volatils d'altération et par conséquent la qualité du produit marin.

1. Le développement de l'arôme du poisson

Un aperçu des changements durant la manipulation et le traitement influençant le développement de l'arôme dans le poisson est généralisé dans la Figure 5. Initialement, les changements sont dominés par l'activité autolytique incluant la dégradation des nucléotides, la formation du gout, inosine active, l'accumulation de l'hypoxanthine (Hx), la diminution du pH et activité des enzymes endogènes, suivie par les procédés d'oxydation. Finalement, la prolifération des organismes spécifiques d'altération (SSO : specific spoilage organisms) résultent dans le développement des composés volatils, contribuant aux changements de l'altération et donc influençant la fraîcheur et la qualité du produit final de poisson réfrigéré (Botta 1995; Huss 1995; Gram and Dalgaard 2002).

Il est bien établi que l'enzyme lipoxygénase (LOX) convertie les acides gras polyinsaturés en composés aromatiques volatiles qui permet le développement de l'arôme de plantes du poisson frais (Josephson, Lindsay *et al.* 1984; Hsieh, German *et al.* 1988). D'autres pro-oxydants, comme les hémoglobines et les myoglobines, sont aussi impliqués dans l'initiation des procédés oxydatifs du muscle de poisson (Richards and Hultin 2002), conduisant à la formation de produits secondaires et aux mauvaises saveurs (Lindsay 1990). La dégradation des constituants solubles du muscle comme les protéines sarcoplasmiques et le métabolisme microbien contribuent aux changements du profil aromatique du poisson au cours de son stockage. L'ensemble des composants qui sont dégradés et la cause de mauvaises saveurs en raison de la croissance microbienne sont essentiellement des substances solubles dans le muscle. Ils sont composés de divers composants non protéiques

azotés, incluant des petits peptides comme la carnosine et anserine, des acides aminés, la créatine, l'OTMA et des nucléotides. Plusieurs de ces composés influencent le goût du poisson. La protéolyse joue un rôle critique dans le changement post mortem, entraînant des changements de texture indésirables dans le poisson. L'activité des enzymes endogènes influence aussi sur la détérioration du muscle du poisson (Delbarre-Ladrat, Verrez-Bagnis *et al.* 2004).

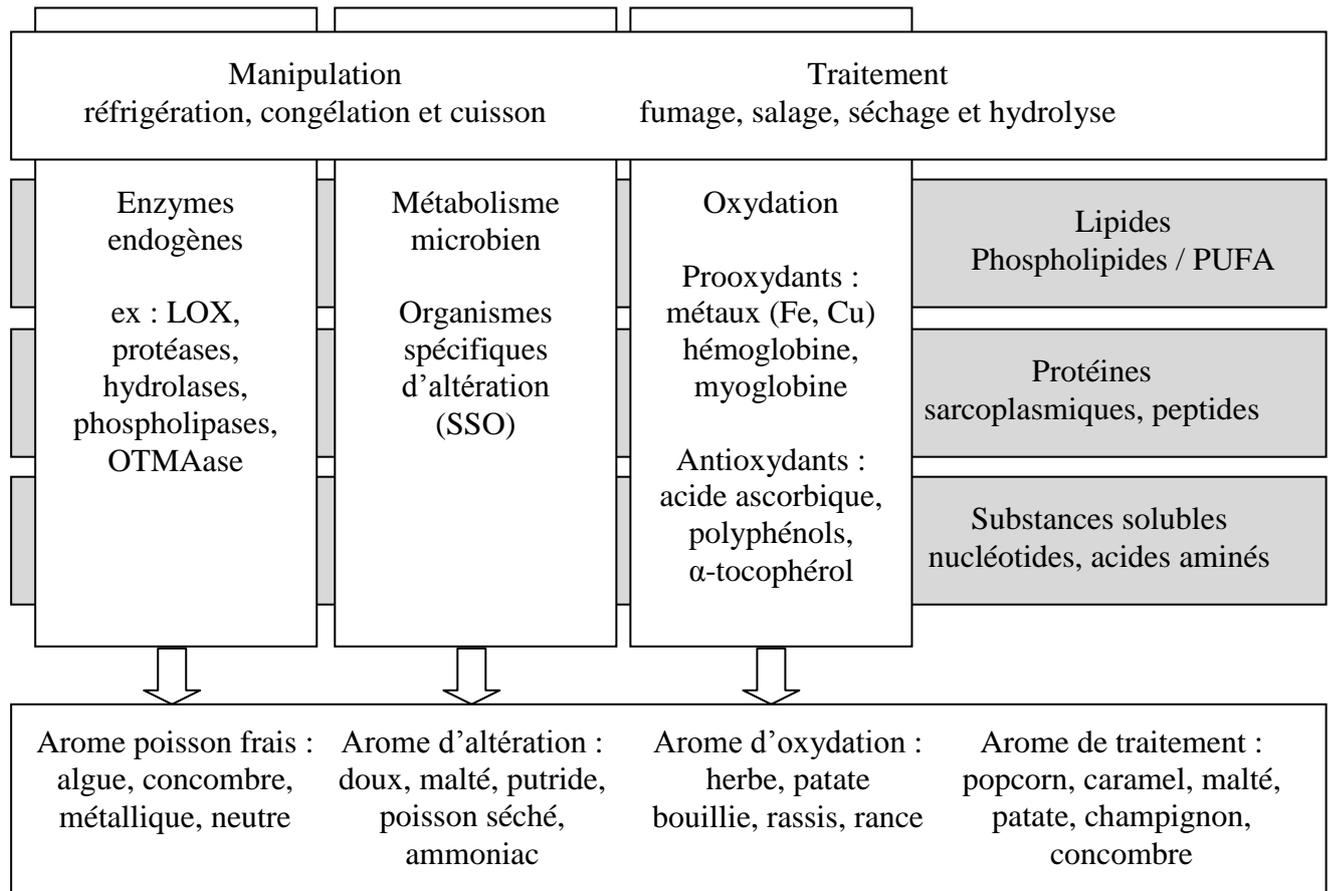


Figure 5 : Schéma des changements durant la manipulation et le traitement influençant le développement de l'arôme dans le poisson

2. L'odeur du poisson

La flaveur délicate du poisson est principalement due aux composés volatils et aux substances du goût actif dans la phase aqueuse, alors que les volatils résultants des lipides font varier la flaveur spécifique de différentes espèces de poisson. Le poisson fraîchement capturé contient peu de composés volatils et est pratiquement inodore. Peu après la pêche ou récolte, l'activité des lipoxygénases sur la peau et les branchies des poissons marins et

d'eaux douces jouent un rôle dans la formation des composés volatils odorants, contribuant aux arômes plaisants, vertes du poisson (German, Chen *et al.* 1985; Hsieh, German *et al.* 1988). Les composés qui contribuent aux odeurs caractéristiques de plante, de concombre, de melon et de champignon sont des composés carbonylés insaturés et alcools avec six, huit ou neuf atomes de carbones qui proviennent des acides gras polyinsaturés des lipides du poisson via l'activité de lipoxygénases (Josephson and Lindsay 1986; Milo and Grosch 1996; Durnford and Shahidi 1998). Josephson *et al.* (1986) résume l'apparition des composés volatils dans les espèces marines et d'eaux douces puis conclut que quatre composés communs aux espèces marines : hexanal, 1-octen-3-ol, 1,5-octadien-3-ol et 2,5-octadien-1-ol sont responsables d'odeurs faibles et modérées. D'autre part, les composés en C9 carbonylés comme le 2,6-nonadiénal, qui ont de potentielles odeurs vertes, de plantes, de concombre et de melon sont caractéristiques des espèces d'eaux douces. Les arômes de poissons frais sont caractérisés par des notes marines, iodées, douces, vertes, fines, des odeurs de melon, de plantes qui sont facilement reconnaissables et très prisées par le consommateur (Josephson and Lindsay 1986; Prost, Hallier *et al.* 2004).

L'odeur globale perçue dépend du niveau des composés influents et de leurs seuils d'odeur avec de possibles effets de synergie. Plusieurs composants sont désirables à des niveaux faibles, mais si leurs concentrations augmentent, ils peuvent contribuer aux mauvaises odeurs. Un exemple est pour les alcools et les carbonylés à longues chaînes qui présentent des notes de plantes caractéristiques du poisson frais mais quand leurs accumulations atteignent un niveau élevé due à l'auto-oxydation, ils contribuent à l'odeur oxydée et de poisson dans les poissons périmés (Josephson 1991). Par exemple pour des crevettes qui ont une mauvaise saveur iodée associée au bromophénol (Whitfield, Last *et al.* 1988). Cependant, le bromophénol à un certain niveau semble contribuer aux saveurs marines et iodées recherchées dans les produits de la mer (Boyle, Lindsay *et al.* 1993).

Par contraste avec le poisson frais, le poisson altéré présente des notes rances, putrides, de sulfure et d'ammoniac (Josephson and Lindsay 1986; Durnford and Shahidi 1998). Sous l'influence de la cuisson, des procédés et du stockage les composés volatils du poisson changent énormément. Pendant le stockage du poisson, l'activité microbienne et l'activité autolytique génèrent et/ou accumulent un certain nombre de composés volatils indésirables, qui peuvent masquer l'arôme du poisson frais. L'accumulation de ces composés

volatils combinés à d'autres composés non-volatils provoque des changements de l'arôme et du goût du poisson conservé (Josephson and Lindsay 1986; Kawai 1996).

Les conditions environnementales et les effets saisonniers comme au niveau de la reproduction peuvent influencer l'odeur de qualité du poisson. Le profil volatil change dans le saumon adulte quand il migre de la mer vers les rivières pour la ponte. Les composés en C9 dérivés de la LOX ont été retrouvés en haute quantité dans les poissons euryhalins et d'eaux douces au moment de la ponte. Les effets saisonniers ont aussi été rapportés pour les capelins, une espèce marine, qui ont une odeur de concombre très caractéristique durant la reproduction. Le 2,6-nonadiénal a été identifié comme le composé qui caractérise le plus l'odeur de concombre du capelin (Olafsdottir, Martinsdottir *et al.* 1997). Des études réalisées au Japon, en prenant en compte les variations saisonnières, indiquent que l'accumulation des hydroperoxydes dans le muscle de poisson est associée à l'arôme de poisson frais. Kaewsrithong, Ushio *et al.* (2001) ont mis en évidence que l'accumulation d'isomères hydroperoxydes étaient des précurseurs du (E)-2-nonenal, (E,Z)-2,6-nonadiénal, et du 3,6-nonadien-1-ol qui caractérisent l'arôme caractéristique de l'éperlan.

Les différents types d'odeurs du poisson

Olafsdottir et Fleurence (1998), cités par Hognadottir (1999), présentent la classification de Lindsay (1990) des principales catégories d'odeurs de poisson :

- odeurs de poisson frais
- odeurs de dégradation microbienne
- odeurs d'oxydation
- odeurs provenant de l'environnement
- odeurs dues au traitement (thermique, fumage, ...)

Les odeurs de poisson frais dominent durant les premiers jours après la pêche puis les produits d'oxydation et les métabolites microbiens prennent le dessus (Hognadottir 1999).

L'activité biochimique des microorganismes contaminateurs amenant la perte de la fraîcheur dépend de facteurs intrinsèques et extrinsèques comme la nature du poisson, la période de frais, les habitudes alimentaires, la température de l'eau, la méthode de pêche, la manipulation et les conditions de stockage (Guillén and Errecalde 2002).

3. L'identification d'indicateurs odorants de qualité

Différentes odeurs caractéristiques se développent dans différentes espèces de poisson durant le stockage. Les poissons gras développent des saveurs et des odeurs rances. Les poissons maigres développent typiquement des odeurs douces, de patates bouillies et d'amine. Et les poissons de la famille des salmonidés développent des odeurs douces, terreuses et de boue. Les composés volatils formés par l'activité microbienne et l'oxydation qui contribuent à ces odeurs, ont été identifiés par des méthodes de chromatographie gazeuse et suggérés comme des indicateurs de qualité. Plusieurs des composés odorants influents qui ont un seuil odorant très bas sont souvent présents en faible concentration, ce qui rend difficile de les détecter par de simples techniques analytiques. Par conséquent, il est utile de surveiller l'ensemble des composés volatils et sélectionner parmi eux de potentiels indicateurs, qui sont présents en fortes concentrations et qui peuvent être quantifiés. Des méthodes rapides peuvent ensuite être utilisées pour détecter des indicateurs ou des classes alternatives de composés si l'ensemble des composés volatils est connu et qu'il existe un lien entre les composés indicateurs et les composés volatils responsables des changements d'odeur et de qualité. Cette approche a été utilisée dans plusieurs études, pendant le stockage du cabillaud (Olafsdottir, Jonsdottir *et al.* 2005) et du saumon fumé (Jonsdottir, Olafsdottir *et al.* 2008). Ils ont mis en évidence un lien entre des composés volatils clés et le changement de l'odeur et de la qualité. De simples composés (comme la TMA ou l'éthanol) et des ensembles de composés (constitués d'alcools, d'amines et de composés soufrés) représentent les différents changements survenant au cours du stockage ont été suggéré par de nombreux auteurs comme des indicateurs de fraîcheur et d'altération (Lindsay, Josephson *et al.* 1986; Alasalvar, Anthony Taylor *et al.* 2005; Olafsdottir, Jonsdottir *et al.* 2005). Des composés volatils identifiés comme indicateurs de qualité peuvent être détectés par des techniques rapides comme le nez électronique qui prédit les changements de qualité de divers espèces de poisson et dans le saumon fumé (Olafsdottir, Martinsdottir *et al.* 1997; Olafsdottir, Jonsdottir *et al.* 2005; Haugen, Chanie *et al.* 2006; Olafsdottir, Lauzon *et al.* 2006a; Olafsdottir, Lauzon *et al.* 2006b). Les principales classes de composés détectées durant le stockage sont des alcools, des aldéhydes, des amines, des acides, des esters et des composés soufrés. Les aldéhydes contribuent le plus aux odeurs d'altération car leur seuil de détection est faible.

4. Les composés volatils rencontrés

Dans notre étude l'ensemble des composés volatils va être étudié, car tous les composés volatils ne sont pas perçus seulement avec l'odeur du fait de leurs seuils de perception. Alasalvar, Anthony Taylor *et al.* (2005) ont répertorié les familles de composés volatils rencontrés le plus souvent dans les produits de la mer.

4.1.1 Les aldéhydes

Le seuil de perception des aldéhydes et des cétones sont généralement plus faibles que ceux des alcools (Josephson, Lindsay *et al.* 1986; Hsieh and Kinsella 1989) cité par Alasalvar *et al.* (2005). C'est pourquoi, les aldéhydes peuvent masquer l'arôme de d'autres substances, même lorsqu'ils ne sont présents qu'à l'état de trace (Spurvey, Pan *et al.* 1998). La majorité des aldéhydes présentent des notes de plante verte, herbe, chocolat noir, malt, gras, floral, pomme, melon, noisettes, fruité. Ils sont présents dans différents poissons frais et coquillages à différentes concentrations. La majorité des aldéhydes proviennent de l'auto-oxydation des lipides. Du fait de leur faible seuil de perception les aldéhydes sont souvent identifiés comme des composés marqueurs en analyse olfactométrique. Ainsi Prost, Hallier *et al.* (2004) ont démontré que l'augmentation des notes rances dans la sardine est associée à l'augmentation de la concentration en heptanal en début d'altération, et à l'hexanal, le (Z)-4-heptenal, le (E)-2-heptenal et le methional après 9 jours de conservation. Aro, Tahovonen *et al.* (2003) observent une augmentation de la teneur en cis-4-heptenal dans le hareng. La même évolution a déjà été observée pour du cabillaud (McGill, Hardy *et al.* 1977), pour de la truite (Milo et Grosh 1993) et de l'huile de poisson (Karahadian and Lindsay 1989). Le précurseur du cis-4-heptenal est le 2,6-nonadiénal formé lors de l'oxydation des n-3 PUFA.

4.1.2 Les cétones

Elles sont produites lors de l'oxydation dégradation des acides gras poly-insaturés, de la dégradation des acides aminés ou de l'oxydation microbienne. Leurs concentrations fluctuent durant l'altération. La 2,3-pentanedione a été identifiée comme marqueur potentiel dans la sardine (Prost *et al.* 2004). Récemment, Iglesias and Medina (2008), ont démontré que ce composé était un potentiel marqueur de l'oxydation des lipides dans la

sardine. Olafsdottir, Jonsdottir *et al.* (2005) ont identifiés la 3-hydroxy-butanone (acétoïne) comme un marqueur potentiel de la fraîcheur dans les filets de cabillaud. La formation du 3-hydroxy-butanone provient de la dégradation bactérienne et est caractéristique de la détérioration des filets de cabillaud. *Photobacterium phosphoreum* a été associée à la formation du 3-hydroxy-butanone ainsi que de la TMA. Olafsdottir, Jonsdottir *et al.* (2005) constate que le taux de 3-hydroxy-butanone augmente plus précocement que celui de la TMA. Le 3-hydroxy-butanone peut être formée à partir de sources de glucides via le pyruvate et le diacétyle.

4.1.3 Les alcools

Les alcools volatils ont généralement une contribution mineure à l'arôme de l'aliment du fait de leur seuil de perception élevé sauf s'ils sont présents en grande quantité ou sont insaturés (Heath and Reineccius 1986). Ils possèdent souvent des notes de plantes, rances et terreuses. Plusieurs auteurs ont constaté une augmentation des concentrations du 1-penten-3-ol et du 3-méthyl-1-butanol au cours de la conservation (Alasalvar, Aishima *et al.* 1995; Alasalvar, Quantick *et al.* 1997; Jorgensen, Huss *et al.* 2001; Aro, Tahovonen *et al.* 2003; Alasalvar, Anthony Taylor *et al.* 2005). Miller III, Scanlan *et al.* (1973) ont observé que lorsque de la chair de poisson stérilisée est inoculée avec *Pseudomonas perolens*, le 1-penten-3-ol et le 3-méthyl-1-butanol sont produits et leurs concentrations augmentent au cours du stockage. Ces deux composés semblent donc être produits par l'altération microbienne. Le 1-penten-3-ol est le composé le plus important dans l'huile de sardine rance (Nakamura, Iida *et al.* 1980). D'après Josephson (1991), l'odeur verte d'herbe du 1-penten-3-ol, identifiée dans le poisson blanc frais est rarement perçue du fait de son seuil de perception relativement élevé (400 µg/kg). Le 1-octen-3-ol, un produit de dégradation de l'acide linoléique hydroperoxyde, a été identifié comme l'un des alcools volatils majoritaire dans les coquillages (Spurvey, Pan *et al.* 1998). Dans la sardine, (Z)-3-hexen-1-ol, 2-nonanol, 2-méthyl-propanol, 1-penten-3-ol et 1-pentanol ont été identifiés comme marqueurs de fraîcheur potentiel (Prost, Hallier *et al.* 2004). Dans les filets de cabillaud l'éthanol est identifié à forte concentration à T0, suivi par une augmentation en 2-méthyl-1-propanol, 3-méthyl-1-butanol et 2,3-butanediol. La production initiale d'éthanol lors de la détérioration du poisson a été attribué à l'utilisation de sources de glucides, tandis que la formation des

alcools tels que le 2-méthyl-1-propanol, 3-méthylbutanol proviennent sûrement de la valine et de la leucine (Lindsay, Josephson *et al.* 1986). La 3-méthyl-1-butanol a été identifié à T10 (10^{ème} jour) puis augmente régulièrement au cours du temps (Olafsdottir, Jonsdottir *et al.* 2005). Iglesias and Medina (2008), ont prouvé que le 1-penten-3-ol et le 1-octen-3-ol étaient des composés volatils associés à l'oxydation des lipides qui pouvaient être de potentiels marqueurs dans la sardine.

4.1.4 Les composés benzéniques

Ils ont été identifiés dans différentes variétés de poissons (Aro, Tahovonen *et al.* 2003; Alasalvar, Anthony Taylor *et al.* 2005) et de coquillages (Chung and Cadwallader 1994; Spurvey, Pan *et al.* 1998). Bien que l'origine des dérivés benzéniques soit incertaine, Hsieh and Kinsella (1989) pensent que pour les écrevisses, ces composés doivent provenir des polluants présents dans l'environnement.

4.1.5 Les terpènes

Le limonène a été identifié dans le poisson (Aro, Tahovonen *et al.* 2003), auquel est ajouté le 3-carène, le bornyl acétate, et le borneol identifiés dans la truite (Alasalvar, Anthony Taylor *et al.* 2005). L'alpha-pinène, le sabinène, le limonène, le p-cymène et le camphor ont été identifiés dans divers coquillages (Vejaphan, Hsieh *et al.* 1988; Tanchotikul and Hsieh 1991). Ces terpènes doivent provenir des algues et plantes par l'intermédiaire de la chaîne alimentaire (Tanchotikul and Hsieh 1991). Les terpènes apportent au poisson des notes de pin, fruitées, citronnées et de carotte.

4.1.6 Les furanes

Les furanes proviennent de la réaction des acides aminés et des sucres via la dégradation de Maillard et Strecker. Alasalvar, Anthony Taylor *et al.* (2005) ont identifiés deux furanes (tetrahydrofuran et 2-éthylfuran) dans la truite.

4.1.7 Les composés soufrés

Les composés soufrés sont formés au cours du process et du stockage. Ils contribuent à des arômes désirables ou indésirables selon leur concentration (Spurvey, Pan *et al.* 1998). La présence de quantités élevées de methanethiol qui possèdent des notes putrides, pourries, soufrées, à généralement un impact négatif sur la qualité des produits de la mer (Spurvey, Pan *et al.* 1998). Le diméthyl sulfide et le diméthyl trisulfide sont souvent présents dans les produits alimentaires et affectent généralement l'arôme global des aliments du fait de leur faible seuil de perception (Buttery *et al.* 1976). Ces deux composés, à des concentrations élevées, sont associés à des odeurs d'oignon, de chou cuit, des odeurs de dégradation, soufrées et putrides, dans les produits marins (Alasalvar 1994; Alasalvar, Aishima *et al.* 1995). Le diméthyl sulfide provient de l'oxydation du methanethiol ou de la dégradation bactérienne de la méthionine (Christensen *et al.* 1981). Le diméthyl trisulfide résulte de l'action microbienne de *Pseudomonas* spp (Miller III, Scanlan *et al.* 1973) ou de la contamination bactérienne (Witfield *et al.*, 1981). Le methanethiol, le diméthyl disulfide et le diméthyl trisulfide ont été identifiés à l'état de trace dans la truite fraîche (Alasalvar, Anthony Taylor *et al.* 2005), puis leur concentration augmente rapidement après 16 jours de stockage. De ce fait, ils sont considérés comme des composés volatils indésirables. Alasalvar, Aishima *et al.* (1995) ont noté la même évolution dans le maquereau (absence dans le maquereau frais, présence dans le maquereau stocké 5 jours à 15°C).

4.1.8 Les acides

Les acides volatils sont formés à partir des acides aminés à travers la dégradation bactérienne, mais l'oxydation des lipides peut aussi être responsable de la production de certains acides (Beddows, Ardeshir *et al.* 1980). Aro, Brede *et al.* (2002) ont mis en évidence que l'acide acétique, avec d'autres acides, l'acide propanoïque, l'acide 2-méthylpropanoïque et l'acide 3-méthylbutanoïque, sont partiellement responsables de l'augmentation de l'odeur désagréable durant le stockage du hareng. Alasalvar, Anthony Taylor *et al.* (2005) observent que la concentration en acide acétique a tendance à augmenter au cours du stockage de la truite et du maquereau respectivement.

4.1.9 Les composés azotés

D'après Bene, Fornage *et al.* (2001), la triméthylamine (TMA), la diméthylamine (DMA) et l'ammoniac sont les trois plus importantes molécules produites lors de la perte de la fraîcheur du poisson. Cependant, l'ammoniac n'est pas un bon indicateur car c'est une molécule présente en très grande quantité dans le poisson, qui augmente significativement au moment où le poisson est déjà considéré comme défraîchi.

Les réactions de formation de ses molécules sont :

OTMA (oxyde de triméthylamine) → DMA + formaldéhyde par action d'enzymes endogènes

OTMA → TMA par action d'enzymes bactériennes

Le formaldéhyde agit sur la texture du poisson en s'imbriquant dans les protéines des fibres musculaires. Cette molécule est donc difficilement quantifiable. Récemment Bianchi, Careri *et al.* (2007) ont réalisé des études sur la quantification de formaldéhyde sur différentes espèces de poisson avec différents modes de conservation. L'OTMA est une molécule qui est retrouvée dans les poissons frais non-surgelés. La DMA est par contre produite essentiellement durant le stockage en congélateur (Lundstrom, Correia *et al.* 1982). Ces molécules n'étant pas retrouvées systématiquement dans toutes les espèces de poisson et pour différentes températures de stockage, d'autres molécules plus spécifiques dans la recherche de marqueurs de qualité sont préférées. La TMA provient de la dégradation de l'oxyde de TMA par des enzymes bactériennes et est donc reliée à la contamination bactérienne des poissons marins réfrigérés (Baixas - Nogueras, Bover - Cid *et al.* 2001). La formation de TMA dans différentes espèces de poissons et de crustacés a été associée à des "off-flavor" de type ammoniaque (Hebard, Flick *et al.* 1982; Kawai 1996). La pipéridine est un produit formé par cyclisation de la cadaverine (Kawai 1996). Des taux élevés en piperidine ont été relevés dans le saumon juste après le frai, et ce taux augmente à l'approche du frai. Du fait de ces "off-flavor" le poisson qui vient de pondre est rejeté pour la consommation (Yamanaka and Matsumoto 1989). Les concentrations en TMA et piperidine augmentent continuellement au cours de la dégradation de la truite (Alasalvar, Anthony Taylor *et al.* 2005).

4.2 Provenances des composés volatils

Les odeurs développées durant le stockage résultent de la détérioration des composés responsables des odeurs de poisson frais par des réactions d'autolyse et microbiennes.

4.2.1 Les microorganismes

Quand les microorganismes commencent à se développer, les composés sulfurés, phénoliques et certains acides gras donnent des arômes et odeurs gâtées et putrides. (Olafsdottir, Jonsdottir *et al.* 2005) ont synthétisés les connaissances sur les organismes d'altération rencontrés dans les produits marins. Les alcools, aldéhydes, cétones, amines et composés soufrés ont été identifiés dans différents produits de la mer durant le stockage réfrigéré et reliés à la croissance d'organismes spécifiques de dégradation (SSO) (Chinivasagam, Bremner *et al.* 1998; Jorgensen, Huss *et al.* 2001). La température de stockage, le type de conditionnement, et la composition inhérente en nutriments du poisson influence la croissance et la potentielle dégradation des SSO. Les SSO dans le poisson réfrigéré sont majoritairement des Gram-négatif, psychrotrophe, comme *Pseudomonas* spp. et *Shewanella* spp. (Shewan 1962). Les *Pseudomonas* induisent des odeurs sucrés, maltés, fruités et d'oignon apportés par les alcools, les carbonyles, les esters et les composés soufrés (Miller III, Scanlan *et al.* 1973; Miller III, Scanlan *et al.* 1973). Tandis que *Shewanella putrefaciens* peut produire des composés odorants plus puissants, reliés à de fortes concentrations en composés soufrés (Herbert *et al.*, 1975) et des odeurs de poissons par réduction de la triméthylamine oxyde (OTMA) en triméthylamine (TMA) (Shewan 1962). *Photobacterium phosphoreum* participe aussi à la flore des SSO dans le poisson réfrigéré et a été identifié comme active dans la production de TMA dans le cabillaud congelé et les filets de cabillaud (Van Spreekens *et al.* 1981).

Le diméthyl sulfide et le méthyl mercaptan sont synthétisés par des microorganismes par action sur les acides aminés, cystéine et méthionine (Hognadottir 1999; Guillén and Errecalde 2002). Les réactions d'oxydation qui ont lieu au cours du stockage du poisson ont aussi un impact sur l'accumulation d'aldéhydes saturés et insaturés qui contribuent au développement de notes rances (Aro, Tahovonen *et al.* 2003). Le cis-4-heptenal est formé par dégradation du (E,Z)-2,6-nonadiénal par système d'auto-oxydation des lipides (Hognadottir 1999; Guillén and Errecalde 2002).

4.2.2 Les lipides

Les explications de la formation des composés volatils, qui sont des produits secondaires de la détérioration des lipides, sont présentées dans le chapitre II p 39 « changement au niveau des lipides ».

De plus, les composés volatils dérivés des lipides tels que les n-6 AGPI, formés par l'action de lipoxygénases, dominent les autres composés (Jensen, Refsgaard *et al.* 1997). L'hexanal notamment qui est issu de ce type de dégradation puisqu'il a été démontré que sa teneur augmentait sensiblement en présence d'inhibiteurs de lipoxygénase (Coin, 2002).

n-6 AGPI (acides gras polyinsaturés) → hexanal (Médina, Satué-Gracia *et al.* 1999)

Pour les poissons gras tels que le maquereau, la présence de lipides et notamment d'acides gras en grande quantité engendrent des composés volatils différents de ceux produits par d'autres types de poissons tels que le merlan ou le cabillaud ; ceci remet donc en question la possibilité de trouver des marqueurs communs aux différentes espèces de poisson.

5. Les différentes méthodes d'extraction utilisées pour l'analyse des composés volatils des produits de la mer

5.1 Headspace statique

Cette technique est adaptée pour les molécules extrêmement volatiles et de faibles masses moléculaires. Un flux de gaz inerte, tel que le diazote, vient balayer la surface au dessus de l'échantillon à analyser, dite espace de tête où les molécules les plus volatiles et de masses moléculaires les plus faibles sont en équilibre. Cette technique a l'avantage de présenter peu d'artefacts du fait de la non-utilisation de solvants et de matériels complexes. L'headspace statique a été utilisé pour l'analyse des composés volatils du saumon en conserve (Girard and Nakai 1991) et la stabilité oxydative d'huiles de poissons (Frankel 1993; Aro, Tahovonen *et al.* 2003).

Un dérivé de cette technique a été développé pour analyser les composés volatils : la micro-extraction en phase solide.

5.1.1 La micro-extraction en phase solide (SPME)

C'est une technique de chromatographie d'adsorption basée sur la partition de composés organiques entre une matrice gazeuse, liquide ou solide et une fibre en silice fondue, placée à l'intérieur d'une aiguille creuse amovible. Une petite partie de la phase extractive qui est répartie sur un support solide est exposée à l'échantillon (extraction headspace) pendant une période de temps bien définie. Les composés sont extraits en fonction de leur affinité pour la fibre. Après un temps suffisant appelé temps d'équilibration, il s'établit un équilibre de partage entre la phase solide constituée par la fibre et la phase gazeuse ou liquide. La fibre est ensuite rétractée dans l'aiguille, retirée de l'échantillon.

Puis les analytes sont désorbés thermiquement dans un injecteur classique et chromatographiés (Jensen, Refsgaard *et al.* 1997; Marsili 2000; Pawliszyn 2000).

Son principe est basé sur la loi de Henry modifiée, qui définit la répartition des produits entre la phase liquide et la phase gazeuse après équilibre thermodynamique en milieu clos :

$$C_{L0}V_L = C_LV_L + C_GV_G$$

Où : C_{L0} : concentration du produit avant équilibre dans la phase liquide

C_L et C_G : concentration du produit après équilibre dans les phases liquide et gazeuse

V_G et V_L : volume des phases liquides et gazeuse

Sachant que le coefficient de répartition k et le ratio de phase β sont définis respectivement par C_L/C_G et V_G/V_L , l'équation 1 devient alors :

$$C_G = C_{L0} / (k + \beta)$$

La concentration dans la phase gazeuse dépend donc de trois facteurs. k apparaît comme le plus important car il varie en fonction de la température et de l'état de la matrice travaillée. Par contre, C_{L0} et β sont préétablis par la quantité initiale dans l'échantillon et par le type de flacon utilisé (5-20 mL).

Le coefficient de répartition k appelé également coefficient de partage peut être très différent même pour des composés de même point d'ébullition. Par exemple, à concentration dans la phase aqueuse égale, un composé tel que le benzène aura une concentration dans la phase gazeuse à 25°C mille fois plus importante que l'éthanol (Tranchant 1995).

La SPME est considérée comme complète quand la concentration en molécules a atteint un équilibre de distribution entre la matrice de l'échantillon et la fibre. Cela signifie, en

pratique, qu'un équilibre est atteint et que la quantité extraite est constante dans la limite des erreurs expérimentales et indépendante d'une augmentation du temps d'extraction (Pawliszyn 2000). Ce dispositif est automatisable, pour analyser un grand nombre d'échantillons en un minimum de temps. La SPME est décrite par de nombreux auteurs (Marsili 1999; Charvet, Belabbes *et al.* 2000) comme une technique facile à mettre en œuvre (pas de nécessité d'utiliser des solvants), peu coûteuse (le fabricant déclare que les fibres sont réutilisables jusqu'à 100 fois), sensible, reproductible, sélective (en fonction du type de fibre utilisé) et applicable à des échantillons de faibles quantités contenant des composés à l'état de trace. Cette méthode a cependant ses limites. La sélectivité de la fibre risque de provoquer des artefacts importants. Une mise au point minutieuse des conditions opératoires est nécessaire pour une utilisation en analyse de routine : choix de la fibre la plus appropriée, conditions de travail optimum en fonction du seuil de détection recherché (volume de l'échantillon, température et temps d'adsorption et de désorption), choix d'un étalon interne le plus proche possible du composé à doser dans le cas d'une analyse quantitative (Charvet, Belabbes *et al.* 2000). Duflos, Moine *et al.* (2005); Duflos, Coin *et al.* (2006) ont effectué ces mises au point de cette technique, en effet un protocole a été élaboré au sein de l'ANSES (ex AFSSA) de Boulogne sur mer. Cette technique a été utilisée par des chercheurs dont récemment Iglesias *et al.* en 2008 pour la recherche de composés volatils dans l'oxydation des huiles de poisson, Klimankova, Riddellova *et al.* (2008) pour la recherche du 2 phenolxyéthanol et Edirisinghe, Graffham *et al.* (2007) pour identifier les composés volatils du thon albacore.

5.2 Headspace dynamique

Cette technique diffère de la précédente par l'application d'un flux d'azote ou d'hélium traversant l'échantillon, ce qui a pour conséquence la récupération d'un plus grand nombre de composés et notamment de molécules moins volatiles et de poids moléculaires plus élevés. De plus, des seuils de détection beaucoup plus bas qu'avec le headspace statique sont possibles (Olafsdottir and Fleurence 1997). Overton (1995), cité par Jensen, Refsgaard *et al.* (1997) a en effet montré qu'elle pouvait être jusque cent fois plus sensible. Les molécules sont piégées et concentrées sur un produit adsorbant, le Tenax, puis désorbées en

même temps par élévation de la température, dans un injecteur de chromatographe en phase gazeuse.

D'après Alasalvar, Anthony Taylor *et al.* (2005) l'analyse en DH-GC-MS (Dynamic Headspace analysis « purge-and-trap » followed with GC-MS) a cependant gagné en popularité car c'est une technique efficace, sensible et rapide pour l'isolement et l'étude des composés volatils du poisson (Alasalvar, Aishima *et al.* 1995; Refsgaard, Haahr *et al.* 1999). Les avantages qui lui sont associés sont la facilité de préparation des échantillons, la taille réduite de l'échantillon, et le peu d'artefacts qu'elle induit (Alasalvar, Quantick *et al.* 1997; Wampler 1997; Cadwallader and Macleod 1998; Refsgaard, Haahr *et al.* 1999).

L'headspace dynamique a été utilisée pour l'analyse des composés volatils du poisson. Les composés de la chair de poisson (Josephson, Lindsay *et al.* 1983; Refsgaard, Haahr *et al.* 1999; Aro, Tahovonen *et al.* 2003; Prost, Hallier *et al.* 2004; Alasalvar, Anthony Taylor *et al.* 2005), de l'huile de poisson (Hsieh, Williams *et al.* 1989; Karahadian and Lindsay 1989; Lin and Connor 1990; Grün, Barbeau *et al.* 1996) et des produits en conserves (Girard and Durance 2000) ont été détectés avec succès grâce à cette méthode.

5.3 Distillation sous vide

C'est une méthode très complexe à mettre en œuvre. Peu de travaux ont été réalisés à l'aide de cette méthode, pour l'étude des composés volatils du poisson (Olafsdottir and Fleurence 1997).

5.4 Extraction au solvant

On extrait les molécules volatiles en utilisant leur apolarité : elles sont extraites à l'aide de solvants polaires. Cependant, cette technique pose des problèmes de concentration pour les poissons gras tels que le maquereau : en effet, les graisses présentes en très grandes quantités sont extraites en même temps que les composés volatils, ce qui entraîne un volume, après concentration, trop élevé pour l'injection dans le chromatographe. De plus, les lipides peuvent encrasser la colonne. Des contaminants sont également amenés avec les solvants (Olafsdottir, Martinsdottir *et al.* 1997).

5.5 Nez électronique

Cette méthode peut être appliquée que pour finaliser les résultats de recherche menée sur la caractérisation des composés volatils (Olafsdottir, Martinsdottir *et al.* 1997). Elle nécessite au préalable de connaître les composés volatils recherchés en raison de l'utilisation d'un certain nombre de capteurs sensoriels. L'avantage de cette technique est qu'il s'agit d'une méthode rapide et non-destructive. De plus l'appareil est de petite taille et transportable (Gelman, Drabkin *et al.* 2003).

L'utilisation du nez électronique a été suggérée pour la détection rapide des composés volatils dans des produits alimentaires variés, y compris pour l'évaluation de la qualité et de la dégradation de poisson (Di Natale, Olafsdottir *et al.* 2001; Jonsdottir, Olafsdottir *et al.* 2004). Les capteurs communément utilisés dans le nez électronique sont non-sélectifs envers les composés volatils mais ont une plus ou moins grande sensibilité pour certaines classes de composés.

D'après Olafsdottir, Jonsdottir *et al.* (2005), le capteur au monoxyde de carbone (CO) semble le plus adapté pour la détermination du début de la dégradation de filet de cabillaud. Mais du fait de la complexité des phénomènes de dégradation causés par la diversité de la flore prédominante et de leurs différentes actions sur la dégradation, déterminer les valeurs caractérisant la date de péremption du produit ou sa qualité à l'aide de la réponse du nez électronique demande d'être développé pour chaque cas.

Récemment El Barbri, Amari *et al.* (2007) ont utilisé cette méthode pour déterminer les composés volatils qui apparaissent lors du stockage à 4°C de la sardine. Une dizaine de composés ont été identifiés : triméthylamine, acétone, 2-butanone, éthanol, 2-butanol, 3-méthyl-1-butanol, éthylacétate, diméthylsulfide, diméthyldisulfide et diméthyltrisulfide.

Jonsdottir, Olafsdottir *et al.* (2008) ont travaillé sur une détection rapide des composés volatils du saumon fumé congelé. Cette détection est réalisée avec une chromatographie gazeuse couplée avec un nez électronique.

Cette technique présente des limites comme par exemple l'utilisation de ces capteurs. D'un capteur à un autre les résultats sont différents. Cet appareil ne sera donc pas utilisé pour notre recherche de composés volatils marqueurs de qualité du poisson.

Les différentes méthodes (HS-SPME et DH) utilisées sont le plus souvent suivies d'une chromatographie phase gazeuse (GC) couplée à une spectrométrie de masse (MS) pour analyser les différents composés volatils du poisson.

6. Les différents outils analytiques des composés volatils

6.1 Chromatographie phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse est une technique connue. Comme toutes les techniques de chromatographie, elle permet de séparer des molécules d'un mélange éventuellement très complexe de nature très diverses. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Le système d'injection de la GC du laboratoire est un système split / splitless. Ensuite le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée d'une colonne, qui renferme une substance active solide ou liquide appelée phase stationnaire (colonne SLB-5ms : 5%-phényl-95%-polydiméthylsiloxane (60m × 0.25mm × 0.25µm)), puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur (hélium). Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps qui est fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules. Dans notre étude les composés seront analysés par spectrométrie de masse et olfactométrie.

6.2 Spectrométrie de masse

6.2.1 Structure d'un spectromètre de masse

Le spectromètre de masse, initialement conçu par le britannique Joseph John Thomson, comporte une source d'ionisation suivie d'un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions produits selon leur rapport m/z , d'un détecteur qui compte les ions et amplifie le signal, et enfin d'un système informatique pour traiter le signal. Le résultat obtenu est un spectre de masse représentant les rapports m/z , où m représente la masse et z la valence des ions détectés selon l'axe des abscisses et l'abondance relative de ces ions selon l'axe de ordonnées.

Le spectromètre de masse se compose donc de quatre parties :

- *Le système d'introduction de l'échantillon* : l'échantillon peut être introduit directement dans la source, sous forme gazeuse, liquide (infusion directe) ou solide (canne d'introduction directe, dépôt sur plaque MALDI, ...) ou encore par l'association à une méthode séparative (chromatographie en phase liquide, chromatographie en phase gazeuse, électrophorèse capillaire, ...).
- *La source d'ionisation* : elle consiste à vaporiser les molécules et à les ioniser. Une source d'ionisation peut être utilisée soit en mode positif pour étudier les ions positifs, soit en mode négatif pour étudier les ions négatifs. Plusieurs types de sources existent et sont utilisés en fonction du résultat recherché et des molécules analysées.
 - L'ionisation électronique (EI), l'ionisation chimique (CI) et la désorption-ionisation chimique (DCI)
 - Le bombardement par atomes rapides (FAB), atomes métastables (MAB) ou ions (SIMS, LSIMS)
 - Le couplage plasma inductif (ICP)
 - L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et la photoionisation à pression atmosphérique (APPI)
 - L'électronébulisation ou électrospray (ESI)
 - La désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI), activée par une surface (SELDI) ou sur silicium (DIOS)
 - L'ionisation-désorption par interaction avec espèces métastables (DART)
- *L'analyseur* : il sépare les ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Il existe des analyseurs basse résolution : le quadripôle ou quadrupôle (Q), le piège à ions 3D (IT) ou linéaire (LIT), et des analyseurs haute résolution, permettant de mesurer la masse exacte des analytes : le secteur magnétique couplé à un secteur électrique, le temps de vol (TOF), la résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FTICR) et l'Orbitrap. Ces analyseurs peuvent être couplés entre eux pour réaliser des expériences de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). En général, un premier analyseur sépare les ions, une cellule de collision permet de fragmenter les ions, et un second

analyseur sépare les ions fragments. Certains analyseurs, comme les pièges à ions ou le FT-ICR, constituent plusieurs analyseurs en un et permettent de fragmenter les ions et d'analyser les fragments directement.

- *Le détecteur et système de traitement* : le détecteur transforme les ions en signal électrique. Plus les ions sont nombreux, plus le courant est important. De plus, le signal détecté est amplifié pour qu'il puisse être traité informatiquement.

Pour l'analyse des composés volatils dans notre étude, une ionisation électronique est utilisée et l'analyseur est un quadripôle. La spectrométrie de masse est un système Shimadzu QP2010+.

6.2.2 L'ionisation électronique (EI)

Des électrons émis par un filament rencontrent les molécules qui entrent dans la source : lors de la rencontre, si l'énergie cinétique des électrons est suffisante, un électron est arraché de la molécule M , la transformant en un ion radical M^{+o} (Figure 6). Celui-ci peut ensuite se fragmenter suivant son énergie interne. L'EI conduit ainsi à un spectre assez fourni, avec de nombreux fragments, très riche en informations structurales.

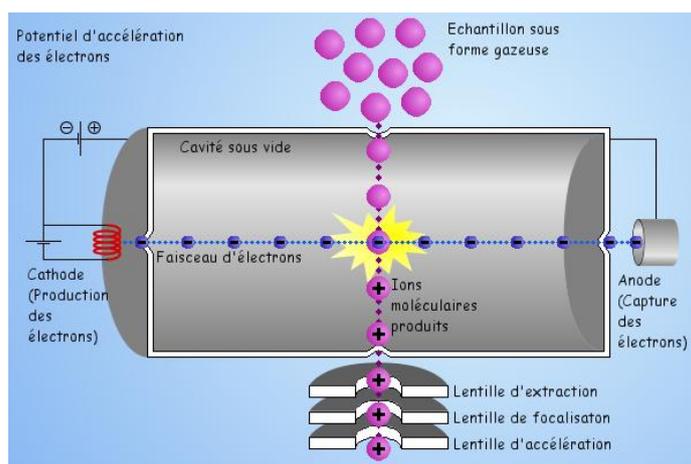
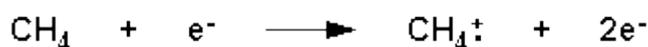
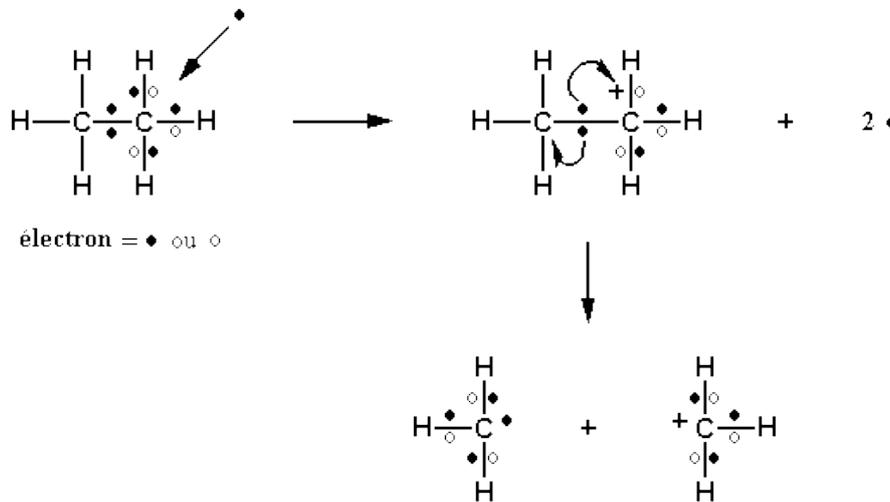


Figure 6 : Source d'ionisation électronique



Exemple d'ionisation électronique du méthane

L'ionisation électrique est la méthode la plus utilisée parmi les sources d'ionisation et celle qui donne le plus de fragments.



Mécanisme de l'ionisation électronique

L'impact d'un électron très énergétique sur une molécule transforme cette dernière en radical-cation avec la perte d'un électron. Suivent une série de réarrangements ou fragmentations qui dépendent de la nature et de la structure de la molécule.

6.2.3 L'analyseur quadripôle.

Un quadripôle (ou quadrupôle) est constitué de quatre électrodes parallèles de section hyperbolique ou cylindrique (Figure 7). Les électrodes opposées distantes de $2r_0$ sont reliées entre elles et soumises au même potentiel. Les électrodes adjacentes sont portées à des potentiels de même valeur, mais opposés de sorte que l'écart de potentiel soit égal à ϕ_0 .

Ce potentiel ϕ_0 résulte de la combinaison de tensions, l'une continue (U) l'autre alternative (V) de haute fréquence f : $\phi_0 = U - V \cdot \cos(2\pi ft)$

En appliquant cette différence de potentiel entre chaque paire d'électrodes, il se crée un champ électrique quadripolaire. Un point de coordonnées (x, y, z) situé dans le champ électrique sera alors soumis au potentiel :

$$\phi = \phi_0 \cdot \frac{x^2 - y^2}{r_0^2}$$

La trajectoire d'un ion pénétrant dans le quadripôle sera donc uniforme selon l'axe z et décrite par les équations de Mathieu selon les deux autres axes. Il est possible de définir en fonction des valeurs U et V des zones de stabilité telles que les coordonnées x et y de l'ion

restent strictement inférieures à r_0 . L'une d'entre elles est exploitée en spectrométrie de masse (Les ions qui se trouvent dans cette zone auront donc une trajectoire stable (ion en résonance) dans le quadripôle et seront détectés). En gardant constant le rapport U/V , on obtient une droite de fonctionnement de l'analyseur. Un balayage de U avec U/V constant permet l'observation successive de tous les ions dont la zone de stabilité est coupée par la droite de fonctionnement. La résolution entre ces ions est d'autant plus grande que la pente de la droite est élevée. En l'absence de tension continue, tous les ions de rapports m/z supérieurs à celui fixé par la valeur de V appliquée auront une trajectoire stable (x et $y < r_0$), le quadripôle est alors dit transparent et sert de focalisateur d'ions. Les principaux avantages du spectromètre quadripolaire résident dans sa souplesse d'utilisation, sa résolution unitaire sur toute sa gamme de masse, sa vitesse de balayage satisfaisante, ainsi que son adaptabilité à différentes interfaces permettant le couplage avec la chromatographie gazeuse ou liquide.

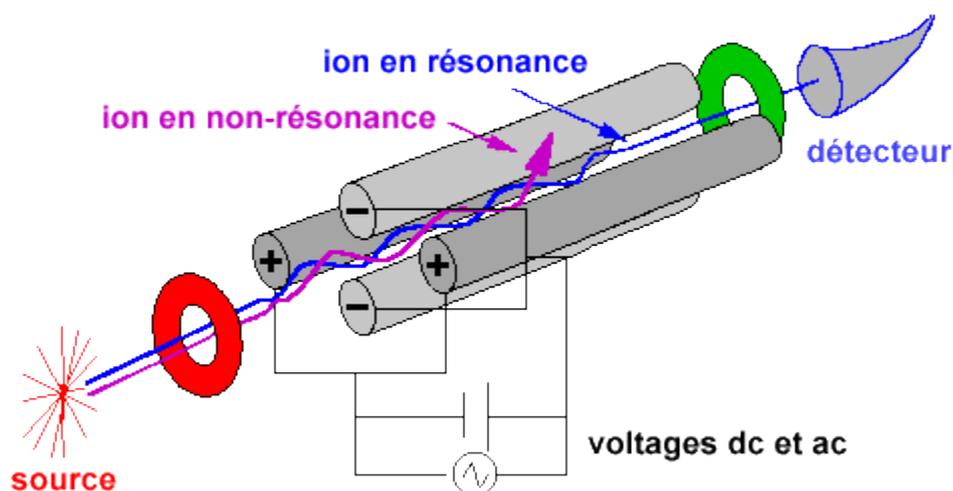


Figure 7 : Schéma d'un filtre quadripolaire

6.3 L'olfactométrie

Le terme 'olfactométrie' désigne à la fois la mesure des odeurs et la mesure des capacités olfactives. Cette technique est utilisée dans notre sujet pour identifier les odeurs des poissons et identifier les composés volatils qui sont responsable de ces odeurs.

Chapitre V : Etude statistique

L'étude des composés volatils est réalisée par HS-SPME-GS-MS et DH-GC-MS/80. Puis les résultats sont interprétés avec la mise en place d'une démarche statistique :

- des analyses descriptives sont réalisées pour pouvoir identifier des marqueurs potentiels de qualité du poisson
- des analyses prédictives sont utilisées pour proposer un modèle qui prédit l'indice de fraîcheur (donc la qualité) en fonction des marqueurs volatils du poisson.

1. Analyse descriptive

L'analyse en composantes principales (ACP) fait partie du groupe des méthodes descriptives multidimensionnelles appelées méthodes factorielles. Ces méthodes qui sont apparues au début des années 30 ont été surtout développées en France dans les années 60, en particulier par Jean-Paul Benzécri qui a beaucoup exploité les aspects géométriques et les représentations graphiques. Dans la mesure où ce sont des méthodes descriptives, elles ne s'appuient pas sur un modèle probabiliste, mais elles dépendent d'un modèle géométrique. L'ACP propose, à partir d'un tableau de données comportant les valeurs de p variables quantitatives pour n unités (appelées aussi individus), des représentations géométriques de ces unités et de ces variables. Ces données peuvent être issues d'une procédure d'échantillonnage ou bien de l'observation d'une population toute entière. Les représentations des unités permettent de voir s'il existe une structure, non connue a priori, sur cet ensemble d'unités. De façon analogue, les représentations des variables permettent d'étudier les structures de liaisons linéaires sur l'ensemble des variables considérées. Ainsi, on cherchera si l'on peut distinguer des groupes dans l'ensemble des unités en regardant quelles sont les unités qui se ressemblent, celles qui se distinguent des autres, etc. Pour les variables, on cherchera quelles sont celles qui sont très corrélées entre elles, celles qui, au contraire ne sont pas corrélées aux autres, etc. L'ACP sert également à réduire la dimension du tableau à analyser en créant de nouvelles variables (composantes principales) combinaison linéaire des variables de départ.

Dans tous les cas, il ne faut pas oublier d'où sont issues les données utilisées et ce qu'elles représentent et signifient pour le problème que l'on se pose.

Enfin, comme pour toute méthode descriptive, réaliser une ACP n'est pas une fin en soi. L'ACP servira à mieux connaître les données sur lesquelles on travaille, à détecter éventuellement des valeurs suspectes, et aidera à formuler des hypothèses qu'il faudra étudier à l'aide de modèles et d'études statistiques inférentielles.

La classification hiérarchique ascendante (CAH) consiste à agréger progressivement les individus selon leur ressemblance, mesurée à l'aide d'un indice de similarité ou de dissimilitude. Elle nécessite la définition d'une mesure de similarité ou de distance entre les objets/échantillons à classer ; et d'un critère d'agrégation des classes qui peut être défini comme une mesure de similarité ou de distance entre les classes d'objets. Elle produit une suite de partitions emboîtées de l'ensemble d'objets à classer. Au départ, on a une partition en n classes, chaque classe étant composée d'un seul objet (partition la plus fine). L'algorithme commence par rassembler les couples d'individus les plus ressemblants, puis a agréger progressivement les autres individus ou groupes d'individus en fonction de leur ressemblance, jusqu'à ce que la totalité des individus ne forme plus qu'un seul groupe. L'initialisation de cet algorithme consiste, à calculer un tableau de distances entre les individus à classer. L'algorithme débute alors de la partition triviale des n singletons (un individu est une classe) et cherche, à chaque étape, à constituer des classes par agrégation des 2 éléments les plus proches de la partition de l'étape précédente. La CAH produit un arbre binaire de classification (dendrogramme), dont la racine correspond à la classe regroupant l'ensemble des individus. L'ensemble des nœuds définit une « hiérarchie » sur l'ensemble d'objets. Le nombre de classes obtenues dépend du niveau de l'arbre choisi pour la coupe, ceci est un choix final de l'analyste. Il existe des indices de niveau, pour évaluer la qualité d'une partition. Ce dendrogramme représente une hiérarchie de partitions, une partition étant obtenue par troncature du dendrogramme à un certain niveau de ressemblance. La partition comporte alors d'autant moins de classes que la troncature s'effectue en haut du dendrogramme (c'est-à-dire vers la racine). A la limite, une troncature effectuée en dessous du premier nœud de l'arbre conduit à ce que chaque classe ne contienne qu'un individu (cette partition est l'assise du dendrogramme), et une troncature

effectuée au-delà du niveau de la racine du dendrogramme conduit à une seule classe contenant tous les individus.

2. Analyse prédictive

Les modèles d'analyse prédictive ont un spectre très large. Nous décrivons brièvement ci-après l'approche par régression linéaire multiple.

Régression linéaire multiple

La régression linéaire simple cherche à "expliquer" les valeurs prises par une variable y par les valeurs prises par une autre variable x , ces deux variables étant supposées avoir entre elles une relation linéaire :

$$y = ax + b + \varepsilon(x)$$

où ε est un bruit aléatoire qui dépend *a priori* de x

Le problème traité par la régression linéaire multiple (RLM) est le même, si ce n'est que l'on cherche à expliquer les valeurs de y (correspondent dans notre sujet à l'indice de fraîcheur obtenue par l'analyse sensorielle) non pas par une seule variable x , mais par plusieurs variables x_j , dites "variables explicatives" (correspondent aux composés volatils considérés comme des marqueurs de qualité du poisson). En changeant légèrement les notations précédentes, on suppose donc que y et les x_j sont liées par une relation linéaire :

$$y = \theta_0 + \theta_1 x_1 + \theta_2 x_2 + \dots + \theta_p x_p + \varepsilon(x)$$

où p est le nombre de variables explicatives

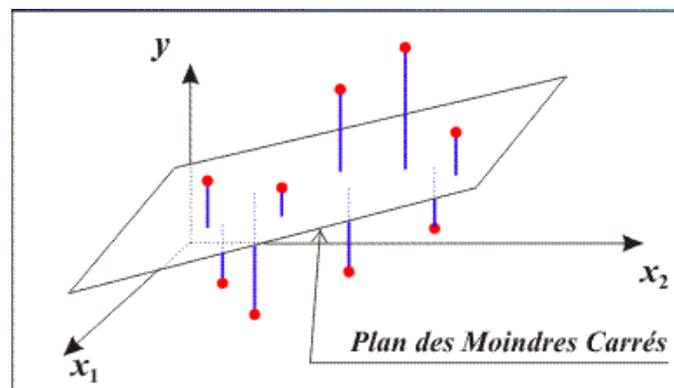
$\varepsilon(x)$ est un bruit aléatoire dont nous préciserons plus tard la nature, mais qui dépend *a priori* du point x de l'espace des données défini par les valeurs des x_j .

Les données expérimentales sont constituées de n mesures y_i ou $i = 1, 2, \dots, n$, pour n jeux de valeurs des variables explicatives :

$$y_i = \theta_0 + \theta_1 x_{i1} + \theta_2 x_{i2} + \dots + \theta_p x_{ip} + \varepsilon(x)_i$$

Dans cette expression les θ_j sont des nombres fixes, mais inconnus et les $\varepsilon(x_j)$ sont des réalisations de $\varepsilon(x)$.

La régression linéaire simple cherche à faire passer une droite "au mieux" (au sens des moindres carrés) à travers le nuage de points représentant les données dans le plan (x, y) . Il va en être de même pour la régression linéaire multiple, si ce n'est que la représentation visuelle devient maintenant impossible, sauf, "de justesse", lorsqu'il n'y a que deux variables explicatives x_1 et x_2 : la RLM va alors faire passer "au mieux" un plan à travers le nuage de points représentant les données dans l'espace (x_1, x_2, y) .



Dans l'illustration ci-dessus, le plan des moindres carrés est celui qui minimise la somme des carrés des longueurs des segments bleus parallèles à l'axe y . Ces longueurs (signées) s'appellent les résidus du modèle. Le plan des Moindres Carrés est donc celui qui minimise la somme des carrés des résidus.

En dimension supérieure, il faut se contenter de dire que la RLM va déterminer l'hyperplan de dimension p minimisant la somme des carrés des écarts (mesurés parallèlement à l'axe y) entre les points représentant les données et l'hyperplan.

Cet hyperplan aura pour équation :

$$y^* = \theta_0^* + \theta_1^* x_1 + \theta_2^* x_2 + \dots + \theta_p^* x_p$$

où les coefficients θ_j^* s'appellent les **paramètres estimés** du modèle.

Présentation des résultats

Le projet consiste à étudier l'ensemble des composés volatils de différents poissons avec une méthode HS-SPME-GC-MS afin de trouver des marqueurs potentiels de fraîcheur et d'altération à l'aide de différentes approches statistiques pour caractériser la fraîcheur du poisson. Pour cela des suivis d'altérations de différents poissons (merlan, bar commun, dorade royale, maquereau commun, limande sole, cabillaud, grande vive et saumon) stockés jusqu'à 20 jours dans des conditions industrielles, c'est-à-dire dans des caisses en polystyrène sous glace à 4°C, ont été réalisés afin d'identifier leurs composés volatils. Ensuite à partir de ces résultats plusieurs approches statistiques ont été réalisées pour rechercher des composés représentatifs de la fraîcheur :

- Tout d'abord des analyses descriptives pour identifier des marqueurs potentiels de qualité de la chair du poisson.
- Puis des analyses prédictives pour aboutir à un modèle qui prédit un indice de fraîcheur en relation avec les marqueurs de qualité du poisson.

La première partie de mes résultats exposera une étude préliminaire sur du merlan (*Merlangius merlangus*) à l'aide d'une analyse en HS-SPME-GC-MS (Shimadzu - GCMS QP5000) suivie d'une méthode statistique multidimensionnelle.

La deuxième partie présentera l'optimisation de la méthode d'extraction HS-SPME et de la méthode d'analyse GC-MS des composés volatils du poisson pour permettre une étude générale des composés volatils de plusieurs espèces de poissons. Nous nous sommes tout d'abord intéressés au domaine de l'olfactométrie grâce à une collaboration avec le service « Qualité des Produits Animaux, Equipe Typicité Aromatique et Authentification » de l'INRA de Clermont-Ferrand / Theix, spécialisé sur les arômes des produits. Ensuite, à partir de l'optimisation méthodologique de HS-SPME-GC-MS, différents suivis d'altérations de diverses espèces : bar commun (*Dicentrarchus labrax*), dorade royale (*Sparus aurata*), saumon d'élevage (*Salmo salar*) et cabillaud sauvage (*Gadus morhua*) ont été analysées pour étudier l'ensemble de leurs composés volatils et donc d'identifier des marqueurs potentiels

de qualité du poisson. A partir de ces résultats une méthode de caractérisation de la fraîcheur du poisson sera proposée avec la création d'un modèle statistique.

La troisième partie présentera des applications de cette méthode HS-SPME-GC-MS :

- pour différencier à l'aide des composés volatils un poisson cru frais d'un produit cru ayant subi une congélation - décongélation.
- pour étudier les composés volatils de produits de la mer (crevettes) bioconservés, en collaboration avec l'Ifremer de Nantes.

1^{ère} partie : Etude préliminaire des composés volatils

Cette première partie des résultats correspond à une étude des composés volatils de diverses espèces de poisson (merlan, maquereau, grande vive, limande sole). Plusieurs suivis d'altération (c'est-à-dire une conservation d'un lot de poissons dans des conditions industrielles à 4°C sous glace) ont été réalisés. A différents jours de stockage 1, 2, 3, 4, 7, 10 et 13, nous avons analysé les composés volatils de ces espèces en utilisant une méthode mise en place au sein du laboratoire. Cette méthode est basée sur une MicroExtraction en Phase Solide (SPME) suivie d'une Chromatographie phase Gazeuse (GC17A-Shimadzu) couplée à une Spectrométrie de Masse (MSQP5000-Shimadzu).

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article 1 qui reprend l'analyse des composés volatils du merlan à différents jours de stockage pour essayer de caractériser la fraîcheur du poisson :

Article 1 : Guillaume Duflos, François Leduc, Assi N'Guessan, Frédéric Krzewinski, Ossarath Kol, and Pierre Malle. **Freshness characterisation of whiting (*Merlangius merlangus*) using an SPME/GC/MS method and a statistical multivariate approach.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2010, 90, (15), 2568-2575.

Synthèse article 1 : Le merlan qui a été stocké dans des conditions industrielles a été étudié en comparant l'analyse des composés volatils obtenus par HS-SPME-GC-MS pendant des suivis d'altération de 7 jours avec deux méthodes sensorielles (QIM » et barème de cotation de la directive européenne 2406/96). Les poissons conservés 1 et 2 jours ont une très bonne qualité et sont considérés comme des poissons extra frais. Les poissons ayant 3 et 4 jours de stockage sont considérés comme des poissons frais qui sont encore de bonne qualité. Puis les merlans stockés 7 jours sont des poissons moins frais mais qui restent acceptables à la consommation. A partir de ces études sensorielles, 3 classes de fraîcheur ont été déterminées. A l'aide de ces classes, une approche statistique multivariée « analyse de composante principale » « classification ascendante hiérarchique » a permis de déterminer quels composés volatils identifiés par HS-SPME-GC-MS sont les plus représentatifs de ces différentes classes. Parmi l'ensemble des composés volatils identifiés, 38 semblent avoir un rôle de marqueurs potentiels de fraîcheur et/ou d'altération du merlan. Le propanal, l'hexanal, le 1-pentène-3-ol, le pentanal, le 2,3-pentanedione, le 1-pentène-3-one, l'heptanal, le (E)-2-penténal, le 2,3-octanedione, le (Z)-2-pentène-1-ol, le 1-pentanol, le butanal, l'octanal, le 3,5,5-triméthyl-2-hexène, le 1-hexanol et le 4,4-diméthyl-1,3-dioxane sont intéressants car ils sont présents aux différents stades de fraîcheur du merlan et sont bien représentatifs des différentes catégories de fraîcheur du merlan.

D'autres composés comme l'éthanol, le 3-méthyl-1-butanol, le 3-méthyl-butanal, le 2-méthyl-1-butanol, le 2-méthyl-1-propanol, le 2,3-butanedione, l'éthylacétate et le limonène sont plus représentatifs de l'altération et peuvent être considérés comme des marqueurs d'altérations du merlan.

Freshness characterisation of whiting (*Merlangius merlangus*) using an SPME/GC/MS method and a statistical multivariate approach

Guillaume Duflos,^{a*} François Leduc,^a Assi N'Guessan,^b Frederic Krzewinski,^c Ossarath Kol^c and Pierre Malle^a

Abstract

BACKGROUND: The freshness of whiting was studied at five stages of ice storage by comparing the analysis of volatile compounds obtained through solid phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry (SPME/GC/MS) with two sensory methods.

RESULTS: Of the volatile compounds identified, 38 were analysed using a statistical multivariate approach and classified according to their role in the estimation of freshness during storage as markers of freshness or spoilage. Regarding the evolution of the presence or absence of individual compounds, three categories were defined. For example, the volatile compounds propanal, hexanal, 1-penten-3-ol, pentanal, 2,3-pentanedione, 1-penten-3-one, heptanal, (*E*)-2-pentenal, 2,3-octanedione, (*Z*)-2-penten-1-ol, 1-pentanol, butanal, octanal, 3,5,5-trimethyl-2-hexene, 1-hexanol and 4,4-dimethyl-1,3-dioxane appeared highly relevant, because they are found throughout storage and can be divided into several categories that are directly related to the quality of fish.

CONCLUSION: SPME/GC/MS combined with a statistical multivariate approach may be a useful method to identify volatile compounds and characterise fish freshness during storage.

© 2010 Society of Chemical Industry

Keywords: fish freshness; SPME; GC/MS; principal component analysis; volatile compounds

INTRODUCTION

Fish is a fragile product. Its quality is a health and commercial issue that concerns industrialists, official inspection authorities and consumers. Fish freshness is therefore a key attribute of its quality.

Odour is one of the main indicators that consumers use to assess the freshness of fish. The smell of fish changes rapidly according to the product's degree of freshness, and this is why sensory analyses are used by consumers and industrialists to assess fish quality. Since odour is one of the main parameters used to determine the sensory quality of products, the key volatile compounds that contribute to this characteristic odour can be measured and used as quality indicators.^{1–3} These volatile aromatic compounds that characterise smell are generated by the action of bacterial and tissue enzymes and lipid autoxidation.

The microbial production of volatile compounds is caused by specific spoilage bacteria.⁴ These include mainly Gram-negative psychrotrophs such as *Pseudomonas* spp. and *Alteromonas* spp.⁵ and more specifically *Shewanella putrefaciens* and *Photobacterium phosphoreum*.^{6,7} These bacteria generate odours by producing alcohols, carbonyls, esters and sulfur compounds^{8–10} corresponding to different kinds of odour such as flat and neutral odours, and then rancid, putrid odours or odours of ammonia or sulfur changing the flavour and taste of fish during storage.^{11–13} On the other hand, odours of fresh fish are mainly associated with compounds

that contain carbonyls and alcohols and are characterised by light, green, delicate, melon, marine plant and iodised notes.^{11,13}

In view of the role that volatile compounds play in the assessment of fish freshness, studies have been undertaken to identify and quantify these compounds in various fish (mackerel, herring, cod, sardine and sea bream) using either static headspace analysis (SHA), dynamic headspace analysis (DHA) or an electronic nose in various storage phases.^{3,4,14–18}

Another technique is solid phase microextraction (SPME). SPME is a relatively new method that can be used to extract volatiles from foods. It is a rapid and simple extraction technique that does not require the use of solvents. SPME was first used to assess fish

* Correspondence to: Guillaume Duflos, ANSES, Laboratoire des Produits de la Pêche, Bld Bassin Napoléon, F-62200 Boulogne-sur-Mer, France.
E-mail: guillaume.duflos@anses.fr

^a ANSES, Laboratoire des Produits de la Pêche, Bld Bassin Napoléon, F-62200 Boulogne-sur-Mer, France

^b Laboratoire Paul Painlevé, UMR CNRS 8524 & Ecole Polytechnique Universitaire de Lille, Université de Lille 1, Avenue Paul Langevin, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

^c Unite de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR CNRS 8576, Université de Lille 1, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

quality by Bene *et al.*^{19,20} when studying the volatile substances in salmon and whiting. Other researchers have used the technique on crayfish, rainbow trout, salmon, mackerel, sardine, tuna, sea bream, cod and shrimp to study their volatile compounds during storage.^{16,21–26}

SHA, DHA and SPME are often combined with gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) to determine the quality and quantity of various volatile aromatic compounds that can be relevant quality indicators.

The aims of this study were to examine the various volatile compounds in whiting during storage using the SPME technique combined with GC/MS, to ascertain if there is a relationship between these compounds and fish quality as assessed through a sensory analysis method and to determine which of these compounds may be markers of fish freshness or spoilage using a statistical multivariate approach.

EXPERIMENTAL

Chemicals

Carboxen (CAR)/polydimethylsiloxane (PDMS) StableFlex fibre (65 μm) came from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Before first use, each SPME fibre was conditioned as recommended by the manufacturer. NaCl came from Oxoid Ltd (Basingstoke, UK), Milli-Q water (high-performance liquid chromatographic water) from Fisher Scientific Labosi (Elancourt, France) and 3-methyl-3-buten-1-ol from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Sample preparation

Whiting (*Merlangius merlangus*), caught the night before the start of the study, was acquired from Cooperative Maritime Etaploise (Boulogne-sur-Mer, France). Two different catches (20 and 15 fish respectively) were analysed. The fish were stored in crushed ice at 4 °C in self-draining polystyrene boxes for 7 days. Fresh crushed ice was added daily. Sensory evaluation and volatile analysis were performed on days 1, 2, 3, 4 and 7 (on seven different fish each day). Sensory evaluation was performed by two panellists familiar with the sensory evaluation of fish. Following sensory evaluation, each fish was filleted. The next step was according to previous work.²⁷ The fillets were cut into 1 cm cubes, then 50 g of flesh was introduced into a stomacher bag with 100 mL of ultrapure water saturated with NaCl. The contents were mixed for 2 min in a Stomacher Lab-Blender 400 (Seward, Thetford, UK). The aqueous phase was removed and centrifuged at 12 000 $\times g$ for 10 min at 4 °C (Multifuge 3 S-R Heraeus, Kendro Laboratory Products, Courtaboeuf, France).

Sensory evaluation

Two methods were used for the sensory evaluation of fish.

The first method is the European Union's grading system presented in European Directive 2406/96. This system distinguishes between three freshness categories, E, A and B, corresponding to various levels of spoilage. Category E corresponds to the highest quality level, followed by categories A and B, while fish graded below B is considered to be non-edible. Another category corresponds to the product's discard level. In order to rate this evaluation, these letters have been replaced with numbers: 0 = E, 1 = A, 2 = B and 3 = unacceptable. The lower the number, the fresher the fish; conversely, the higher the number, the greater the spoilage (below 18 the fish is acceptable).

The second method is the quality index method (QIM) evaluation system adapted to whiting. It is based on changes in the sensory characteristics of raw fish during spoilage. Scores of 0–1, 0–2 or 0–3 demerit (or index) points are attributed according to changes observed in the smell, texture, eye appearance, skin and gills. The points are added up to obtain an overall sensory score or quality index (QI).

SPME procedure

According to previous studies,²⁷ 11 mL of aqueous phase from the supernatant of sample preparation was introduced into a hermetically sealed 20 mL vial. The vial was placed in the sample tray of a Combi PAL (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) and then transferred to the mixer, where it was heated at 50 °C and mixed at 500 rpm for 10 min. After this equilibrium time the CAR/PDMS SPME fibre was inserted into the headspace of the sample and held there for 40 min at 50 °C. The fibre was then removed from the headspace and inserted into the Merlin Microseal injector (250 °C) of a GC-17A gas chromatograph (GC) equipped with an MS-QP5000 mass spectrometer (MS) (Shimadzu, Kyoto, Japan) for desorption. The fibre was maintained 10 seconds.

GC/MS procedure

The GC was equipped with a BPX5 capillary column (60 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm) (SGE, Courtaboeuf, France). The GC conditions were as follows: oven temperature set initially at 35 °C (5 min hold), increased to 100 °C at 10 °C min^{-1} , then increased to 280 °C at 20 °C min^{-1} and maintained at 280 °C for 5 min; the splitless mode was used for injection, with a purge time of 2 min. The fibre was maintained in the injection port for 10 s. The electron impact MS conditions were as follows: temperature of interface, 260 °C; ionisation voltage, 70 eV; mass range, m/z 33–200; scan speed, 250 per 0.5 s. After each injection the fibre was heated to 300 °C for 10 min in the SPME fibre conditioner. Volatile compounds were identified by matching their mass spectra with Mass Spectral Libraries 21 and 107 of the National Institute of Standards and Technology (NIST) (developed for Shimadzu by NIST, July 2002). Semi-quantification of the components was based on arbitrary units of total current ion peak area counts.

Statistical analysis

The statistical analysis of the 35 samples was divided into two parts. First we described and analysed the freshness and spoilage indices on the various sampling days using PASW Statistics 18 (SPSS, Paris, France). Two graphic approaches were used to that end. One approach, using box plots, shows a statistical summary of the indices by sampling day. Another graphic approach based on control charts of the individual index values was used for this first part. These control charts were used to analyse the daily progression of freshness and/or spoilage indices. The second part of our statistical analysis proposes a grouping of analysed fish samples and identifies the volatile compounds that characterise their categories. To do so, we used SPAD 7 (SPAD, Paris, France) to select a set of relevant volatile compounds via the first two trends in a principal component analysis (PCA). We then performed an ascending hierarchical classification (AHC) of the first two factors. The categories were then analysed in relation to the selected volatile compounds and the freshness and/or spoilage indices.

Variable name	Compound name	Retention time (min)	Variable name	Compound name	Retention time (min)
a	Acetaldehyde	3.099	ag	3-Methyl-1-butanol	8.790
b	Methanethiol	3.400	ah	2-Methyl-1-butanol	8.801
c	Trimethylamine	3.426	aj	(E)-2-Pentenal	9.331
d	Ethanol	3.527	ak	1-Pentanol	9.565
e	Pentane	3.699	al	(Z)-2-Penten-1-ol	9.640
f	Propanal	3.795	am	2-Hexanone	10.154
g	Dimethyl sulfide	4.019	an	Hexanal	10.484
h	Methylene chloride	4.195	ao	4,4-Dimethyl-1,3-dioxane	11.484
i	Carbon disulfide	4.253	ap	(E)-2-Hexenal	11.882
j	2,3-Butanedione	5.009	aq	1-Hexanol	12.122
k	Butanal	5.075	ar	3-Heptanone	12.497
l	2-Butanone	5.110	as	(Z)-4-Heptenal	12.817
m	2-Butanol	5.370	at	Heptanal	12.858
o	Ethyl acetate	5.442	au	Cyclohexanone	12.968
p	Acetic acid, ethyl ester	5.639	av	1-Heptanol	14.018
q	2-Methyl-1-propanol	5.793	aw	3,5,5-Trimethyl-2-hexene	14.106
r	3-Methyl butanal	6.525	ax	Benzaldehyde	14.142
s	1-Butanol	6.695	ay	1-Octen-3-ol	14.192
t	2-Methyl butanal	6.725	az	2,3-Octanedione	14.248
v	1-Penten-3-ol	7.197	ba	2,4-Heptadienal	14.534
w	1-Penten-3-one	7.298	bb	Octanal	14.567
x	Heptane	7.453	bc	(E,E)-2,4-Heptadienal	14.769
y	2-Ethyl furan	7.577	bd	2-Ethyl-1-hexanol	14.818
z	3-Pentanone	7.598	be	Limonene	14.856
aa	2,3-Pentanedione	7.610	bf	1-Octanol	15.052
ab	Pentanal	7.643	bg	3,5-Octadien-2-one	15.459
ac	3-Pentanol	7.892	bh	Nonanal	15.852
ae	3-Hydroxy-2-butanone	8.503			

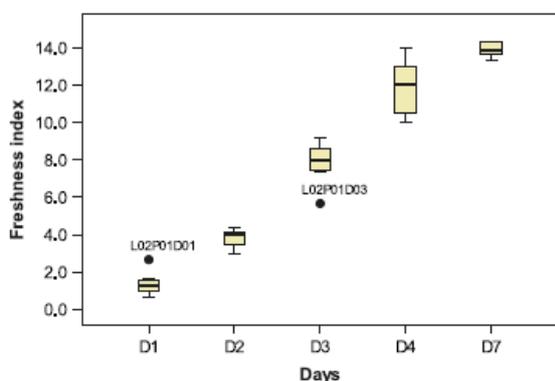


Figure 1. Comparison of freshness indices according to sampling day.

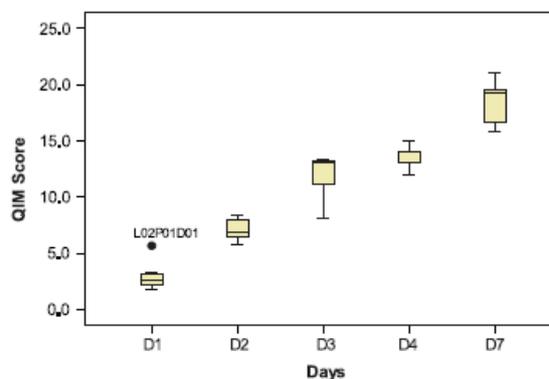


Figure 2. Comparison of QIM scores according to sampling day.

RESULTS AND DISCUSSION

Analysis of freshness or spoilage indices by sampling day

The study consists of 35 measurements taken during five periods, D1 (day 1), D2 (day 2), D3 (day 3), D4 (day 4) and D7 (day 7), at a rate of seven measurements per period and some 60 volatile compounds observed per sample (Table 1). Figures 1 and 2 show the respective freshness indices and QIM scores associated with freshness and spoilage of the analysed whiting catches.

They illustrate both the average trend and the variability of the two indices (freshness and QIM) by sampling day. We note that these two freshness and/or spoilage indicators tend to rise over sampling time.

The daily variability of the two indicators is illustrated by the height of each box plot. This variation is greatest on D3 and D4 for the freshness index and on D3 and D7 for the QIM score. Values outside the boxes (outliers) testify to the atypical character of some indicator values (abnormally high or low). Two fish have

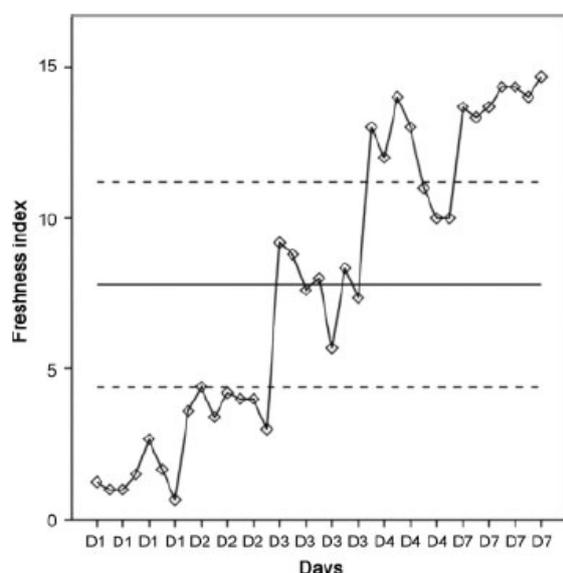


Figure 3. Chart of individual freshness indices: —, mean; - - - , upper and lower control limits.

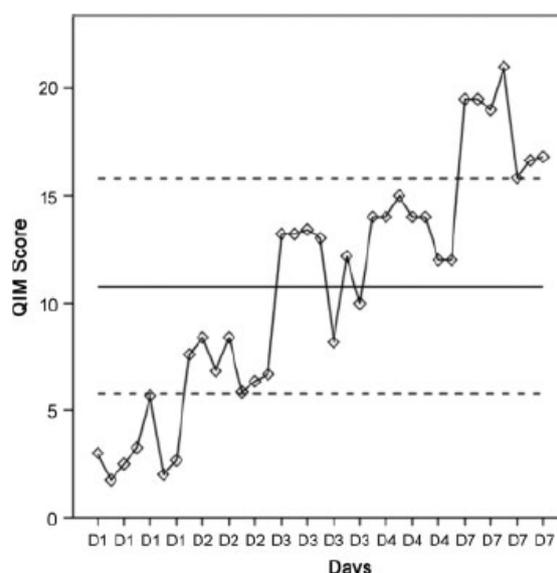


Figure 4. Chart of individual QIM scores: —, mean; - - - , upper and lower control limits.

freshness indices that are relatively far from the average on D1 and D3, while one fish has a QIM score that is relatively far from the average on D1.

We note for example that the mean value of the freshness index increases from 1.393 on D1 to 14.000 on D7 with high variability on D3 (standard deviation of 1.1603). As for the QIM score, it varies on average from 2.976 on D1 to 18.333 on D7 with fairly high variability on D3 (standard deviation of 2.0189).

Concerning the freshness index, the estimate of means and standard deviations clearly shows a relatively significant difference between D2 and D3 on the one hand and between D4 and D7 on the other hand. It thus appears that D3 represent a breaking point between high and low quality of the analysed fish samples' freshness.

Freshness therefore decreases between D2 and D3. Then there is a transition phase from D3 to D4, leading to a confirmed spoilage zone starting on D4.

This grouped analysis of freshness indices is combined with a descriptive analysis of each of the two indicators' individual values in Figs 3 and 4. These two graphs explain the upward trend observed above and specify the quite linear nature of this trend in relation to the sampling days. They also highlight a transition zone delimited by the line located between the two broken lines (upper and lower control limits) and marked by a first change in values of the two indicators between D2 and D3 and a second change between D4 and D7. These jumps appear clearly evident for the QIM indicator. Statistical tests for small samples were applied and gave a significance of around 10^{-3} (Fig. 4): the mean value on D2 is significantly different from that on D3 with an error level of 5% for freshness index and QIM score. D4 presents the same difference as D7 for the two indicators.

Classification of fish using PCA

The results of the PCA show that the first two components, a linear combination of volatile compounds, account for about 65% (Tables 2 and 3) of the total information contained in the data

table. The first principal component with an eigenvalue of 28.477 (Table 2, column VP) accounts for 54.75% (projected inertia) of the 65%, while the second principal component with an eigenvalue of 5.535 (Table 3, column VP) accounts for only 10.64%.

The circle of correlation (Fig. 5: projection of variables on the plane formed by the first two principal components) clearly illustrates two major volatile compound trends. The first/second trend involves a group of volatile compounds that are positively projected onto the first/second principal component. From these two trends we extracted the most characteristic volatile compounds (Tables 2 and 3) in order of their importance in each of the two principal components. The COOR column corresponds to the coordinate of the projection of the volatile compound on each factor, while the columns QLT and CRT respectively represent the quality of the representation and the relative contribution of this compound to the formation of the principal trend.

We note therefore that 30 volatile compounds are largely responsible for the formation of axis 1 (Fig. 5). These 30 volatile compounds account for more than 80% of the 54.75% of inertia projected on the first component and range from 1-pentanol (ak) to (*E*)-2-hexenal (ap) and methylene chloride (h) and from 2-ethyl-1-hexanol (bd) to octanal (bb), heptanal (at) and 1-octen-3-ol (ay). As for the second principal component, it largely comprises eight volatile compounds, ethanol (d), 3-methyl-1-butanol (ag), 2,3-butanedione (j), 2-methyl-1-butanol (ah), 3-methyl butanal (r), 2-methyl-1-propanol (q), limonene (be) and ethyl acetate (o), which make up nearly 63% of the 10.64% of inertia projected on this second component.

Classification description and interpretation

After the PCA an AHC was conducted using SPAD 7 and the first two principal components to define categories.

Table 4 presents a distribution into three categories and gives the composition of each of them as well as the fish with profiles that are closest to the category's centre of gravity (distance to the centre of the category's column).

Table 2. Variables of interpretation from first principal component

Variable name	COOR	QLT	VP	CRT
ak	0.981	0.963	28.477	0.034
ap	0.976	0.952	28.477	0.033
ba	0.969	0.939	28.477	0.033
bg	0.969	0.938	28.477	0.033
av	0.964	0.930	28.477	0.033
aj	0.964	0.929	28.477	0.033
al	0.963	0.928	28.477	0.033
as	0.963	0.928	28.477	0.033
w	0.956	0.914	28.477	0.032
aw	0.949	0.900	28.477	0.032
bb	0.946	0.894	28.477	0.031
at	0.945	0.893	28.477	0.031
an	0.940	0.883	28.477	0.031
bc	0.937	0.878	28.477	0.031
ab	0.935	0.874	28.477	0.031
ao	0.933	0.870	28.477	0.031
az	0.931	0.866	28.477	0.030
ay	0.928	0.861	28.477	0.030
v	0.927	0.859	28.477	0.030
am	0.927	0.859	28.477	0.030
ax	0.924	0.854	28.477	0.030
aa	0.905	0.819	28.477	0.029
k	0.901	0.811	28.477	0.028
bh	0.895	0.802	28.477	0.028
aq	0.891	0.794	28.477	0.028
b	0.879	0.772	28.477	0.027
f	0.870	0.757	28.477	0.027
x	0.854	0.729	28.477	0.026
bd	0.839	0.703	28.477	0.025
h	0.827	0.684	28.477	0.024
% total contribution				0.905

Table 3. Variables of interpretation from second principal component

Variable name	COOR	QLT	VP	CRT
d	0.779	0.607	5.535	0.110
ag	0.769	0.591	5.535	0.107
j	0.747	0.559	5.535	0.101
ah	0.741	0.549	5.535	0.099
r	0.695	0.483	5.535	0.087
q	0.644	0.415	5.535	0.075
be	0.635	0.403	5.535	0.073
o	0.634	0.402	5.535	0.073
% total contribution				0.724

- Category 1/3 consists of 17 fish from the two catches of whiting with samples taken on D1, D2 and D3.
- Category 2/3 consists of 7 fish from the two catches with samples taken on D3 and D4.
- Category 3/3 consists of 11 fish from the two catches. It includes some of the samples taken on D4 and all samples taken on D7.

Figure 6 illustrates the simultaneous projection of the centres of the three categories and the fish. The plan of projection comprising

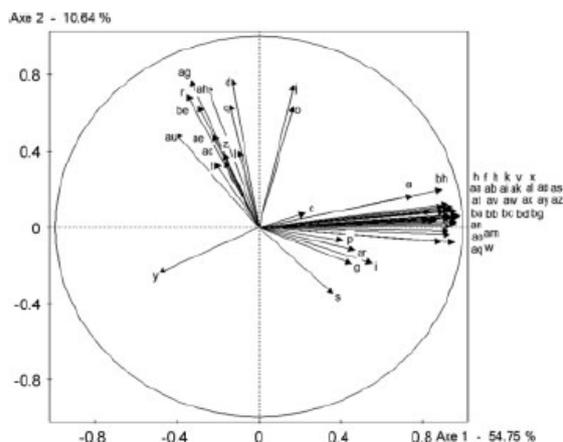


Figure 5. Circle of correlations in principal plane.

the first two principal components represents more than 75% of the total information. The diameter of each category (each class) allows us to assess the quality of representation and importance of the category in the projection plan. The larger the diameter, the more the category is well represented: better quality for category 1/3 than for categories 3/3 and 2/3. The analysis shows that the centre of category 1/3 projects negatively onto the first two principal components. The squared cosine of the angle formed by the category 1/3 centre of gravity and the first principal component is 0.794 with a significance of about 10^{-4} . As a result, if we use an error level of 5% (five out of 100 chances that the conclusion will be false), the correlation between this category and the first principal component is statistically significant. The results also show that category 1/3 is statistically significantly correlated with the second principal component with a correlation of 0.191.

Similarly, category 2/3 is significantly positively correlated with the second principal component with a correlation of 0.517 and a virtually null significance. Category 3/3 is significantly positively correlated with the first principal component with a correlation of 0.991 and a virtually null significance.

The diagrams in Figs 7 and 8 make it possible to quantify the degree of freshness and/or spoilage of each of the three fish categories. Overall, category 1/3 has the lowest values of freshness index and QIM score. The freshness quality of the fish in this category is excellent. In category 2/3 the freshness indices and QIM scores are higher than in category 1/3 and overlap category 3/3, with significant dispersion within this category only for the freshness index. It appears to be an intermediate category between freshness and spoilage. Category 3/3 shows higher freshness index values with less dispersion. This category is synonymous with spoilage (poor freshness quality of fish).

To characterise each of the three fish categories with volatile compounds, we compared the compound's mean category value with its mean value calculated from all analysed fish. The selected compounds were then compared with those from the PCA. We therefore propose three typologies of volatile compounds: compounds present in the category on average and highly significant, those present and not highly significant and those completely and significantly absent on average (Table 4).

In category 3/3, which consists of fish at an advanced stage of spoilage (Figs 7 and 8), the volatile compounds whose average presence is significant are those that contribute strongly to the

Table 4. Characterisation of categories by volatile compounds

Category	Distance to the centre of the category	Name	Highly significant average presence	Slightly significant average presence	Highly significant average absence	
3/3	5.932	L01P03D07	f, an, v, ab, aa, w, h, at, aj, az, al, ak, ay, aq, b, aw, as, bb, k, av, ap, ao, bc, ax, bd, bh, ba, x, bg, am	r		
	6.780	L01P02D07				
	10.452	L02P01D04				
	13.765	L01P01D07				
	18.874	L02P01D07				
	22.325	L02P02D04				
	23.574	L01P04D04				
	39.567	L02P02D07				
	39.972	L02P03D04				
	43.094	L02P03D07				
	56.905	L01P04D07				
	2/3	9.989	L02P03D03	d, ag, r, ah, q, j, o, be	w, ao	am
		12.390	L01P03D04			
20.353		L01P02D04				
38.469		L01P02D03				
49.812		L01P01D03				
52.347		L02P02D03				
57.513		L01P01D04				
1/3	0.680	L02P01D01	f, an, v, ab, aa, w, at, aj, ay, ak, az, al, k, bb, aw, aq, ao, b, av, ap, bd, bh, bc, ax, bg d, q, o, j		h, as, x, ba, am,	
	1.532	L01P03D02				
	2.169	L01P04D01				
	2.366	L02P01D02				
	3.336	L01P02D01				
	3.376	L01P04D02				
	3.427	L01P02D02				
	3.547	L02P01D03				
	4.516	L01P03D01				
	4.550	L02P03D01				
	6.350	L02P02D01				
	7.754	L01P04D03				
	10.033	L02P02D02				
	10.781	L01P01D02				
	12.540	L01P01D01				
	14.050	L01P01D03				
	20.665	L02P03D02				

formation of the first trend in the PCA (Table 2). The majority of these compounds have a category mean that is significantly higher than their general mean (mean calculated using all samples of analysed fish). The most characteristic compounds on average are propanal (f), hexanal (an), 1-penten-3-ol (v), pentanal (ab), 2,3-pentanedione (aa), 1-penten-3-one (w), methylene chloride (h), heptanal (at), (E)-2-pentenal (aj), 2,3-octanedione (az), (Z)-2-penten-1-ol (al), 1-pentanol (ak), 1-octen-3-ol (ay), 1-hexanol (aq), methanethiol (b), 3,5,5-trimethyl-2-hexene (aw), (Z)-4-heptenal (as), octanal (bb), butanal (k), 1-heptanol (av), (E)-2-hexenal (ap), 4,4-dimethyl-1,3-dioxane (ao), (E,E)-2,4-heptadienal (bc), benzaldehyde (ax), 2-ethyl-1-hexanol (bd), nonanal (bh), 2,4-heptadienal (ba), heptane (x), 3,5-octadien-2-one (bg) and 2-hexanone (am). We also noted the average presence of a volatile

compound that contributes to the second principal component: 3-methyl butanal (r). This compound has a mean in the category that is lower than its general mean, but the difference between the two means is not statistically significant.

Category 2/3, comprising seven fish, can be qualified as an intermediate category because it contains neither fish with an excellent state of freshness nor fish with significant spoilage (fish with a poor state of freshness). This transitional category between freshness and spoilage is mainly characterised by the compounds ethanol (d), 3-methyl-1-butanol (ag), 2,3-butanedione (j), 2-methyl-1-butanol (ah), 3-methyl butanal (r), 2-methyl-1-propanol (q), limonene (be) and ethyl acetate (o) whose mean in the category is significantly higher than their general mean. These volatile compounds are also those involved in the second

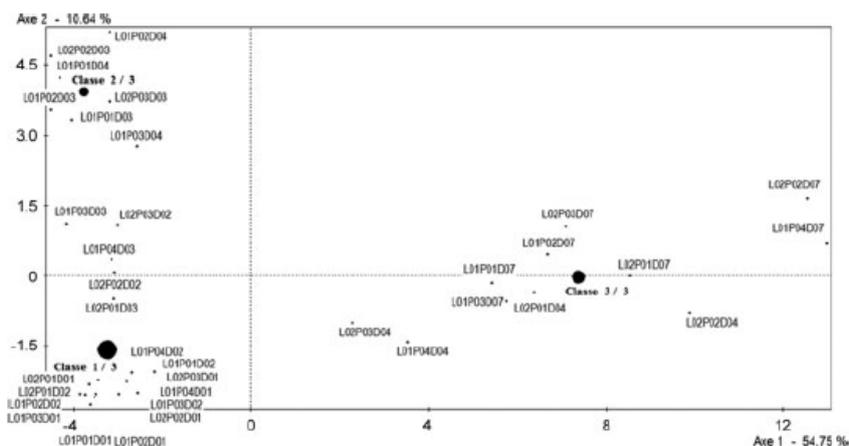


Figure 6. Projections of categories and fish on first two factors.

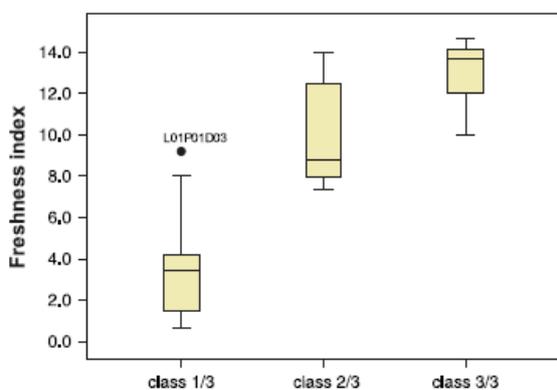


Figure 7. Characterisation of categories by freshness indices.

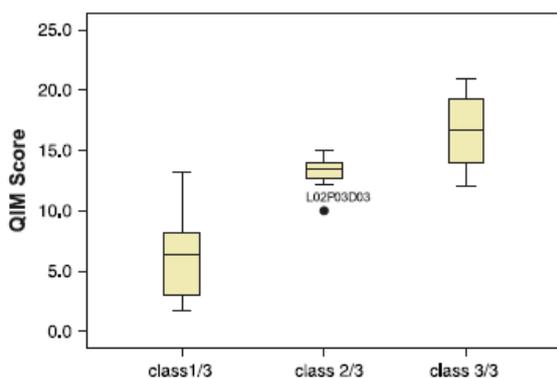


Figure 8. Characterisation of categories by QIM scores.

main trend determined by the PCA. This category 2/3 also contains volatile compounds related to the formation of the PCA's first principal component: 1-penten-3-one (w), 4,4-dimethyl-1,3-dioxane (ao) and 2-hexanone (am). These latter three volatile compounds contribute to the formation of the PCA's first principal component and the characterisation of category 3/3. Unlike the

compounds that characterise this second category, these three volatile compounds have a mean value in category 2/3 that is slightly lower or even null compared with their general mean.

Category 1/3 consists of fish with an excellent state of freshness. The volatile compounds that characterise it generally have a category mean that is significantly smaller than their general mean. These compounds (d, q, o, j) are linked to both the first and second components in the PCA. The most prominent volatile compounds in category 1/3 can be divided into two groups: a group of compounds (f, an, v, ab, aa, w, at, aj, ay, ak, az, al, k, bb, aw, aq, ao, d, q, o, j, b, av, ap, bd, bh, bc, ax, bg) whose mean in the category is non-null but significantly smaller than the mean in the sample ('very significant average presence') and a group of compounds (h, as, x, ba, am) whose mean in the category is totally null ('very significant average absence'). This latter group of compounds can also be found in category 3/3 but with the completely opposite behaviour. The fish L02P01D01 has the profile that is closest to the centre of the category. The compounds that characterise these two axes (Fig. 6) may be compounds that represent fish freshness and spoilage.

To sum up the three categories, the first category 1/3 corresponds to a category with an excellent freshness index, which characterises excellent product quality. For category 2/3, this quality decreases and the whiting starts to deteriorate. For category 3/3, which is the worst category from a freshness/quality viewpoint, spoilage of whiting continues but the product remains acceptable for consumption (freshness index < 18, Fig. 3). We may conclude that axis 1 represents the freshness of whiting and axis 2 characterises spoilage.

CONCLUSIONS

The volatile compounds propanal (f), hexanal (an), 1-penten-3-ol (v), pentanal (ab), 2,3-pentanedione (aa), 1-penten-3-one (w), heptanal (at), (E)-2-pentenal (aj), 2,3-octanedione (az), (Z)-2-penten-1-ol (al), 1-octen-3-ol (ay), 1-pentanol (ak), butanal (k), octanal (bb), 3,5,5-trimethyl-2-hexene (aw), 1-hexanol (aq), 4,4-dimethyl-1,3-dioxane (ao), methanethiol (b), 1-heptanol (av), (E)-2-hexenal (ap), 2-ethyl-1-hexanol (bd), nonanal (bh), (E,E)-2,4-heptadienal (bc), benzaldehyde (ax) and 3,5-octadien-2-one (bg) are found in both category 1/3 (category with excellent freshness quality; negative test values) and category 3/3 (considered a

spoilage category; positive test values). Thus they are relevant compounds because they are found throughout the spoilage process but with a difference in quantity, which shows an alteration in the whiting's quality. These volatile compounds may be considered representative markers of whiting and markers of future freshness.

The compounds methylene chloride (h), (Z)-4-heptenal (as), heptane (x), 2,4-heptadienal (ba) and 2-hexanone (am) are significantly absent from category 1/3 and highly present in category 3/3. They are therefore relevant in the sense that they can be considered spoilage markers. A very fresh product will not contain these compounds; conversely, they will be found in a deteriorated product.

Other compounds present in category 2/3 could be representative of spoilage in whiting and can be considered to be spoilage markers: ethanol (d), 3-methyl-1-butanol (ag), 3-methyl butanal (r), 2-methyl-1-butanol (ah), 2-methyl-1-propanol (q), 2,3-butanedione (j), ethyl acetate (o) and limonene (be). 2-Ethyl furan (y) is worth exploring for use as a freshness marker, which does not characterise axes 1 and 2 but is only significant for category 1/3.

This method is well adapted for recovery of the volatile compounds, because our results present a large number of compounds described in previous studies:^{3,4,15,17,23,24,26} compounds characterising freshness, i.e. hexanal (an), heptanal (at), 1-penten-3-ol (v), (Z)-2-penten-1-ol (al), 1-octen-3-ol (ay), octanal (bb), (E)-2-pentenal (aj) and (E)-2-hexenal, or spoilage, i.e. 3-methyl-1-butanol (ag), ethanol (d), 2-methyl-1-propanol (q), 3-methyl butanal (r), ethyl acetate (o), 2,3-butanedione (j) and 3-hydroxy-2-butanone (ae). SPME/GC/MS may be a useful method at the same time to identify the volatile compounds then to characterise freshness. Complementary studies could allow applications to other species.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Nord-Pas de Calais region (France) and France Agrimer for financial assistance.

REFERENCES

- Olafsdottir G and Fleurence J, Evaluation of fish freshness using volatile compounds – classification of volatile compounds in fish, in *Methods to Determine the Freshness of Fish in Research and Industry, Proceedings of the Final Meeting of the Concerted Action 'Evaluation of Fish Freshness' AIR3CT94 2283*, ed by Olafsdottir G. International institute of refrigeration, Paris, France, pp. 51–69 (1997).
- Alasalvar C, Aishima T and Quantick PC, Dynamic headspace analysis of volatile aroma products in fresh and deteriorated mackerel (*Scomber scombrus*). *Food Sci Technol Int* 1:125–127 (1995).
- Aro T, Tahovonen R, Koskinen L and Kallio H, Volatile compounds of Baltic herring analysed by dynamic headspace sampling–gas chromatography–mass spectrometry. *Eur Food Res Technol* 216:483–488 (2003).
- Olafsdottir G, Jonsdottir R, Lauzon HL, Luten J and Kristbergsson K, Characterization of volatile compounds in chilled cod (*Gadus morhua*) fillets by gas chromatography and detection of quality indicators by an electronic nose. *J Agric Food Chem* 53:10140–10147 (2005).
- Shewan JM, The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes. *Recent Adv Food Sci* 1:167–193 (1962).
- Van Spreekens KJA, Characterization of some fish and shrimp spoiling bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek: Int J Gen Mol Microbiol* 43:283–303 (1977).
- Olafsdottir G, Li X, Lauzon HL and Jonsdottir R, Precision and application of electronic nose for freshness monitoring of whole redfish (*Sebastes marinus*) stored in ice and modified atmosphere bulk storage. *J Aquat Food Prod Technol* 11:229–249 (2002).
- Miller III A, Scanlan RA, Lee JS and Libbey LM, Identification of the volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas fragi*. *J Appl Microbiol* 25:952–955 (1973).
- Miller III A, Scanlan RA, Lee JS, Libbey LM and Morgan ME, Volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas perolens*. *J Appl Microbiol* 25:257–261 (1973).
- Lindsay RC, Josephson DB and Olafsdottir G, Chemical and biochemical indices for assessing the quality of fish packaged in controlled atmospheres, in *Seafood Quality Determination, Proceedings of an International Symposium (University of Alaska Sea Grant Program, Anchorage, Alaska)*, ed. by Kramer DE and Liston J. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 221–234 (1986).
- Josephson DB and Lindsay RC, Enzymic generation of volatile aroma compounds from fresh fish. *ACS Symp Ser* 317:201–219 (1986).
- Durnford E and Shahidi F, Flavour of fish meat, in *Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods*, ed. by Shahidi F. Springer - Verlag, Berlin, pp. 131–158 (1998).
- Kawai T, Fish flavor. *Crit Rev Food Sci* 36:257–298 (1996).
- Alasalvar C, Quantick PC and Grigor JM, Aroma compounds of fresh and stored mackerel (*Scomber scombrus*). *ACS Symp Ser* 674:39–54 (1997).
- Alasalvar C, Taylor KDA and Shahidi F, Comparison of volatiles of cultured and wild sea bream (*Sparus aurata*) during storage in ice by dynamic headspace analysis/gas chromatography–mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 53:2616–2622 (2005).
- Jonsdottir R, Bragadottir M and Olafsdottir G, The role of volatile compounds in odor development during hemoglobin-mediated oxidation of cod muscle membrane lipids. *J Aquat Food Prod Technol* 16:67–86 (2007).
- Prost C, Hallier A, Cardinal M, Serot T and Courcoux P, Effect of storage time on raw sardine (*Sardina pilchardus*) flavor and aroma quality. *J Food Sci* 69:198–204 (2004).
- Duflos G, Cornu M, Coin VM, Antinelli JF and Malle P, Determination of volatile compounds to characterize fish spoilage using HS/MS and SPME–GC/MS analysis. *J Agric Food Chem* 86:600–611 (2006).
- Bene A, Fornage A, Luisier J, Pichler P and Villettaz J, A new method for the rapid determination of volatile substances: the SPME-direct method. Part I: Apparatus and working conditions. *Sensors Actuators B* 72:184–187 (2001).
- Bene A, Hayman A, Reynard E, Luisier J and Villettaz J, A new method for the rapid determination of volatile substances: the SPME-direct method. Part II: Determination of the freshness of fish. *Sensors Actuators B* 72:204–207 (2001).
- Bæk HH and Cadwallader KR, Volatile compounds in flavor concentrates produced from crayfish-processing by-products with and without protease treatment. *J Agric Food Chem* 44:3262–3267 (1996).
- Guillén MD and Errecalde MC, Volatile components of raw and smoked black bream (*Brama raii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) studied by means of solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J Sci Food Agric* 82:945–952 (2002).
- Mansur MA, Bhadra A, Takamura H and Matoba T, Volatile flavor compounds of some sea fish and prawn species. *Fish Sci* 69:864–866 (2003).
- Wierda RL, Fletcher G, Xu L and Dufour J-P, Analysis of volatile compounds as spoilage indicators in fresh king salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during storage using SPME–GC–MS. *J Agric Food Chem* 54:8480–8490 (2006).
- Edirisinghe RKB, Graffham AJ and Taylor SJ, Characterisation of the volatiles of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) during storage by solid phase microextraction and GC–MS and their relationship to fish quality parameters. *Int J Food Sci Technol* 42:1139–1147 (2007).
- Iglesias J and Medina I, Solid-phase microextraction method for the determination of volatile compounds associated to oxidation of fish muscle. *J Chromatogr A* 1192(1):9–16 (2008).
- Duflos G, Coin VM, Moine F and Malle P, Determination of volatile compounds in whiting using SPME GC–MS. *J Chromatogr Sci* 43:304–312 (2005).

Ces premiers résultats montrent qu'il n'existe pas un marqueur de référence de la qualité du poisson mais bien un ensemble de composés volatils aromatiques qui peuvent être considérés comme des marqueurs potentiels de fraîcheur. C'est-à-dire des composés présents dans le poisson extra frais et qui tendent à diminuer voir à disparaître au cours du stockage.

Inversement, nous pouvons définir des marqueurs potentiels d'altération comme des composés qui augmentent tout au long de la conservation.

Ces résultats montrent pour toutes les espèces de fortes ressemblances des profils volatils et des analyses sensorielles entre les poissons analysés à 1 jour de stockage avec ceux analysés à 2 jours de conservation (de la même façon, pour les poissons analysés à 3 et 4 jours de stockage). Par conséquent, les jours 2 et 3 ont été supprimés de nos analyses. Ce nouvel échantillonnage nous permet d'augmenter le nombre de suivis d'altérations sur diverses espèces.

L'ensemble de ces résultats reste une première approche qui nécessite d'être complétée par d'autres essais pour permettre d'appliquer une analyse statistique plus rigoureuse afin d'aboutir à une modélisation de notre méthode.

2^{ème} partie : Etude des composés volatils de la chair de poisson frais

Dans un premier temps, avec l'acquisition d'une nouvelle GC-MS (QP2010+ (Shimadzu)), la méthode présentée « HS-SPME-GC-MS » dans la première partie des résultats a été optimisée :

Au niveau de la préparation de l'échantillon, plusieurs étapes (découpe du filet en cube de 1cm, 50g de chair mélangée dans 100 ml d'eau saturé en NaCl (30%), 120s d'homogénéisation au stomacher, 50 ml de volume prélevé dans un tube de 100ml à centrifuger, centrifugation 10 000tr/min pendant 10 min à 4°C, 11 ml de matrice dans un vial de 20ml (d'où 9 ml de volume d'espace de tête)) n'ont pas subi de modification. Seul un standard interne : le 2-éthyl-phénol a été ajouté en plus du 3-méthyl-3-buten-1-ol déjà présent. Différentes gammes étalons ont été étudiées et ont permis de sélectionner la concentration de 0,4 ppm pour ces 2 standards car leurs réponses sont apparues similaires aux réponses des composés volatils du poisson.

Au niveau de la SPME, la fibre Carboxen-Polydiméthylsiloxane (CAR-PDMS, 75µm) (Supelco), le temps d'équilibre dans l'espace de tête (10 min) et la durée d'adsorption des composés volatils sur la fibre (40min) ont été maintenus (article 1). Des tests de température d'adsorption ont été explorés (30, 40, 50 et 60°C) pour vérifier que la température 50°C de la méthode n'apportait pas d'artefacts oxydatifs ou de composés néoformés de la cuisson. Les résultats ont montré que seuls les composés volatils de la chair de poisson cru étaient extraits.

Au niveau de la désorption, nous avons augmenté la durée de 10 secondes à 1 minute de désorption pour permettre à l'ensemble des analytes de passer dans la colonne SLB-5ms (60m × 0.25mm × 0.25µm) (Supelco).

Au niveau de l'interface entre la GC et la MS, la température qui était de 260°C a été modifiée à 280°C, pour avoir la même température entre l'interface et le four de la GC à la fin du programme de température évitant toute condensation et favorisant ainsi le transfert des composés séparés dans la MS.

Au niveau de l'analyse des spectres, dans la première partie des résultats, l'intégration de des pics des chromatogrammes était réalisée en courant ionique total (TIC) et l'identification des composés volatils se faisait seulement par comparaison de spectre avec la base de données NIST08. Un travail important a été réalisé sur l'étude des ions spécifiques et des différents spectres de chaque composés volatils identifiés dans divers poissons. L'intégration d'un composé volatil est faite en sélectionnant un ion spécifique. Ceci permet de supprimer les erreurs potentielles d'intégration existante en TIC due aux coélutions entre les composés volatils.

Cette étude a permis de détecter un nombre plus important de composés volatils (passage d'une soixantaine à plus d'une centaine). De plus leur identification réalisée à partir des bases de données spectrales a été consolidée avec la détermination de leurs indices de Kovats associés à un contrôle de leur standard. Ces composés volatils répertoriés dans le tableau de l'article 3 sont présents à chaque jours d'analyse dans les diverses espèces de poissons étudiées contrairement aux composés volatils de la première partie des résultats.

Dans un second temps, à partir de cette optimisation, nous nous sommes intéressés à l'ensemble des substances volatiles de divers poissons : bar commun (*Dicentrarchus labrax*), dorade royale (*Sparus aurata*), cabillaud (*Gadus morhua*) et saumon (*Salmo salar*) aux différents stades d'altérations. C'est-à-dire tous les composés volatils qui ont une odeur plus ou moins forte dans des poissons frais jusqu'à des poissons très altérés :

- nous présenterons tout d'abord une étude de l'évolution de l'odeur du bar commun en collaboration avec l'INRA de Clermont-Ferrand/Theix :

Article 2: François Leduc, Pascal Tournayre, Nathalie Kondjoyan, Frédéric Mercier, Pierre Malle, Ossarath Kol, Jean Louis Berdagué, and Guillaume Duflos. **Evolution of volatile odorous compounds during the storage of European seabass (*Dicentrarchus labrax*)**. Food Chemistry. 2012, 131, (4), 1304-1311.

- ensuite nous exposerons une étude sur l'ensemble des composés volatils de ces quatre espèces pour déterminer des marqueurs de qualité du poisson à l'aide d'approches statistiques descriptives. A partir de ces marqueurs, une approche statistique prédictive est envisagée afin d'aboutir à la création d'un modèle de prédiction d'un indice de fraîcheur en fonction du profil des composés volatils du poisson :

Article 3: François Leduc, Assi N'Guessan, Frédéric Krzewinski, Pierre Malle, Ossarath Kol, and Guillaume Duflos. **Proposal for a model to predict the quality of fresh fish stored in crushed ice at 4°C, on the basis of volatile compounds**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Submitted

Synthèse article 2 : L'évolution des composés volatils aromatiques du bar commun (*Dicentrarchus labrax*), stocké 15 jours dans des conditions industrielles à 4°C sous glace, a été étudiée en collaboration avec l'unité Qualité des Produits Animaux de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Clermont-Ferrand/Theix. Le but de ce travail était d'identifier de manière fiable des composés odorants du bar après 1, 4 et 15 jours de stockage afin d'identifier des marqueurs de qualité (fraîcheur ou altération). Pour l'étude de ces composés odorants, une analyse a été réalisée en headspace dynamique (DH) utilisant une extraction « purge and trap » suivie d'une chromatographie gazeuse couplée à la fois à 8 voies d'olfactométrie (8 juges) et à un spectromètre de masse (DH-GC-MS/80). Pour renforcer l'identification de l'ensemble des composés volatils aromatiques, des analyses complémentaires ont été faites en chromatographie gazeuse à une et deux dimensions couplée à la spectrométrie de masse et l'olfactométrie (DH-GC-GC-MS/O) ainsi qu'avec notre méthode HS-SPME-GC-MS et en parallèle d'analyses sensorielles. L'ensemble de ces techniques d'analyse donne des résultats sous forme d'aromagrammes des 8 juges qui renseignent sur l'odeur perçue ainsi que son intensité et sous forme de chromatogrammes qui indiquent la quantité des différents composés volatils. Une superposition de ces aromagrammes et chromatogrammes nous permet d'identifier l'odeur des différents composés volatils de la chair du bar commun.

L'analyse sensorielle, réalisée selon le schéma de notation de la directive européenne 2046/96, a permis de caractériser le niveau de fraîcheur des poissons aux différents jours d'analyse. Les poissons analysés après un jour de stockage sont considérés comme extra frais, les poissons conservés 4 jours sont de moins bonne qualité que les premiers mais sont considérés comme frais et acceptés à la vente contrairement aux poissons conservés 15 jours qui sont altérés et non acceptés à la vente.

Au total 144 composés volatils ont été détectés dans la chair du Bar commun. Seulement 13 d'entre eux ont une odeur significative détectable en GC/O dans la chair du poisson : le méthane-thiobis, le thiophène, le toluène coélué avec l'acide butanoïque éthyl ester, l'hexanal, le 1-hexanol, le 1-octen-3-one, le 1-octen-3-ol, le diméthyl-trisulfide, l'octanal, le 1-nonen-3-ol, le (E)-2-nonenal et 2 composés non identifiés. En prenant comme variable « la durée de stockage » une analyse de variance (ANOVA) des aromagrammes, obtenus aux différents jours d'analyse (jour 1, 4 et 15), permet de mettre en évidence le thiophène,

l'hexanal, le 1-octen-3-one, le diméthyl-trisulfide et le 1-nonen-3-ol comme des marqueurs de qualité du bar. Le thiophène (odeur de végétaux cuits, d'ail) et le 1-nonen-3-ol (odeur de champignon) peuvent être considérés comme des marqueurs de fraîcheur du bar car leurs odeurs diminuent significativement ($p < 0,05$) au cours du stockage du poisson. Inversement l'hexanal (odeur de pomme verte, fruitée), le 1-octen-3-one (odeur de champignon), le diméthyl-trisulfide (odeur soufrée) peuvent être des marqueurs d'altérations car leurs odeurs augmentent significativement ($p < 0,05$) au cours du stockage. On constate que ces composés volatils, qui sont perçus par les juges au niveau de l'olfaction et considérés statistiquement comme des marqueurs de qualité de la chair du Bar commun, ne sont pas détectés en spectrométrie de masse mis à part l'hexanal. Ces 4 composés qui ont un seuil de perception très bas et qui sont en faible quantité dans la chair du poisson sont de bons marqueurs de qualité pour l'analyse olfactive. D'un point de vue spectrométrie de masse, en se focalisant sur les 13 composés odorants, on constate que le méthane-thiobis, l'hexanal, le 1-hexanol, l'octanal et le (E)-2-nonenal sont bien détectés et évoluent de la même manière que ce soit en DH-GC-MS ou HS-SPME-GC-MS. Le 1-hexanol, l'octanal et le (E)-2-nonenal diminuent au cours de stockage et inversement le méthane-thiobis augmente. Ces composés peuvent être de potentiels marqueurs de qualité de la chair du Bar commun.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Chemistry

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

Evolution of volatile odorous compounds during the storage of European seabass (*Dicentrarchus labrax*)

François Leduc^{a,*}, Pascal Tournayre^b, Nathalie Kondjoyan^b, Frédéric Mercier^b, Pierre Malle^a, Ossarath Kol^c, Jean Louis Berdagué^b, Guillaume Duflos^a

^aANSES, Laboratoire des Produits de la Pêche, Bld Bassin Napoléon, 62200 Boulogne-sur-Mer, France

^bInstitut National de la Recherche Agronomique (INRA), UR QuaPA T2A, 63122 Saint Genès-Champagnelle, France

^cUnité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR CNRS 8576, Université de Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 March 2011

Received in revised form 28 July 2011

Accepted 20 September 2011

Available online xxx

Keywords:

Gas-chromatography–olfactometry

Mass spectrometry

Volatile compounds

Fish quality

Quality indicators

ABSTRACT

The aim of this work was to reliably identify odorous compounds of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) after 1, 4 and 15 days of storage in order to find markers of freshness or spoilage. For this purpose, a dynamic headspace gas chromatography olfactometry device (DH–GC–MS/80) was used with a panel of eight sniffers for comprehensive detection of odorants. One- and two-dimensional gas chromatography (GC–GC–MS/O) coupled with olfactometry and mass spectrometry gave reliable identification. More than 144 volatile compounds were detected in seabass flesh, of which only 13 proved to be odorant (their biochemical origins are discussed): methane-thiobis, thiophene, toluene + butanoic acid ethyl ester, hexanal, 1-hexanol, 1-octen-3-one, 1-octen-3-ol, dimethyl-trisulfide, octanal, 1-nonen-3-ol, (E)-2-nonenal and 2 unknown compounds. Amongst these compounds, only thiophene, hexanal, 1-octen-3-one, dimethyl-trisulfide, and 1-nonen-3-ol are proposed as markers of seabass quality.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fish is a fragile flesh, but has outstanding nutritional value. In addition to essential fatty acids (omega-3), whose benefits are now familiar to the general public, they contain a variety of vitamins (B12 and D) and minerals (iodine and selenium). However, fish can cause infections and poisoning if there are problems with its conservation. Fish freshness is therefore a key attribute of its quality. Odour is one of the main quality indicators used by consumers and professionals, because the smell changes rapidly according to the level of freshness. As a result, the key odorous compounds that contribute to this characteristic can be measured and used as quality indicators (Alasalvar, Aishima, & Quantick, 1995; Aro, Tahovonen, Koskinen, & Kallio, 2003). The volatile aromatic compounds characterising odour are principally produced by the action of bacterial or lipid oxidation (Baek & Cadwallader, 1997). Odours of fresh fish are mainly associated with carbonyls and alcohols and are characterised by light, green, delicate, melon, marine plant (Durnford & Shahidi, 1998; Josephson & Lindsay, 1986) and iodised (Prost, Hallier, Cardinal, Serot, & Courcoux, 2004) notes. The spoilage of fish during storage generates volatile compounds with flat and neutral odours, and then rancid, putrid,

ammonia or sulphur odours (Durnford & Shahidi, 1998; Josephson & Lindsay, 1986; Lindsay, Josephson, & Olafsdottir, 1986). The accumulation of volatile compounds combined with other non-volatile compounds changes the flavour and taste of fish during storage (Kawai, 1996).

To characterise the volatile compounds, different extraction methods can be used: static headspace such as solid phase microextraction (SPME) (Bene, Hayman, Reynard, Luisier, & Villettaz, 2001; Duflos et al., 2010) and dynamic headspace (Alasalvar, Anthony Taylor, & Shahidi, 2005; Aro et al., 2003; Josephson, Lindsay, & Stuiber, 1983; Prost et al., 2004; Refsgaard, Haahr, & Jensen, 1999). These extraction methods can be combined with analytical tools such as GC–MS and GC–O (Delahunty, Eyres, & Dufour, 2006). In order to limit analysis time, Berdagué and Tournayre (2004, 2005) has developed a fully computerised eight-way GC–O system (DH–GC–MS/80) that allows, in one analysis, individual aromagrams of a panel of eight judges obtained simultaneously under the same conditions. Under these conditions, it is possible to perform a statistical comparison of aromagrams and to identify the influence of the storage period on volatile compounds to get a better description of odorous compounds. Another advantage of the GC–O coupled with MS is detecting odorous compounds at lower detection thresholds which were not detectable by GC–MS.

In light of the role of odour in fish freshness, the aim of our research was to examine various volatile compounds from seabass flesh and odorous substances during storage by using GC–MS/O,

* Corresponding author.

E-mail address: francois.leduc@anses.fr (F. Leduc).

to ascertain whether there is a relationship between these compounds and fish quality and to determine which of these compounds might be used as markers of quality (freshness or spoilage).

2. Materials and methods

2.1. Nature, origin and preparation of samples

European seabass (*Dicentrarchus labrax*), caught the night before the start of the study, was acquired from Aquanord (Gravelines, France). A batch of whole fish was stored for 15 days, under industrial storage conditions, at +4 °C in self-draining polystyrene boxes with crushed ice. Fresh crushed ice was added daily. Samples were collected and analysed at different levels of quality (Days 1, 4 and 15).

2.2. Sensory evaluation

Sensory evaluation was performed on the whole fish before filleting (Duflos et al., 2010). The method used is the European Union's grading system presented in European Directive 2406/96. This system distinguishes between three freshness categories: E, A and B, corresponding to the various levels of spoilage. Category E (Extra) corresponds to the highest quality level, then quality A and B, while below B, fish is considered to be non-edible. Another category corresponds to the product's discard level. In order to rate this evaluation, these letters have been replaced with numbers: 0 = E, 1 = A, 2 = B and 3 = unacceptable. The lower the number, the fresher the fish and conversely, the higher the number, the greater the spoilage (below a total of 18, all parameters considered, the fish is acceptable).

This sensorial method uses nine parameters to cover the entire fish: mucous layer; pigmentation of the skin; colour of the eyes and degree of sunkenness; colour and odour of the gills; colour, odour and texture of the flesh. Each parameter is judged on its criteria on a scale of 0–3. The most important parameter in this study is the odour of the flesh relative to the general freshness of the fish. The four odour categories are: seaweed (specific) = 0 (corresponding to E); neutral (no odour) = 1 (corresponding to A); slight or disagreeable = 2 (corresponding to B); sour = 3 (corresponding to C).

This sensorial test was carried out by three sniffers trained and specialised in seafoods, and included two different olfactory tests. Each individual sniffer gave a score for the nine parameters used in this EU rating system. The addition of these nine ratings gave an overall score for each sniffer of between 0 and 27. A mean score for the three sniffers was then calculated for each analysis day (Days 1, 4 and 15) along with the standard deviations.

2.3. Dynamic headspace–gas chromatography–mass spectrometry/ eight-way olfactometry analyses (DH–GC–MS/80)

Gas chromatography coupled to multiway olfactometry and mass spectrometry is useful for carrying out rapid, but exhaustive, analyses of the volatile odour-active fraction of a given product with a panel of sniffers (Berdagué & Tournayre, 2005; Berdagué, Tournayre, & Cambou, 2007). This apparatus consists of a chromatograph (Hewlett–Packard 4890D) coupled to a mass spectrometer (Hewlett–Packard 5971S) and to a divider that distributes the volatile component outflow synchronously to eight sniffing ports located in separate booths. The architecture of the system is described by Berdagué and Tournayre (2004, 2005).

The volatile compounds were extracted separately to each dynamic headspace (Tekmar, Cincinnati, OH 45234, USA). For each analysis, 25 g of fish flesh was placed on deactivated glass wool at the bottom of a Pyrex extractor (ref. M5, Maillères, Aubière,

France). The extractor was maintained at 22 °C and purged for 60 min with a flow rate of 40 ml min⁻¹ of helium (Messer, He/U purity: 99.995%). The trap (working length: 180 mm, inside diameter: 1/4 in., packed with Tenax® TA 60/80-mesh adsorbent, Supelco Bellefonte PA 16823, USA) operated at 22 °C. The dry purge step was set at 5 min to eliminate as much water as possible while minimising loss of volatile fraction (Canac-Arteaga, Viallon, & Berdagué, 1999). The volatile components were then desorbed from the trap at 215 °C for 10 min using helium (Messer, He/N55 purity: 99.9995%) and sent into the cryo-focalisation area (cooled at –150 °C with liquid nitrogen).

Chromatography and olfactometry conditions are described in detail by Berdagué et al. (2007).

The GC–O data were acquired using the AcquiSniff® software platform (2003) at a rate of 1 scan s⁻¹. During the sniffing sessions the sniffers were instructed (i) to signal each odour sensed by pressing a push-button for as long as the odour was perceived, (ii) to describe the odours reported orally and (iii) to quantify their intensity on a mental scale, in the present case with five levels (1 = very weak, 2 = weak, 3 = moderate, 4 = strong and 5 = very strong). Sniffers were trained previously, familiarised with the equipment, and were selected based on their sensitivity and ability to detect and consistently describe a wide range of odours in GC–O tests. To describe the odours, the sniffers could use their own vocabulary, which was to remain as simple and precise as possible and exclude all hedonic judgement. The sniffers had no information on the nature of the sample analysed and were remunerated. A digital recording of vocabulary items, intensity and persistence of odours was launched at the 'start of injection' of the volatile compounds into the chromatographic column. After the test (which lasted 35 min) eight aromagrams and eight individual digital audio recordings were obtained. After each session the digital audio data were read to incorporate their information content in the aromagrams using the AcquiSniff® software (2003).

The data were analysed by the VIDEO–Sniff method (Berdagué & Tournayre, 2002). This method makes full use of the sensory information comprising the number of detections, their intensity and duration, and provides a way of processing the vocabulary items used to describe the odours perceived by the eight sniffers. The total olfactory signal corresponding to the overall response of the sniffer panel was expressed as the mean product of intensity and detection according to Berdagué et al. (2007). The VIDEO–Sniff method incorporates the vocabulary used by the sniffers to describe their perceptions of the odours. By sorting the vocabulary into olfactory classes, an aromagram by classes is obtained where each olfactory signal is assigned to at least one class, which is given a specific colour (Table 1). This makes visual interpretation of the aromagram possible (Breme et al., 2009).

2.4. Dynamic headspace–gas chromatography–mass spectrometry/ olfactometry analyses (DH–GC–MS/O)

Sample preparation and the purge and trap conditions were the same as those used for DH–GC–MS/80.

After injection by heating the trap at 220 °C for 2 min, volatiles were separated and detected using a GC–MS set-up composed of a chromatograph (GC 6890, Agilent Technologies) and a capillary column (RTX-5, length: 60 m, internal diameter (ID): 0.32 mm, film thickness: 1 µm) hyphenated to a quadrupole mass detector (MSD 5973 Inert, Agilent Technologies). The capillary column was connected to the mass spectrometer via a deactivated capillary column (length: 0.5 m, ID: 0.10 mm, temperature; SGE mailbox@sge-france.com) and to the sniffing port via a deactivated capillary column (length: 1.7 m, ID: 0.32 mm, temperature 220 °C; SGE mailbox@sge-france.com) using a zero dead volume T-connec-

Table 1
Distribution of vocabulary items used by the eight GC–O sniffers in the eight odour classes.

Odour classes (class colour)	Vocabulary items
Animal (red)	Cured sausage, leather, meat juice, meat, cooked meat, sweating, dried salted sausage, manure, livestock
Earthy-undergrowth (brown)	Wood, fungus, mushroom, mouldy, different fungus, cardboard, forest, moss, fir, wooded, wetland, dry land, earth, undergrowth, earthy
Empyreumatic-spicy (black)	Burnt, peanut, roasted peanut, almonds, roasted almonds, dried fruit, coffee, roast coffee, chocolate, empyreumatic, eucalyptus, smoke, grilled, bread, smoked, mint, minty, pine, grilled hazelnut, hazelnut, hot bread, toast, roast meat, parsley, pepper, chicken, grilled chicken, pastries, biscuit, hot, cooked meat broth
Fruity-floral (pink)	Citrus, lemon, citronella, apple, sweet, fruity, strawberry, grape fruit, fruit juice, orange, candy, fruit drops, flowery, pineapple, peach, red fruits, melon, lily-of-the-valley, floral, fruit, fruit candy, sweet fruity, grapes, flowers, meadow flowers, flowery, strawberry, tobacco, fruity-floral
Lactic-cheesy (yellow)	Hot butter, butter, salted butter, milky, milk, hot milk, cooked milk, lactic, yoghurt, milk product, dirty socks, cheese, feet, cheesemonger, cheesy, foot
Marine-iodine (light blue)	Fish, iodine, iodised, sea, sea water salt, crab, surimi, oyster, mouldy fish
Plastic-chemical-metallic (light grey)	Chemical, plastic, artificially-flavoured sweets, chlorine, swimming pool, pungent chemical, unpleasant chemical, glue, metal, cleaning product, product maintenance, solvent, detergent, burnt plastic, plastic packaging, chemistry, acid
Sulphur (blue)	Sulphur, gas, butane gas, exhaust
Vegetable (green)	Vegetable broth, fresh cabbage, cabbage, spinach, fresh, freshness, greenery, turf, grass, hay, vegetables, greens, leek, onion, baked potato, vegetation
Not classified (white)	Not recognised, no descriptor found, agreeable, disagreeable, perfume, bitter, bitterness, kitchen, hay, etc.

tor (inside tubing diameter: 1/1600, ZTIM Valco® Instruments Co. Inc., PO Box 55603 Houston, TX 77255). The ratio of effluent between sniffing port and mass detector was 1/1. The DH–GC–MS/80 data from the multiport system were synchronised with those from the single-port DH–GC–MS/O set-up by means of internal and/or external analytical standards. The single-port DH–GC–MS/O chromatogram was aligned and processed with the DH–GC–MS/80 aromagram using the AcquiSniff® software (2003).

2.5. Two-dimension (heart-cut type) gas chromatography–mass spectrometry/olfactometry analyses (DH–GC–GC–MS/O)

The equipment used to implement this technique was the same as that previously described for the DH–GC–MS/O analyses. The conditions for extraction, pre-concentration, trapping volatiles and mass spectrometry were also the same. Only chromatographic conditions differed. When the DH–GC–MS/O method did not lead to close phasing between mass spectrometry and olfactometry for a given odorous compound, the elution of this compound was redirected via a series of controlled valves (Valco Instruments Co. Inc., ref DC6WT and DN4WT) to a second cryo-focalisation area (cooled at $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ with liquid nitrogen). Thus, volatile compounds from the first separation were cryo-concentrated ahead of a second polar phase chromatographic column (DB-WAXETR, J&W Scientific, Agilent Technologies – length: 30 m, internal diameter: 0.32 mm, film thickness: $1\text{ }\mu\text{m}$), and then injected (heating at $180\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 min) for DH–GC–GC–MS/O analysis.

2.6. Solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry (SPME–GC–MS)

For solid-phase microextraction (SPME), the fillets were cut into 1-cm cubes, and 50 g of flesh were introduced in a stomacher bag with 100 ml of ultrapure water saturated in NaCl. The contents were then mixed for 2 min in a Stomacher Lab-Blender 400 (Seward, Norfolk, UK). The aqueous phase was removed and centrifuged for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 12,000g (Multifuge 3 S-R Heraeus, Kendro Laboratory Products, Courtaboeuf, France). In accordance with previous studies (Alasalvar et al., 1995; Duflos et al., 2010), 11 ml of aqueous phase from the supernatant of the sample preparation were introduced into a hermetically sealed 20-ml vial. The vial was placed in the sample tray of the Combi-Pal (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) and then transferred to the mixer where it was heated at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ and mixed at 500 rpm for 10 min. After this equilibrium time, the CAR/PDMS SPME fibre was inserted into the headspace of the sample and held there for 40 min at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. The fibre was then injected into the Merlin Microseal injector ($250\text{ }^{\circ}\text{C}$) of the GC equipped with an MS QP2010+ (Shimadzu, Kyoto, Japan) for desorption. The fibre was maintained in the injection port for 1 min. The GC was equipped with an SLB-5ms capillary column ($60\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$) (Supelco, Sigma–Aldrich, France). The gas chromatography conditions are described in detail by Duflos et al. (2010).

2.7. Identification of volatile compounds

The mass spectrometers were configured in the same way for each type of analysis. Volatiles were detected after electronic impact ionisation at 70 eV. Ions were scanned over the range $33 < m/z < 230$ amu.

Volatiles were identified using mass spectra databases (NIST/EPA/NIH 2005 V2.0d; NIST 2008; WILEY 2007, Masslib 1999; MSP Köfel, Industriestrasse 35, CH-3052 Zollikofen, Switzerland), relative retention indices (Kondjoyan & Berdagué, 1996) and chemical standards.

The odour of each candidate structure identified by mass spectrometry was compared to its odour as described in several databases (Flavour-Base 2004: Leffingwell and Associates, Canton, GA, USA; Flavornet 2006; LRI and Odour Database 2006). DH–GC–MS/O and DH–GC–GC–MS/O analyses were performed by the most efficient of the eight sniffers, selected after the DH–GC–MS/80 analyses.

2.8. Statistical analyses

The Fisher test was used to determine which of the olfactory zones of the three Total Olfactory Signals or TOS (obtained with the GC–MS/80 device) corresponding to the three fish were significantly influenced by the period of storage. An ANOVA was performed on each of the 2100 scans (S_t) of the aromagrams according to the model:

$$S_t = \mu + \text{Storage effect}_i + \epsilon_{ij}$$

(with S_t = scan at time t , μ = mean effect, i = three levels of storage, j = 8 sniffers considered as repetitions) (De Freitas et al., 2008). From the 2100 ANOVA thus calculated, it was possible to identify the zones of the aromagram of the total olfactory signal that were significantly and consensually influenced by the period of storage.

3. Results and discussion

3.1. Analysis of freshness or spoilage indices by sampling day

The study consists of 24 measurements taken at three different times: D1 (first day); D4 (fourth day), and D15 (fifteenth day), at a

rate of 4 measurements per period. Two different batches were analysed and the results are presented in Fig. 1. They illustrate both the average trend and the variability of the index (freshness) by storage day. We note that this freshness and/or spoilage indicator tends to rise with the storage time.

According to the classification of sensory evaluation, fish with a score higher than 18 are considered unacceptable (Duflos et al., 2010). We note that the fish stored for 1–4 days would be considered as suitable for consumption, whereas the fish stored for 15 days would not have been suitable for sale. The samples chosen neatly fit the different levels of freshness for fish, i.e. extra-fresh, fresh and spoiled.

It is important to stress that the “odour of the flesh” criterion was found to have the value 0 (level E) on D1, the value 1 (level A) on D4 and finally the value 2 (level B) on D15. This evolving criterion therefore justifies our study of the odorous compounds generated during storage, which could potentially be used to define spoilage markers related specifically to odour.

3.2. Characterisation of the different chemical structures and functions of the volatile fraction of European seabass (*D. labrax*)

An analysis of the flesh of European seabass (*D. labrax*) by DH-GC-MS and DH-GC-GC-MS, at three levels of alteration (1, 4 and 15 days), identified 144 volatile compounds that were classified according to their chemical structure and functions (Table 2). The compounds concerned were mainly alkanes (16), alkenes (22), aldehydes (18), alcohols (16), ketones (35), acids (10), esters (3), furans (6), sulphur compounds (3), benzenes (6) and chlorine compounds (2). A comparison with the SPME-GC-MS results identifies most of the volatile compounds (Table 2).

Most of these volatile compounds in fish can be generated by enzymatic reactions, the autoxidation process or microbial action (Olafsdottir & Fleurence, 1997).

3.3. Aromatic profile of seabass flesh

The olfactory signal (mean intensity) perceived on the different days (1, 4 and 15) on which the flesh of the fish was analysed by DH-GC-MS/80 is shown in Fig. 2a–c. The full signal represents the aromatic profile or aromagram of the fish flesh at mean intensity perceived by the 8 sniffers for each day of analysis. It can be seen that the fish flesh contains few compounds with a significant aroma. Only 13 aromatic zones are clearly distinguished at a mean intensity higher than 1; this is low compared to other animal products such as cheese or cured ham (Berdagué et al., 2007; Théron et al., 2010) for which several zones were identified with a mean intensity between 3 and 5. This low number of peaks with relatively high intensity measured by DH-GC-MS/80 analysis of fish flesh is in line with the “flesh odour” criterion, judged by sensorial analysis, which did not exceed level 2/B (slight odour), even after 15 days of cold storage of whole fish.

Analysis of the vocabulary and grouping of items into odour families (Table 1) led us to break up the signal into 10 odour classes: “Animal”, “Earthy-Undergrowth”, “Empyreumatic-Spicy”, “Fruity-Floral”, “Lactic-Cheesy”, “Marine-Iodine”, “Plastic-Chemical-Metallic”, “Sulphur”, “Vegetable” and “Not classified”. Amongst the hundred and forty-four volatile compounds previously identified, DH-GC-MS/80 analyses evidenced 13 odorous zones of various intensities (Fig. 2), most of which were reliably associated with odorous compounds (Table 3). Fig. 2 displays the verbal information associated with the odorous zones for each aromagram obtained on the 3 different days of analysis. Some of these zones were described consensually by the panel. Thus the odours of hexanal (peak 4) and octanal (peak 9) were described as “Fruity-Floral”, those of 1-octen-3-one (peak 6), 1-octen-3-ol (peak 7) and 1-nonen-3-ol (peak 11) as “Earthy-Undergrowth”, of dimethyl-trisulfide (peak 8) as “Sulphur”, of (E)-2-nonenal (peak 13) as “Empyreumatic-Spicy” and of toluene (peak 3) as “Plastic-Chemical-

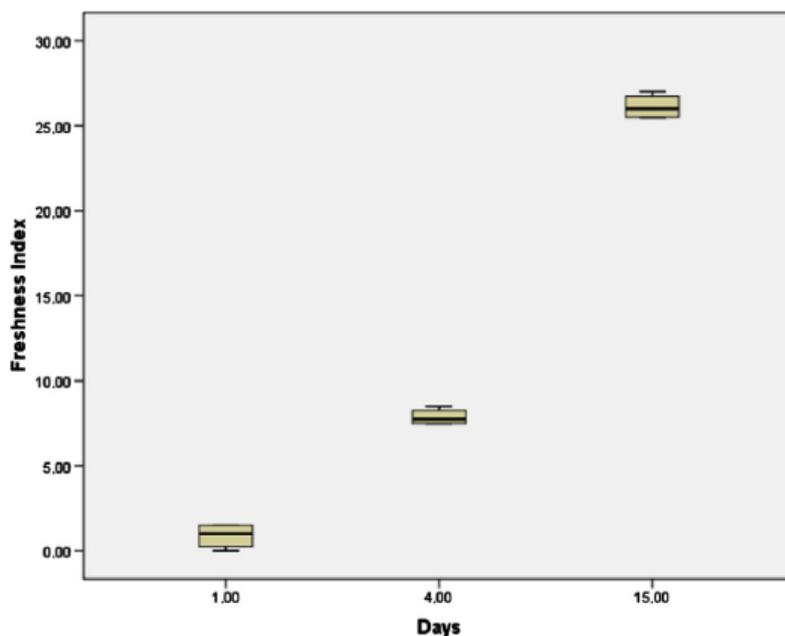


Fig. 1. Comparison of freshness indices according to storage day.

Table 2
Summary of the different structures and chemical functions of the compounds identified by DH–GC–MS and SPME–GC–MS.

Elements	Structures	Main radicals/functions (chemical name)		
CH	Aliphatic: 26 (13)	Alkane (pentane, hexane, octane, nonane, decane, undecane, dodecane, tridecane, tetradecane, pentadecane, hexadecane, heptadecane, 3-methyl-pentane)		
		Alkene (2-pentene, trans-2-hexene, 1-heptene, 1-octene, 4-octene, (Z)-2-octene, 1-nonene, 1-undecene, 1-tetradecene, 1-pentadecene, 2,3-octadiene, (E,E)-2,4-octadiene, 1,3,6-octatriene)		
	Cycloalkane: 1	Alkane (cyclopentane)		
	Cycloalkene: 2 (2)	Alkene (alpha-pinene, limonene)		
	Benzenic: 9 (8)	Alkyl (toluene, m-xylene, p-xylene, o-xylene, benzene, ethenyl-benzene, propyl-benzene, 1-methylethenyl-benzene, 1,3,5-trimethyl-benzene)	Alkene (alpha-pinene, limonene)	
			Alkyne (2-pentene, trans-2-hexene, 1-heptene, 1-octene, 4-octene, (Z)-2-octene, 1-nonene, 1-undecene, 1-tetradecene, 1-pentadecene, 2,3-octadiene, (E,E)-2,4-octadiene, 1,3,6-octatriene)	
			Alkyne (2-pentene, trans-2-hexene, 1-heptene, 1-octene, 4-octene, (Z)-2-octene, 1-nonene, 1-undecene, 1-tetradecene, 1-pentadecene, 2,3-octadiene, (E,E)-2,4-octadiene, 1,3,6-octatriene)	
	CHO	Aliphatic 61 (45)	Aldehyde (acetaldehyde, 2-propenal, 2-methyl-propenal, butanal, 2-butanal, 3-methyl-butanal, 2-methyl-butanal, pentanal, hexanal, trans-2-hexenal, heptanal, octanal, (E,E)-2,4-heptadienal, nonanal, decanal, 2,4-decadienal)	
			Alcohol (ethanol, 2-propanol, 2-methyl-2-propanol, 1-propanol, 2-butanol, 2-methyl-propanol, 1-butanol, 1-penten-3-ol, 3-methyl-butanol, 2-methyl-butanol, 1-pentanol, (Z)-3-hexenol, trans-2-hexen-1-ol, 1-hexanol, (Z)-1,5-octadien-3-ol, 1-octen-3-ol)	
			Ketone (2-propanone, 2,3-butanedione, 2-butanone, 2-pentanone, 2,3-pentadione, 3-hydroxy-2-butanone, 2-hexanone, 3-heptanone, 2-heptanone, 1-octen-3-one, 3-octanone, 6-methyl-5-hepten-2-one, 2-octanone, 2-nonanone, 2-decanone, 2-undecanone, 2-pentadecanone, (E)-6,10-dimethyl-5,6-undecadien-2-one)	
Acid (acetic acid, propanoic acid, butanoic acid, 3-methyl-pentanoic acid, pentanoic acid, hexanoic acid, heptanoic acid, octanoic acid, nonanoic acid, decanoic acid)				
Ester (acetic acid ethyl ester)				
Benzenic 3 (1)			Aldehyde (benzaldehyde)	Ketone (2,5-dimethyl-p-benzoquinone)
				Ester (1,2-benzenedicarboxylic acid, diethyl ester)
Lactone 15 (2)				(Gamma-butyrolactone, gamma-valerolactone, gamma-hexalactone, 3-methyl-gamma-butyrolactone, delta-hexalactone, epsilon-hexalactone, gamma-heptalactone, valerolactone, delta-, 6-ethyl-, octalactone, delta-, gamma-nonalactone, delta-nonalactone, gamma-decalactone, delta-decalactone, gamma-undecalactone, gamma-dodecalactone)
				Ketone (3,3,5-trimethyl-cyclohexanone, 2,6,6-trimethyl-2-cyclohexene-1,4-dione)
Furan 6 (3)				Dihydro (2,5-dihydro-furan, 3,4-dihydro-2H-pyran)
	Aldehyde (2-furancarboxaldehyde)			
Benzofuran 1		Alkyl (2-methyl-furan, butyl-furan, 2-pentyl-furan)		
		Ketone (1,3-isobenzofurandione)		
CHS	Aliphatic 3 (3)	(Methane-thiobis, carbone disulphide, dimethyl-disulphide)		
CHN	Pyrrole 2	(1-methyl-1H-pyrrole, 1H-pyrrole)		
CHNS	Thiazole 1	Alkyl (thiazole)		
CHOS	Aliphatic 1	Ester (ethanethioic acid, S-methyl ester)		
CHBr, Cl	Aliphatic 2 (1)	Br,Cl (bromochloro-methane, dibromochloro-methane)		
CHOSi	1 (1)	Si (trimethyl-silanol)		

The number of compounds for SPME–GC–MS analyses is given in brackets.

Metallic” coeluted with the odour of butanoic acid ethyl ester (peak 3) as “Fruity-Floral”. The descriptions were less consensual for most of the other odorous zones, but were consistent with

the reported or described odours in the databases for the structures identified by mass spectrometry, i.e. methane, thiobis (peak 1), thiophene (peak 2), and peak 5 (1-hexanol + unknown) which are coeluted.

We note that the “Earthy-Undergrowth” and “Fruity-Floral” classes appear to dominate in the aromatic profile of filets of European seabass (Fig. 2a–c).

3.4. Description and origin of the odorous compounds

The biochemical origins of the odorous compounds identified in the fish are relatively well known.

As can be seen in Fig. 2, dimethyl-trisulfide (peak 8) (sulphur odour) was the compound perceived the most intensely and widely by the sniffers. These compounds come essentially from the bioconversion of methionine to methanethiol by the action of a demethylase where methanethiol is the direct precursor of numerous sulphur compounds with particularly low perception thresholds. According to McSweeney and Sousa (2000), these compounds play an active role in the aroma of food matrices. Dimethyl-trisulfide comes from the condensation of methanethiol. The other odorous sulphur compound identified, methane-thiobis (peak 1), is synthesised by the action of microorganisms on amino acids, cysteine and methionine (Guillén & Errecalde, 2002; Hognadottir, 1999). In seafood products these two compounds are associated with the odour of onion, cooked cabbage, spoilage, and sulphur-like and putrid smells (Alasalvar et al., 1995). They are considered as undesirable compounds in mackerel, as they can mask ‘marine’ notes (Alasalvar et al., 1995; Prost et al., 2004).

The second compound most commonly found by the sniffers was 1-octen-3-ol (peak 7) which produced a smell of mushrooms. Eight-carbon alcohols are known to be present in all species of fish (Josephson, Lindsay, & Stuiber, 1984). 1-octen-3-ol (peak 7) comes from the oxidation of unsaturated fatty acids.

It can be seen that dimethyl-trisulfide (peak 8) (sulphur odour) and 1-octen-3-ol (peak 7) (mushroom odour), to which can be added 1-octen-3-one (peak 6) (mushroom odour) are in a zone of coelutions of about 1500 s (Fig. 2). The DH–GC–GC–MS/O analyses confirmed the identification of these three important odorous compounds, which have low detection thresholds (present in trace amounts by simple DH–GC–MS (Table 3)).

Similarly to 1-octen-3-ol (peak 7), 1-octen-3-one (peak 6), 1-nonen-3-ol (peak 11) (mushroom odours) and 1-hexanol (peak 5) are produced by the oxidation of unsaturated fatty acids.

Other compounds, such as aldehydes, come from the oxidation of fats. Saturated and C6–C9 unsaturated aldehydes responsible for “vegetable, green, rancid or fruity” notes detected by olfactometry were mainly derived from the catabolism of unsaturated fatty acids. Hexanal (peak 4), octanal (peak 9) and (E)-2-nonenal (peak 13) belong to this group (Yasuhura & Shibamoto, 1995). These compounds have been considered to be those with the greatest impact on flavour in fresh fish (Josephson, Lindsay, & Stuiber, 1987).

Amongst the compounds derived from condensation reactions, butanoic acid ethyl ester (peak 3) was detected by olfactometry and described as “fruity-floral”. This ethyl ester is coeluted with the toluene, which is described as “chemical”.

3.5. The influence of storage on volatile odorant compounds

When the changes undergone by these 13 aromatic zones in fish during storage are compared (Fig. 2a–c), it can be seen that they differ in varying degrees. The mean aromatic intensity of methane thiobis (peak 1) and toluene + butanoic acid ethyl ester (peak 3) seem to diminish between Day 1 and Day 4 and then to increase between Day 4 and Day 15. For thiophene (peak 2), 1-hexanol + unknown (peak 5), octanal (peak 9), 1-nonen-3-ol (peak

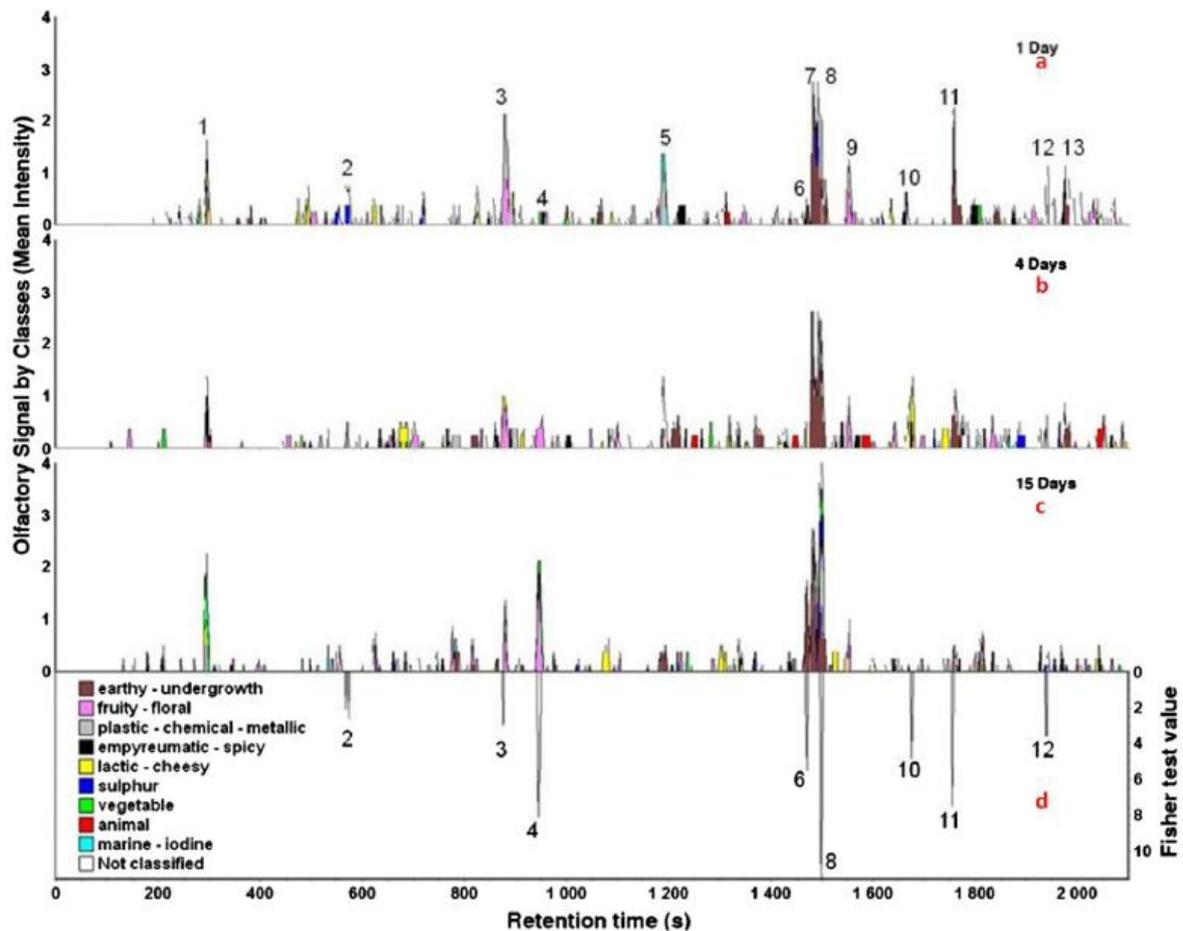


Fig. 2. Olfactory signal of the seabass flesh at three durations of storage (a–c). The breakdown of the olfactory signal into nine odour classes describes the odorant zones belonging to a given olfactory class. The “ANOVAgram” (d) shows the significant differences ($P < 0.01$) of perception of the intensity of the odours according to the durations of storage. The numbers match those given in Table 3.

11), unknown (peak 12) and (E)-2-nonenal (peak 13), the intensity diminishes throughout storage. At first glance, these seven aromatic peaks seem to be potential freshness markers for seabass as their odour diminishes during storage. Inversely, the aromatic intensity of hexanal (peak 4), 1-octen-3-one (peak 6) and dimethyl-trisulfide (peak 8) increases throughout storage and they could therefore be used as alteration markers. For the unknown compound (peak 10), its intensity increases between Day 1 and Day 4 before diminishing between Day 4 and Day 15. The odour intensity of 1-octen-3-ol (peak 7) does not seem to vary between the three stages of fish freshness. This compound (peak 7), the unknown compound (peak 10), methane thiobis (peak 1) and toluene + butanoic acid ethyl ester (peak 3) do not seem to be suitable candidates in our search for aromatic quality markers.

The link between the olfactory peaks and the 13 identified odour zones, the peak areas of the corresponding DH–GC–MS, DH–GC–GC–MS and SPME–GC–MS chromatograms, were compared for the three fish samples (Table 3). It can be seen that only 11 of the 13 odour zones were identified, with peaks 10 and 12 remaining as unknown compounds. It can also be seen that only 6 of the 11 identified peaks were quantified as arbitrary unit areas

(aua) by these different chromatographic techniques; methane-thiobis (peak 1), toluene (peak 3), hexanal (peak 4), 1-hexanol (peak 5), octanal (peak 9) and (E)-2-nonenal (peak 13). The other peaks, thiophene (peak 2), 1-octen-3-one (peak 6), 1-octen-3-ol (peak 7), dimethyl-trisulfide (peak 8) and 1-nonen-3-ol (peak 11) are present as traces. It can be seen that 1-hexanol (peak 3), octanal (peak 5) and (E)-2-nonenal (peak 13) were detected at greater concentrations in the seabass on Day 1 than on the other days, as expected from the analysis of olfactometry data. For methane-thiobis (peak 1) and toluene (peak 3), their quantities diminish between Day 1 and Day 4 and then increase between Day 4 and Day 15.

The olfactory signals (mean intensity of the 8 individual aromagrams) of the three fish (at different levels of alteration) were compared to investigate the effect of storage on the olfactory characteristics of European seabass (Fig. 2d). The Fisher test values revealed that eight zones of the TOS differed significantly ($P < 0.05$: peaks 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12; $P < 0.10$: peak 11) between the three stages of fish spoilage (Fig. 2). It was found that only 8 of the 13 aromatic zones identified vary significantly during storage of seabass. Five of these eight olfactory signals were related to an alcohol, aldehyde, sulphur compound, ketone and thiophene,

Table 3
List of identified potent odorants.

Peak number ^a	Retention time (min) ^b	Chemical name	Main origins ^c	LR1 ^d	Reliability of ID ^e	Descriptors ^f	Storage effect ^g	DH–GC–MS: peak area (aua) ^h	SPME–GC–MS: peak area (aua)
1	5.36	Methane, thiobis	AA	517	A	Grass, milky	NS	Day 1: 1 31 413 Day 4: 86 291 Day 15: 15 11 002	Day 1: 57 608 Day 4: 49 986 Day 15: 1 17 510
2	9.37	Thiophene	–	645	C	Cooked vegetables, sulphur	**	Tr	Tr
3	14.53	Toluene + butanoic acid, ethyl ester	M + SR	769 + 785	M	M	**	Day 1: 23 816 Day 4: 13 359 Day 15: 15 226	Day 1: 53 716 Day 4: 42 839 Day 15: 49 943
4	15.63	Hexanal	LO	798	A	Fruity, green apple	**	Day 1: 12 04 001 Day 4: 2 93 568 Day 15: 1 32 145	Day 1: 1 67 43 908 Day 4: 85 05 780 Day 15: 63 33 751
5	19.75	1-Hexanol + unknown	LO + –	868	A	Chemical, fish, undergrowth	NS	Day 1: 1 36 028 Day 4: 21 853 Day 15: 95 23	Day 1: 3 21 692 Day 4: 2 79 181 Day 15: 63 108
6	24.43	1-Octen-3-one	LO	979	A	Mushroom	**	Tr	Tr
7	24.62	1-Octen-3-ol	LO	981	A	Mushroom	NS	Tr	Tr
8	24.85	Dimethyl-trisulfide	AA	985	B	Sulphur	**	Tr	Tr
9	25.80	Octanal	LO	1002	A	Fruity, lemon, sweet	NS	Day 1: 12 22 337 Day 4: 6 49 254 Day 15: 3 20 197	Day 1: 1 73 508 Day 4: 8 17 45 Day 15: 55 662
10	27.73	Unknown	–	1030	–	Milky, bread, paper, warm, floral, wood	**	–	–
11	29.20	1-Nonen-3-ol	LO	1080	B	Mushroom	*	Tr	Tr
12	32.25	Unknown	–	1140	–	Plastic, gas, chemical	**	–	–
13	33.88	E-2-Nonenal	LO	1163	B	Empyreumatic, cardboard	NS	Day 1: 48 019 Day 4: 18 186 Day 15: 16 901	Day 1: 78 091 Day 4: 44 500 Day 15: 34 143

^a Peak number in Fig. 2.

^b Retention time of the odours in min.

^c Main chemical/biochemical origins: AA, amino acid breakdown; CA, carbohydrate breakdown; Li, lipolysis; LO, lipid oxidation; SR, secondary reactions (esterification, maillard reaction); M, multiple origins.

^d Linear retention indices calculated for the DB-5 capillary column of the GC–MS systems.

^e The reliability of identification or structure proposal is indicated by the following symbols: A, mass spectrum, retention index and odour identical to those of an authentic sample; B, mass spectrum, retention index and odour in agreement with the corresponding literature data; C, tentative identification by mass spectra or by retention indices.

^f Main odours reported by the sniffers.

^g Storage effect: significance: *** $P < 0.01$; ** $P < 0.05$; * $P < 0.1$; NS: not significant.

respectively. Regarding the three remaining olfactory zones, peak 3 corresponds to a coelution between toluene and butanoic acid ethyl ester; peak 10 and 12 to non-identified compounds.

According to the olfactory data, it can be seen that thiophene (peak 2) and 1-nonen-3-ol (peak 11) have odours that tend to diminish during storage, i.e. these compounds smell more strongly on Day 1 than on Day 15. On the other hand, the odour of hexanal (peak 4), 1-octen-3-one (peak 6) and dimethyl-trisulfide (peak 8) increases during storage.

Concerning quantitative analysis with SPME–GC–MS and DH–GC–MS, only toluene and hexanal were quantified. Thiophene, 1-nonen-3-ol, 1-octen-3-one (peak 6), and dimethyl-trisulfide (peak 8) are present as traces, although the 8 sniffers were able to perceive an odour. These four compounds therefore have a low perception threshold compared to the other compounds.

In our search for quality markers for fish, if we only take olfactory data and not qualitative data into account, the six identified compounds from amongst the eight olfactory zones that vary significantly during the storage of fish are potential quality markers for European seabass.

4. Conclusion

By sensorial analysis of fish before filleting we were able to characterise the degree of freshness/quality of the different seabass

analysed. Seabass analysed after one day of storage is considered “extra fresh”, after 4 days is considered “fresh” and still of good quality for human consumption, and after 15 days is considered poor quality and not fit for consumption.

The results show that of the 144 volatile compounds identified during the different stages of freshness/quality of European seabass by DH–GC–MS/80, only 13 are associated with an aroma characterising the fish: methane-thiobis, thiophene, toluene + butanoic acid ethyl ester, hexanal, 1-hexanol, 1-octen-3-one, 1-octen-3-ol, dimethyl-trisulfide, octanal, 1-nonen-3-ol, (E)-2-nonenal and 2 unknown compounds.

Of these 13 odorous zones, only 8 vary significantly in the fish during storage; thiophene, toluene + butanoic acid ethyl ester, hexanal, 1-octen-3-one, dimethyl-trisulfide, 1-nonen-3-ol and 2 unknown compounds. These compounds are therefore potential quality markers for European seabass. In light of the results, thiophene and 1-nonen-3-ol are potential quality markers, as their odours diminish during storage of fish. Inversely, hexanal, 1-octen-3-one and dimethyl-trisulfide are potential alteration markers for European seabass as their odours increase during storage.

Studying volatile odorous compounds in fish flesh by GC–MS or GC–O seems to be a good substitute for sensorial analysis when fish is sold as filets.

In view of these encouraging results, the odorous compounds identified in this study will be tracked for a larger number of samples and fish species at a variety of stages of conservation in order

Please cite this article in press as: Leduc, F., et al. Evolution of volatile odorous compounds during the storage of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Chemistry* (2011), doi:10.1016/j.foodchem.2011.09.123

to develop a method based on volatile markers of freshness and/or alteration to define fish quality.

Acknowledgements

We thank the Nord-Pas de Calais region (France) and France Agrimer for financial assistance.

References

- AcquiSniff®. (2003). *INRA UR QuaPA/T2A, AcquiSniff Software*. St. Genès Champanelle, France: INRA Transfert.
- Alasalvar, C., Aishima, T., & Quantick, P. C. (1995). Dynamic headspace analysis of volatile aroma products in fresh and deteriorated mackerel (*Scombes scombrus*). *Food Science and Technology International*, 1, 125–127.
- Alasalvar, C., Anthony Taylor, K. D., & Shahidi, F. (2005). Comparison of volatiles of cultured and wild sea bream (*Sparus aurata*) during storage in ice by dynamic headspace analysis/gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2616–2622.
- Aro, T., Tahvonen, R., Koskinen, L., & Kallio, H. (2003). Volatile compounds of Baltic herring analysed by dynamic headspace sampling–gas chromatography–mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 216(6), 483–488.
- Baek, H. H., & Cadwallader, K. R. (1997). Character-Impact Aroma Compounds of Crustaceans. *ACS Symposium Series*, 674, 85–94.
- Bene, A., Hayman, A., Reynard, E., Luisier, J., & Villettaz, J. (2001). A new method for the rapid determination of volatile substances: The SPME-direct method. Part II: Determination of the freshness of fish. *Sensors and Actuators B*, 72, 204–207.
- Berdagué, J. L., & Tournayre, P. (2002). Key-flavour compounds and analytical aspects. In *Flavour research at the dawn of the twenty-first century* (pp. 514–519). Tec & Doc ed.
- Berdagué, J. L., & Tournayre, P. (2004). *Dispositif d'analyse par chromatographie en phase gazeuse olfaction et procédé*. France FR0350257.
- Berdagué, J. L., & Tournayre, P. (2005). *Gas chromatography–olfaction analyses device and method*. WO 2005/001470 A2.
- Berdagué, J. L., Tournayre, P., & Cambou, S. (2007). Novel multi-gas chromatography–olfactometry device and software for the identification of odour-active compounds. *Journal of Chromatography A*, 1146(1), 85–92.
- Breme, K., Tournayre, P., Fernandez, X., Meierhenrich, U. J., Brevard, H., Joulain, D., et al. (2009). Identification of odor impact compounds of tagetes minuta l essential oil: Comparison of two GC–olfactometry methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8572–8580.
- Canac-Arteaga, D., Viallon, C., & Berdagué, J. L. (1999). Effect of a condenser on the analysis by dynamic headspace–GC–MS of the volatile fraction of a cheese. *Analysis*, 27(10), 864–870.
- De Freitas, I., Pinon, N., Berdagué, J. L., Tournayre, P., Lortal, S., & Thierry, A. (2008). *Kluyveromyces lactis* but not *pichia fermentans* used as adjunct culture modifies the olfactory profiles of cantalet cheese. *Journal of Dairy Science*, 91(2), 531–543.
- Delahunty, C. M., Eyres, G., & Dufour, J. P. (2006). Gas chromatography–olfactometry. *Journal of Separation Science*, 29(14), 2107–2125.
- Duflos, G., Leduc, F., N'Guessan, A., Krzewinski, F., Kol, O., & Malle, P. (2010). Freshness characterisation of whiting (*Merlangius merlangus*) using an SPME/GC/MS method and a statistical multivariate approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(15), 2568–2575.
- Dumford, E., & Shahidi, F. (1998). Flavour of fish meat. *Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods*, 131–158.
- Guillén, M. D., & Errecalde, M. C. (2002). Volatile components of raw and smoked black bream (*Brama raii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) studied by means of solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Science and Food Agricultural*, 82, 945–952.
- Hognadottir, A. (1999). *Flavor perception and volatile compounds in fish*.
- Josephson, D. B., & Lindsay, R. C. (1986). Enzymic generation of volatile aroma compounds from fresh fish. *Biogenesis of Aroma in ACS Symposium Series*, 317, 201–219.
- Josephson, D. B., Lindsay, R. C., & Stuibler, D. A. (1983). Identification of compounds characterizing the aroma of fresh whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, 326–330.
- Josephson, D. B., Lindsay, R. C., & Stuibler, D. A. (1984). Identification of volatile aroma compounds from oxidized frozen whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Journal of Food Science and Technology*, 17(3), 178–182.
- Josephson, D. B., Lindsay, R. C., & Stuibler, D. A. (1987). Influence of processing on the volatile compounds characterizing the flavor of pickled fish. *Journal of Food Science*, 52(1).
- Kawai, T. (1996). Fish flavor. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(3), 257–298.
- Kondjoyan, N., & Berdagué, J. L. (1996). A compilation of relative retention indices for analysis of aromatic compounds. In I. Laboratoire Flaveur (Ed.). Clermont-Ferrand.
- Lindsay, R. C., Josephson, D. B., & Olafsdottir, G. (1986). Chemical and biochemical indices for assessing the quality of fish packaged in controlled atmospheres. In D. E. Kramer & J. Liston (Eds.), *Seafood quality determination, proceedings of an international symposium (University of Alaska Sea Grant Program, Anchorage, Alaska)* (pp. 221–234). Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- McSweeney, P. L. H., & Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening. *Lait*, 80(3), 293–324.
- Olafsdottir, G., & Fleurence J. (1997). Evaluation of fish freshness using volatile compounds–classification of volatile compounds in fish. Methods to determine the freshness of fish in research and industry In *Proceedings of the final meeting of the concerted action Evaluation of fish freshness AIR3CT94 2283*, Nantes, France.
- Prost, C., Hallier, A., Cardinal, M., Serot, T., & Courcoux, P. (2004). Effect of storage time on raw sardine (*Sardina pilchardus*) flavor and aroma quality. *Journal of Food Science*, 69(5), 198–204.
- Refsgaard, H. H. F., Haahr, A.-M., & Jensen, B. (1999). Isolation and quantification of volatiles in fish by dynamic headspace sampling and mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1114–1118.
- Théron, L., Tournayre, P., Kondjoyan, N., Abouelkaram, S., Santé-Lhoutellier, V., & Berdagué, J. L. (2010). Analysis of the volatile profile and identification of odour-active compounds in bayonne ham. *Meat Science*, 85(3), 453–460.
- Yasuhara, A., & Shibamoto, T. (1995). Quantitative analysis of volatile aldehydes formed from various kinds of fish flesh during heat treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 94–97.

Cette étude nous montre l'efficacité mais aussi les limites de la méthode sensorielle pour analyser la qualité d'un poisson. Lorsque le poisson est entier, cette analyse nous renseigne sur l'acceptabilité ou le refus du produit à la vente. Par contre sous forme de filet comme pour le bar commun, la méthode sensorielle ne peut plus être appliquée.

L'étude des composés volatils odorants de la chair du poisson par GC-MS ou GC-O semble être un bon moyen pour remplacer l'analyse sensorielle lorsque celui-ci est sous forme de filet.

L'ensemble des résultats nous montre :

- que la méthode d'extraction DH « purge and trap » permet d'extraire plus de composés volatils que la méthode HS-SPME. 144 composés volatils ont été identifiés dans le bar commun en DH-GC-MS.

- qu'il existe peu de composés volatils odorants dans la chair du bar commun permettant de différencier un poisson frais d'un poisson altéré. Parmi les 144 composés volatils identifiés seul 13 composés odorants caractérisent la chair du bar commun : hexanal, méthane-thiobis, octanal, toluène, 1-hexanol, E-2-nonenal, butanoic acid éthyl ester, 1-octen-3-one, 1-octen-3-ol, diméthyl-trisulfide, 1-nonen-3-ol + 2 inconnus.

D'après les résultats statistiques, le thiophène, l'hexanal, le 1-octen-3-one, le diméthyl-trisulfide et le 1-nonen-3-ol sont des marqueurs odorants de qualité du bar commun.

Synthèse article 3 : L'évolution des composés volatils aromatiques du bar commun (*Dicentrarchus labrax*) de la dorade royale (*Sparus aurata*), du cabillaud (*Gadus morhua*) et du saumon (*Salmo salar*), stocké 15 jours dans des conditions industrielles à 4°C sous glace, a été étudiée avec la méthode optimisée HS-SPME-GC-MS. Le but de ce travail était d'identifier de manière fiable des composés volatils de ces espèces après 1, 4, 7, 10 et 15 jours de stockage, afin d'identifier des marqueurs de qualité (fraîcheur ou altération).

A ces mêmes jours d'analyse une étude sensorielle basée sur la méthode QIM a été réalisée. Le QIM a permis de caractériser le niveau de fraîcheur des poissons aux différents jours d'analyse en nous fournissant un indice de qualité. Il existe une méthode QIM pour la dorade royale qui a été appliquée dans cette étude pour le bar. Une méthode QIM qui existe pour des filets de cabillaud a été extrapolée pour des filets de saumon. Ces méthodes QIM nous renseignent à la fois sur la qualité du poisson avec son indice mais aussi sur le nombre de jour du stockage. Un poisson qui a un indice de qualité égale à 4 par exemple reflète un poisson de bonne qualité qui a été conservé sous glace pendant environ 4 jours. Plus l'indice augmente et plus la qualité du poisson diminue. Cette indice va de 0 à 15 pour le bar et la dorade qui peuvent être stocké jusqu'à 15 jours. Tandis que pour les filets de cabillaud et de saumon l'indice va de 0 à 14 mais pour avoir un produit de bonne qualité l'indice ne doit pas dépasser 8 car 8 est aussi le nombre de jour maximum de stockage pour ces filets.

Au total 116 composés volatils communs aux diverses espèces et aux différents jours d'analyse ont été détectés. A partir de ces résultats, une approche statistique descriptive avec le logiciel SPAD utilisant des ACP suivi de CAH nous a permis d'identifier des marqueurs de qualité (fraîcheur ou altération) communs à ces 4 espèces : le 2-éthyl-furan, le benzène, le 2-méthyl-furan, le 3-méthyl-butanol, l'éthanol, le carbon-disulfide, le diméthyl-sulfide, l'éthyl-acétate, le 3-méthyl-butanal, le 2-éthyl-1-hexanol, le 2,3-octadione, le chloroforme, le 1-hexanol, le (E,E)3,5-octadien-2-one, et le benzèneacétaldéhyde.

Ensuite une approche statistique prédictive utilisant une régression linéaire multiple a été réalisée pour proposer un modèle pour les poissons entiers (bar et dorade) et un modèle pour les filets de poisson (cabillaud et saumon). Ces deux modèles prédisent un indice de qualité qui est le reflet du QIM en corrélation avec les composés volatils considérés comme des marqueurs de qualité du poisson.

Proposal for a model to predict the quality of fresh fish stored in crushed ice at 4°C, on the basis of volatile compounds.

François Leduc^a, Frédéric Krzewinski^b, Ossarath Kol^b, Pierre Malle^a, Assi N'Guessan^c et Guillaume Duflos^a

^a ANSES, Laboratoire des Produits de la Pêche, Bld Bassin Napoléon, 62200 Boulogne-sur-Mer, France

^b Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR CNRS 8576, Université de Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

^c Laboratoire Paul Painlevé, UMR CNRS 8524 & Ecole Polytechnique Universitaire de Lille, Université de Lille 1, Avenue Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Abstract

The HS-SPME-GC-MS method was used to analyse the volatile compounds from fish after different stages of storage. Sensory analysis was first used to characterise the quality of the fish at these different stages using a quality index method (QIM). A multivariate statistical approach (PCA, AHC) was applied to identify potential quality markers for the fish, using the results of the sensory analyses: 2-ethyl-furan, benzene, 2-methyl-furan, 3-methyl-butanol, ethanol, carbon-disulfide, dimethyl-sulfide, ethyl-acetate, 3-methyl-butanol, 2-ethyl-1-hexanol, 2,3-octadione, chloroform, 1-hexanol, (E,E)3,5-octadien-2-one, and benzeneacetaldehyde.

Based on the quality indices for the different fish and the volatile markers that characterise them, multiple linear regression was carried out to obtain a model to predict the quality index in relation to the fish's volatile composition. This quality index reflects the QIM score that indicates the fish's freshness and its storage time.

Keywords: Freshness; volatile compounds; HS-SPME-GC-MS; QIM; Multiple linear regression

Introduction

Freshness is one of the main quality criteria for the transformation, sale and consumption of fish. Freshness indicates the degree of certain physical, chemical and biological changes in fish. There are two different types of method for assessing the quality of fresh fish: sensory and instrumental. At present, professionals in the sector mainly use two sensory methods, the European Union scheme (1) laid out in EU Directive 2046/96 and the Quality Index Method (QIM) (2). These descriptive methods provide an immediate evaluation of fish quality. However, these inspections are known to give subjective results, even when carried out by experienced and well-trained personnel (3). Furthermore, it is difficult to achieve consistent quantitative sensory results from evaluations performed by different assessors. Consequently, chemical and instrumental methods that are uninfluenced by the subjective opinions of the judges are necessary to satisfy the demand for measuring fish quality (4). But since the consumer is the final judge of quality, most chemical and instrumental methods must obviously concur with sensory evaluations.

Several techniques for measuring volatile substances have been proposed to assess the freshness of fish. An electronic 'nose', based on different sensor technologies, was used in a European project entitled "Developing multisensory techniques for monitoring fish quality" (5). Several electronic nose systems are available on the market, such as the portable electronic nose developed to assess the

freshness of sardines stored at 4°C (6). However, these systems do not provide any detailed information as to either the identity or the concentration of the compounds causing the odour. Moreover, they are incapable of detecting all volatile substances for which there is a low level of concentration and their ability to assess the freshness of fish is limited. In addition, by the time large quantities of these volatile compounds have been produced, the fish is already in an advanced state of decomposition. Methods for extracting volatile substances have been developed to enable all volatile compounds to be observed, whether or not they have a noticeable odour and irrespective of concentration. There are two main methods for extracting volatile compounds, dynamic headspace, which uses "purge and trap" extraction, used by Alasalvar *et al.* (2005) and Grigorakis *et al.* (2009) to identify the quality markers for gilthead seabream (*Sparus aurata*) (7, 8), and static headspace which uses solid phase micro-extraction (HS-SPME), used by Bené *et al.* (2001) and Duflos *et al.* (2010) to characterise fish freshness from volatile compounds identified as quality markers (9, 10). These extraction methods are usually used in combination with analytical tools such as Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS).

This study first monitored changes to the volatile profiles of whole fish (European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*)) and fillets of fish (cod (*Gadus morhua*) and salmon (*Salmo salar*)) stored under industrial conditions at 4°C in crushed ice to track

alterations over 15 days at five different moments. It then proposed models for the whole fish and for fillets, based on a study of a small number of volatile compounds, with which to verify the real freshness index by comparison with a sensory analysis indicating the quality of the fish.

Materials and Methods

Chemicals

Ethyl acetate, (E)-2-heptenal, ethanol, 3-methyl-butanal, 2-methyl-butanal, 1-penten-3-ol, 1-octen-3-ol, 1-heptanol, dimethyl-sulfide, carbon-disulfide, chloroform, 2-ethyl-hexanol, 2-butenal, 2-methyl-furan, 2-methyl-propanal, benzene, benzeneacetaldehyde, butanal, pentanal, hexanal, octanal, heptanal, nonanal, benzaldehyde, 2-ethyl-furan, dodecanal, bromoform, butyrolactone, 2,3-butanedione, 2,3-hexanedione, 2-ethyl-phenol, 3-pentanone, 2-ethyl-cyclohexanone, 3-methyl-1-butanol, 1-hexanol, 2-methyl-propanol, 1-butanol, 3-methyl-3-buten-1-ol, 1-pentanol, (Z)-2-penten-1-ol, alkanes C5-C15 came from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Carboxen (CAR)/polydimethylsiloxane (PDMS) StableFlex SPME fibre (75 μm) came from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Before first use, each SPME fibre was conditioned as recommended by the manufacturer. NaCl came from Oxoid Ltd (Basingstoke, UK) and Milli-Q water (high-performance liquid chromatography water) from Fisher Scientific Labosi (Elancourt, France).

Sample preparation

European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*), caught the night before the start of the study, were obtained as whole fish from Aquanord (Gravelines, France). Cod (*Gadus morhua*) and salmon (*Salmo salar*) were obtained as fillets from Viviers Marins (Boulogne sur mer, France) and caught four days before the start of the study. The fish were stored in crushed ice at 4°C in self-draining polystyrene boxes for 15 days. Fresh crushed ice was added daily. Sensory evaluation and volatile analysis were performed on days 1, 4, 7, 10 and 15 (on three different fish each day). Sensory evaluation was performed by three panellists familiar with the sensory evaluation of fish. Following sensory evaluation, each fish was filleted. The next step was according to previous work. The fillets were cut into 1 cm cubes, then 50 g of flesh was introduced into a stomacher bag with 100 ml of ultrapure water saturated with NaCl. The contents were mixed for 2 min in a Stomacher Lab-Blender 400 (Seward, Thetford, UK). The aqueous phase was removed and centrifuged at 12,000 \times g for 10 min at 4°C (Multifuge 3 S-R Heraeus, Kendro Laboratory Products, Courtaboeuf, France).

Sensory Evaluation - QIM

The QIM is based on significant sensory parameters for whole fish and fish fillets using many weighted parameters and a score system from 0 to 4 demerit points. Scores are added to give an overall sensory score, the quality index. QIM gives scores of zero to very fresh fish, with an increasingly larger total result as fish deteriorates.

The Quality Index Method Developed for Raw Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) (11) was adapted to European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Quality index 0-15.

The QIM developed for cod fillets (*Gadus morhua*) (12) without skin with a Quality index 0-14 was also used for salmon fillets.

SPME Headspace Analysis

In accordance with previous studies (10), 11 mL of aqueous phase from the supernatant of sample preparation was introduced into a hermetically sealed 20 mL vial. The vial was placed in the sample tray of a CombiPAL (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) and then transferred to the mixer, where it was heated at 50°C and mixed at 500 rpm for 10 min. After this equilibrium time the CAR/PDMS SPME fibre was inserted into the headspace of the sample and held there for 40 min at 50°C. The fibre was then removed from the headspace and inserted into the Merlin Microseal injector (250°C) of a gas chromatograph (GC) coupled with an MS-QP2010+ mass spectrometer (MS) (Shimadzu, Kyoto, Japan) for desorption. The fibre was maintained 1 minute. For each day and each fish, six replicated measurements were performed.

GC-MS Parameters

The GC was equipped with an SLB-5ms capillary column (60m \times 0.25mm \times 0.25 μm) (Supelco, Sigma Aldrich, France). The GC conditions were as follows: oven temperature set initially to 35°C (5 min hold), increased to 100°C at 10°C min⁻¹ then increased to 280°C at 20°C min⁻¹ and maintained at 280°C for 5 min; the splitless mode was used for injection, with a purge time of 2 min. The fibre was maintained in the injection port for 1 min. The electron impact MS conditions were as follows: temperature of interface, 280°C; ionisation voltage, 70 eV; mass range, m/z 33-200. After each injection the fibre was heated to 300°C for 10 min in the SPME fibre conditioner. Volatile compounds were identified using mass spectral databases (National Institute of Standards and Technology (NIST) 2008), relative retention indices (13), Linear Retention Index (LRI) and chemical standards. The peak area of the tentatively identified compounds was integrated from the specific ion for each of the molecules to avoid co-elution problems.

Statistical Analysis

Eighty-five measurements were taken for whole fish (sea bass and seabream) and 40 for the filleted fish (salmon and cod) and were then subjected to statistical analysis divided into several parts but identical for each species. First we described and analysed the freshness and spoilage indices on the various sampling days using PASW Statistics 18 (SPSS, Paris, France). A graphic approach based on control charts of the individual index values was used for this first part. These control charts were used to analyse the daily progression of freshness and/or spoilage indices. The second part of our statistical analysis groups together the analysed fish samples and identifies the volatile compounds that characterize their categories. For this, we used SPAD 7 (SPAD, Paris, France) to select a set of relevant volatile compounds via the first two trends in a

principal component analysis (PCA). We then performed an ascending hierarchical classification (AHC) of the first two factors. The categories were then analysed in relation to the selected volatile compounds and the freshness and/or spoilage indices.

Finally, we used the volatile compounds identified as potential quality markers to propose a statistical model using multiple linear regression developed with PASW Statistics 18 (SPSS, Paris, France). Multiple linear regression is used to establish the relationship between an explained variable y (the result of the QIM sensory analysis) and a set of several explanatory variables x_n (the volatile compounds selected as potential quality markers). The statistical model giving the relationship between the response and the explanatory variables to predict fish freshness can be written as follows:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \dots + \beta_p x_{ip} + \varepsilon_i$$

($i=1, 2, \dots, n$) where n is the number of measurements, p is the number of volatile compounds,

y_i is the freshness index by reference to the QIM score of the different individuals

β_p are the coefficients used as estimated parameters for the model,

x_{ip} are the explanatory variables, the normalised quantity measured by HS-SPME-GC-MS for the volatile compounds considered as quality markers,

ε_i is the random error relative to the measurement i that we assumed to come from a normal distribution of null mean and unknown variance that we estimate in the same way as the model coefficients.

Results and discussion

Sensory evaluation of fish QIMs

The study consisted of 30 measurements for sea bass and 15 measurements for gilthead sea bream taken at five different moments during conservation: D01 (after one day), D04 (4 days), D07 (7 days), D10 (10 days) and D15 (15 days), with three measurements on each day of analysis. Twelve measurements were taken for cod and twelve for salmon fillets at four different moments: D04, D07, D10 and D15, again with three measurements on each day of analysis.

QIM analysis was applied to the different batches of fish and the results are given in Figure 1a-b. They show both the mean trend and the variability of the quality index according to the number of days of storage for the different species. Figure 1a shows how the quality indices for sea bass and gilthead sea bream evolved during conservation in crushed ice at 4°C, while Figure 1b shows the same for the cod and salmon fillets.

We can see that the quality indices tended to increase with storage time for these four species. We can also observe that the quality index for gilthead sea bream is similar to the index for sea bass. The same can be noted for the indices for the fillets of salmon and cod. It is important to note that the QIM quality index provides information both about the number of days the fish have been stored and, indirectly, about their freshness.

According to Cardenas Bonilla *et al.* 2007 (12), cod fillets should be stored for no more than eight days to produce a quality product. According to the results in Figure 1b, the fillets of cod and salmon conserved for four days were of good quality. The fillets conserved for seven days had a QIM score of about 8, meaning that they were of inferior quality and barely suitable for consumption. We consider that the sea bass and sea bream fillets conserved for 10 and 15 days had deteriorated and were therefore not fit for consumption.

Figure 1 shows that whole sea bass and sea bream can be conserved for a maximum of 15 days but that during this time the quality of these species deteriorates. We consider that fish stored for one day are of very high quality, for four days are of good quality, for seven days are of medium quality, for 10 days are of inferior quality but fit for consumption and for 15 days are of very inferior quality and not fit for consumption.

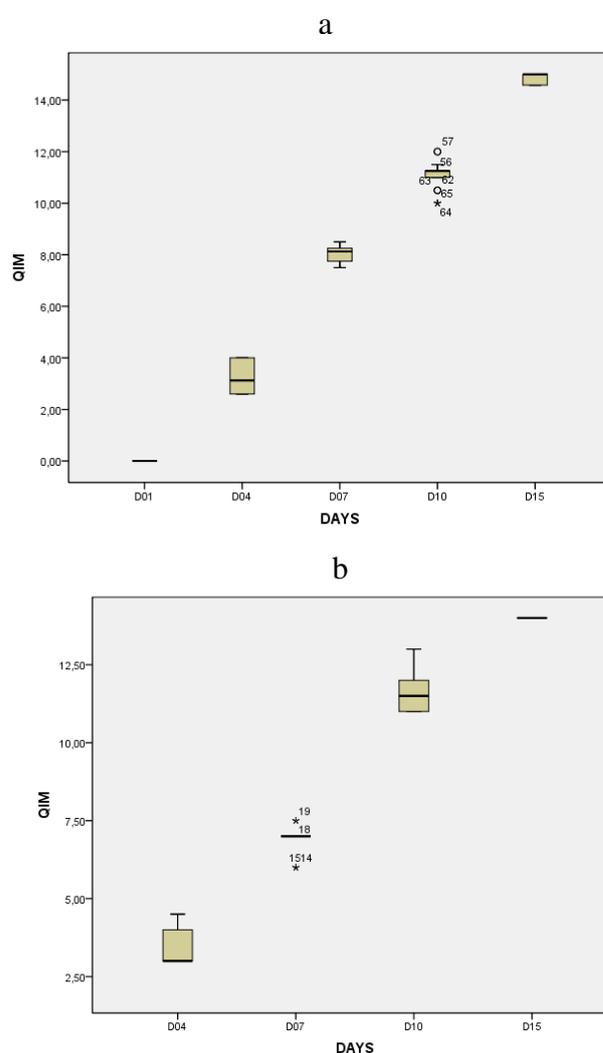


Figure 1: Comparison of the quality indices obtained by QIM according to the number of days of storage for sea bass and sea bream (a), and for fillets of cod and salmon (b)

Identifying the volatile compounds from the flesh of sea bass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead sea bream (*Sparus aurata*), cod (*Gadus morhua*) and salmon (*Salmo salar*) by HS-SPME-GC-MS.

An analysis of the flesh of sea bass (*D. labrax*), gilthead sea bream (*S. aurata*), cod (*G. morhua*) and salmon (*S. salar*) by HS-SPME-GC-MS, at five levels of alteration (after 1, 4, 7, 10 and 15 days), identified 116 volatile compounds which are classified according to their chemical functions in Table I. The compounds concerned are aldehydes (27), ketones (20), alkanes (13), alcohols (12), benzenes (12), furans (6), esters (5), chlorine compounds (2), sulfur compounds (3) and unclassified compounds (14).

Most volatile compounds in fish are generated by enzyme reactions, oxidation and microbial action (14).

Table I: Volatile compounds identified by HS-SPME-GC-MS in gilthead seabream, European sea bass, cod and salmon fish samples during storage

Compounds	LRI	Selected Ion	Identification
Alcohols 12			
Ethanol	< 500	45	MS, LRI, Std
2-methyl-1-propanol	629	74	MS, LRI, Std
1-butanol	664	56	MS, LRI, Std
1-penten-3-ol	682	57	MS, LRI, Std
3-methyl-3-buten-1-ol,	728	56	MS, LRI, Std
3-methyl-1-butanol	734	70	MS, LRI, Std
1-pentanol	763	70	MS, LRI, Std
(Z)-2-penten-1-ol	765	68	MS, LRI, Std
1-hexanol	869	56	MS, LRI, Std
1-heptanol	972	70	MS, LRI, Std
1-octen-3-ol	981	85	MS, LRI, Std
2-ethyl-1-hexanol	1031	57	MS, LRI, Std
Aldehydes 27			
Acetaldehyde	< 500	43	MS, LRI
Propanal	< 500	58	MS, LRI, Std
2-methyl-propanal	554	41	MS, LRI, Std
Butanal	596	44	MS, LRI, Std
2-butenal	649	70	MS, LRI, Std
3-methyl-butanal	653	58	MS, LRI, Std
2-methyl- butanal	663	57	MS, LRI, Std
Pentanal	696	58	MS, LRI, Std
(E)-2-pentenal	750	83	MS, LRI
Hexanal	789	44	MS, LRI, Std
(E)-2-Hexenal	851	83	MS, LRI
(Z)-4-heptenal	898	84	MS, LRI
Heptanal	900	70	MS, LRI, Std
2,4-hexadienal	910	81	MS, LRI
(E)-2-heptenal	961	41	MS, LRI, Std
Benzaldehyde	969	106	MS, LRI, Std
2,4-heptadienal	1000	81	MS, LRI
Octanal	1002	84	MS, LRI, Std
(E,E)-2,4-heptadienal	1015	81	MS, LRI
(E)-2-octenal	1062	70	MS, LRI
Nonanal	1108	82	MS, LRI, Std
(E)-2-nonenal	1165	57	MS, LRI
Decanal	1210	82	MS, LRI, Std
(E)-2-decenal	1272	71	MS, LRI

Undecanal	1312	82	MS, LRI
2-undecenal	1370	70	MS, LRI
Dodecanal	1425	57	MS, LRI, Std

Ketones 20

2,3-butanedione	589	86	MS, LRI, Std
2-butanone	600	57	MS, LRI
2-pentanone	684	43	MS, LRI
2,3-pentadione	693	100	MS, LRI
3-pentanone	694	86	MS, LRI, Std
2,3-hexanedione	776	71	MS, LRI, Std
2-hexanone	780	43	MS, LRI
3-heptanone	884	57	MS, LRI
2-heptanone	888	58	MS, LRI
6-methyl-2-heptanone	956	43	MS, LRI
2,3-octanedione	983	43	MS, LRI
2-ethyl-cyclohexanone	1050	83	MS, LRI, Std
(E,E)-3,5-octadien-2-one	1075	95	MS, LRI
Acetophenone	1078	105	MS, LRI
3-nonanone	1088	113	MS, LRI
2-nonanone	1093	58	MS, LRI
3,5-octadien-2-one	1099	95	MS, LRI
2-hydroxy-acetophenone	1180	121	MS, LRI
2-undecanone	1295	58	MS, LRI
4-isopropyl-acetophenone	1334	147	MS, LRI

Esters 5

Acetic-acid, methyl-ester	523	43	MS, LRI
Ethyl-acetate	613	70	MS, LRI, Std
Butanoic acid, methyl ester	724	74	MS, LRI
Octanoic acid, ethyl ester	1194	83	MS, LRI
Decanoic-acid, methyl ester	1323	74	MS, LRI

Furans 6

3-methyl-furan	603	82	MS, LRI
2-methyl-furan	611	82	MS, LRI, Std
2-ethyl-furan	697	81	MS, LRI
2-pentyl-furan	991	81	MS, LRI
Benzofuran	1005	118	MS, LRI
2,3-dihydro-benzofuran	1161	120	MS, LRI

Alkanes 13

2-methyl-butane	< 500	42	MS, LRI
Pentane	500	43	MS, LRI, Std
Hexane	600	57	MS, LRI, Std
Heptane	700	43	MS, LRI, Std
Octane	800	43	MS, LRI, Std
Nonane	900	43	MS, LRI, Std
Decane	1000	57	MS, LRI, Std
Undecane	1100	71	MS, LRI, Std
Dodecane	1200	57	MS, LRI, Std
Tridecane	1300	71	MS, LRI, Std
Tetradecane	1400	85	MS, LRI, Std
Pentadecane	1500	57	MS, LRI, Std
Hexadecane	1600	57	MS, LRI, Std

Terpenes 2

Alpha-pinene	940	93	MS, LRI
Limonene	1037	68	MS, LRI
Benzene compounds 12			
Benzene	656	78	MS, LRI, Std
Toluene	760	91	MS, LRI
Ethylbenzene	860	91	MS, LRI
m-xylene	869	91	MS, LRI
Styrene	892	104	MS, LRI
1-chloro-2-ethylbenzene	1046	125	MS, LRI
Benzeneacetaldehyde	1054	91	MS, LRI, Std
1-chloro-3-ethylbenzene	1066	125	MS, LRI
1,2,4,5-tetramethylbenzene	1134	119	MS, LRI
2,4-dimethylbenzaldehyde	1174	83	MS, LRI
1,3-bis(1,1-dimethylethyl)-benzene	1260	175	MS, LRI
1-methyl-1-propylpentyl-benzene	1502	105	MS, LRI
Chlorine compounds 2			
Methylene chloride	528	84	MS, LRI
Chloroform	622	83	MS, LRI, Std
Sulfur compounds 3			
Carbonyl sulfide	< 500	60	MS, LRI
Dimethyl sulfide	516	62	MS, LRI, Std
Carbon disulfide	533	76	MS, LRI, Std
Unclassified compounds 14			
Unidentified	698	59	
Unidentified	740	45	
Unidentified	748	70	
Unidentified	875	45	
Methane, tribromo	894	173	MS, LRI, Std
Butyrolactone	914	42	MS, LRI, Std
Unidentified	942	193	
Unidentified	953	55	
Unidentified	974	281	
Unidentified	1058	57	
2-methoxy-phenol	1095	81	MS, LRI
2-ethyl-phenol	1144	107	MS, LRI, Std
Unidentified	1148	70	MS, LRI
Lilac aldehyde C	1327	55	MS, LRI

Identification of quality markers common to the 4 species studied

The results for each species – sea bass (*D. labrax*), gilthead seabream (*S. aurata*), cod (*G. morhua*) and salmon (*S. salar*) – obtained with HS-SPME-GC-MS during storage were analysed separately. A statistical analysis was carried out with the same exploratory approach as in the works of Duflos *et al.* 2010 (10) to identify potential quality markers for these fish. For each species, we carried out principal component analysis (PCA) with the first two factors followed by ascending hierarchical classification (AHC) and a description of the

classes which involved selecting the principal volatile compounds accounting for more than 80% of the first two axes (Figure 2a-d).

It can be seen that the classes created clearly show the storage time for the fish, for each of the four species. If we take the example of cod (Figure 2a), Class 1/4 includes all the fish analysed after four days of conservation, Class 2/4 includes the fish analysed after seven days, Class 3/4 the fish analysed after 10 days and Class 4/4 the fish analysed after 15 days. These match the results of sensory analysis and we can say that Class 1/4 contains fresh fish, Class 2/4 contains fish of lesser quality, Class 3/4 contains altered fish and Class 4/4 includes very deteriorated fish. After the AHC, a description of the classes allowed us to discover which volatile compounds, among the 116 identified by HS-SPME-GS-MS, characterise and are the most representative of the different classes of fish freshness. If we again take the example of cod, the volatile compounds representing Class 1/4, which tend to diminish during storage, can be considered as potential freshness markers, i.e. compounds that are present in large quantities in fresh fish and which tend to diminish or even disappear during storage (10). Inversely, the compounds representative of Class 4/4, and even Class 3/4, and which tend to increase during storage, our potential spoilage markers in cod. These potential freshness or spoilage markers are therefore indicative of fish quality.

With reference to the different classes and the way they evolve during storage, the volatile compounds that could be used as quality indicators and that are common to all four species are: 2-ethyl-furan, benzene, 2-methyl-furan, 3-methyl-butanol, ethanol, carbon-disulfide, dimethyl-sulfide, ethyl-acetate, 3-methyl-butanol, 2-ethyl-1-hexanol, 2,3-octadione, chloroform, 1-hexanol, (E,E)3,5-octadien-2-one, and benzeneacetaldehyde. Some of these potential quality markers have been described in several previous studies: 3-methyl-butanol and dimethyl-sulfide in herring and gilthead sea bream (7) (15), ethanol, 2-methyl-propanol, 3-methyl-butanol, 3-methyl-butanol and ethyl-acetate in cod (16) and 2,3-octadione in mackerel (17). These 15 potential quality markers are the explanatory variables for multiple linear regression.

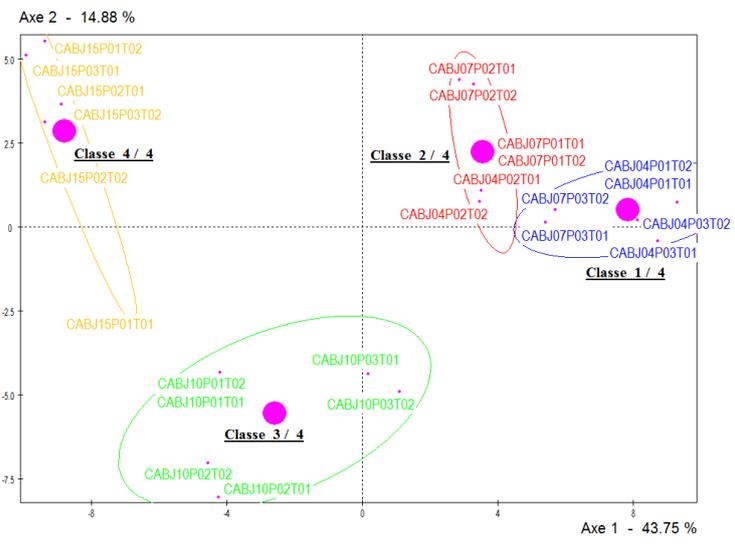
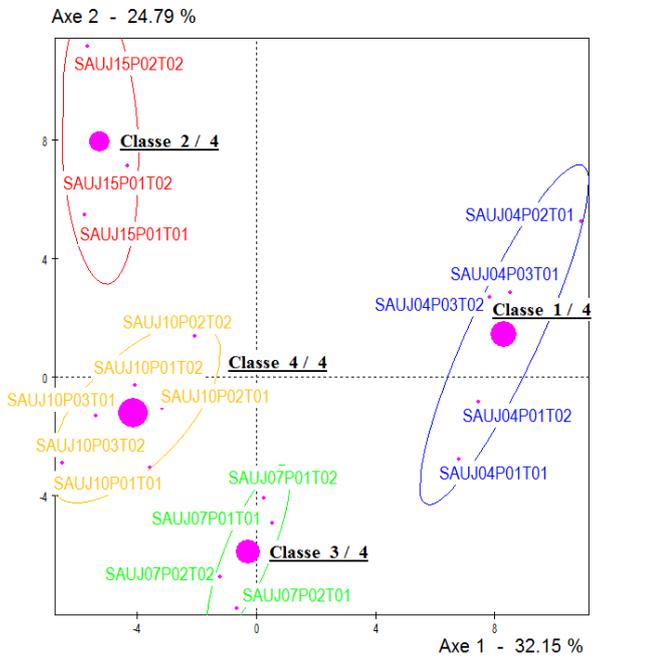
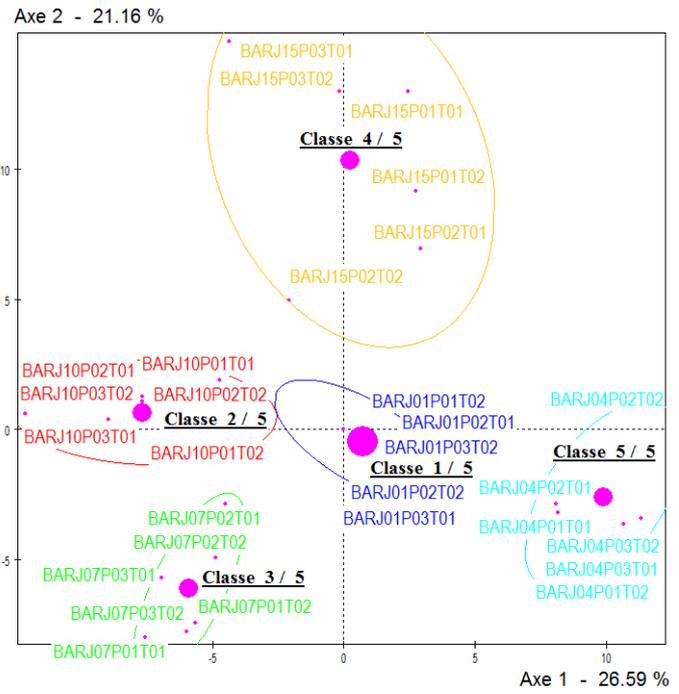
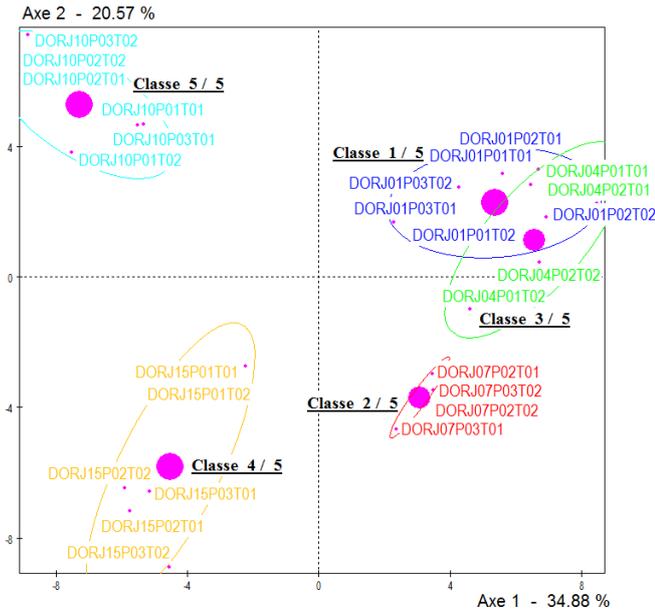


Figure 2: PCA and AHC for cod (a), gilthead sea bream (b), European sea bass (c) and salmon (d)

BAR, DOR, CAB, SAU = seabass, sea bream, cod, salmon / Jx = number of days in storage / Px = number of fish / Tx = repeatability

Predicting the freshness index of fish

Multiple linear regressions (MLRs) were performed to model and predict the quality index y_i of the fish using 15 volatile compounds identified as quality markers by the different PCAs and AHCs (the values of the volatile compounds were normalised). This quality index reflects the QIM score which gives us the fish's freshness and the number of days of conservation. This index ranges from 0 to 15 days for whole fish (sea bass and seabream) and from 0 to 14 days for filleted fish (salmon and cod).

We thus created two models for predicting a quality index based on the volatile compounds for whole fish (Table II) and for fish fillets (Table III). The two models are separate in our study because the deterioration of fish fillets occurs more rapidly than for a whole fish, so that the results cannot be processed together.

Table II summarises the prediction model for the quality index of whole fish and the different statistical tests for constructing and validating the model (summary of models, ANOVA, Fisher's test, table of coefficients).

Table II: Prediction model for whole fish (sea bass and seabream)

Summary of models					
<i>R</i>	<i>R</i> ²	<i>Adjusted R</i> ²	<i>Standard error of the estimate</i>	<i>Variation of F</i>	
.925	.855	.823	2.277	27.121	
ANOVA					
	<i>Sum of the squares</i>	<i>Degrees of freedom</i>	<i>Mean square</i>	<i>F</i>	<i>Significance</i>
Regression	2109.892	15	140.659	27.121	0.000
Residual	357.856	69	5.186		
Total	2467.748	84			
Variable	Coefficients	Standard error	t	Significance	
(Constant)	1.770	1.626	1.089	.280	
Ethanol	10.431	82.812	.126	.900	
Dimethyl-sulfide	106.949	110.668	.966	.337	
Carbon-disulfide	4.415	17.821	.248	.805	
2-methyl-furan	-1354.390	1040.030	-1.302	.197	
Ethyl-acetate	2382.350	1263.398	1.886	.064	
Chloroform	167.989	101.482	1.655	.102	
3-methyl-butanol	10912.273	3951.416	2.762	.007	
Benzene	-374.658	317.419	-1.180	.242	
2-ethyl-furan	-77.519	45.865	-1.690	.096	
3-methyl-butanol	640.948	228.178	2.809	.006	
1-hexanol	269.257	217.922	1.236	.221	
2,3-octadione	414.125	163.265	2.537	.013	
2-ethyl-1-hexanol	-1600.213	862.490	-1.855	.068	
Benzeneacetaldehyde	47114.155	13827.667	3.407	.001	
(E,E)3,5-octadien-2-one	1172.167	898.135	1.305	.196	

It can be seen in this first model that the number of measurements for "whole individual fish" ($n = 85$) is greater than the number of variables or "volatile compounds" ($p = 15$). In addition, the statistical results show that there is no colinearity between the 15 variables. Also, from the results given in the summary of models (Table II), we can find an $R^2 = 0.855$, so the 15 compounds therefore explain 85.5% of the variability of the QIM quality index observed in the 85 measurements. By referring to the ANOVA table and the significance, we can deduce that the model is statistically relevant for explaining the values of the quality index, y_i .

Using the table of coefficients (Table II), the model for predicting the quality index for European sea bass and gilthead seabream can be estimated by:

$$\hat{y}_i = 1.770 + 10.431 [\text{ethanol}] + 106.949 [\text{dimethyl-sulfide}] + 4.415 [\text{carbon-disulfide}] - 1354.390 [2\text{-methyl-furan}] + 2382.350 [\text{ethyl-acetate}] + 167.989 [\text{chloroform}] + 10912.273 [3\text{-methyl-butanol}] - 374.658 [\text{benzene}] - 77.519 [2\text{-ethyl-furan}] + 640.948 [3\text{-methyl-butanol}] + 269.257 [1\text{-hexanol}] + 414.125 [2,3\text{-octadione}] - 1600.213 [2\text{-ethyl-1-hexanol}] + 47114.155 [\text{benzeneacetaldehyde}] + 1172.167 [(E,E)3,5\text{-octadien-2-one}]$$

This model was obtained with 15 independent variables and explains 85.5% of the variability of the QIM quality index. It has a standard deviation of residuals estimated at 2.277, i.e. the model for predicting a fish quality index with 15 markers gives a QIM quality index to within plus or minus 2.277. We can therefore know the number of days a fish has been stored in crushed ice at 4°C, and therefore indirectly know its quality, with an estimated error of 2.277. The

Significance column in Table II shows that from among the 15 volatile compounds used, benzene, 1-hexanol and (E,E)3,5-octadien-2-one make a statistically significant contribution if we accept a risk of 5%.

In the same way, Table III shows the quality prediction model for filleted fish. This model was obtained with the same 15 independent variables and explains 94.3% of the variability of the fish quality index ($R^2 = 0.943$). This model has a standard error of residuals estimated at 1.279; the quality index for cod and salmon fillets can be protected to within plus or minus 1.279.

Table III: Prediction model for fish fillets (cod and salmon)

Summary of models					
<i>R</i>	<i>R</i> ²	<i>Adjusted R</i> ²	<i>Standard error of the estimate</i>	<i>Variation of F</i>	
,971	,943	,907	1,279	26,313	
ANOVA					
	<i>Sum of the squares</i>	<i>Degrees of freedom</i>	<i>Mean square</i>	<i>F</i>	<i>Significance</i>
Regression	646.112	15	43.074	26.313	.000
Residual	39.288	24	1.637		
Total	685.400	39			
Variable	Coefficients	Standard error	t	Significance	
(Constant)	6.827	3.707	1.842	.078	
Ethanol	70.013	60.645	1.154	.260	
Dimethyl-sulfide	13.603	181.690	.075	.941	
Carbon-disulfide	8.879	8.922	.995	.330	
2-methyl-furan	-5690.099	1702.444	-3.342	.003	
Ethyl-acetate	-557.848	1189.285	-.469	.643	
Chloroform	14394.333	7511.022	1.916	.067	
3-methyl-butanal	-274.097	729.931	-.376	.711	
Benzene	-959.425	506.485	-1.894	.070	
2-ethyl-furan	3.575	24.837	.144	.887	
3-methyl-butanol	-395.516	203.106	-1.947	.063	
1-hexanol	4184.178	923.917	4.529	.000	
2,3-octadione	63.968	32.744	1.954	.063	
2-ethyl-1-hexanol	1778.127	660.267	2.693	.013	
Benzeneacetaldehyde	373.489	247.838	1.507	.145	
(E,E)3,5-octadien-2-one	-558.991	569.485	-.982	.336	

The model for predicting the quality index for fillets of cod and salmon is therefore:

$$\hat{y}_i = 6.827 + 70.013 [\text{ethanol}] + 13.603 [\text{dimethyl-sulfide}] + 8.879 [\text{carbon-disulfide}] - 5690.099 [2\text{-methyl-furan}] - 557.848 [\text{ethyl-acetate}] + 14394.333 [\text{chloroform}] - 274.097 [3\text{-methyl-butanal}] - 959.425 [\text{benzene}] + 3.575 [2\text{-ethyl-furan}] - 395.516 [3\text{-methyl-butanol}] + 4184.178 [1\text{-hexanol}] + 63.968 [2,3\text{-octadione}] + 1778.127 [2\text{-ethyl-1-hexanol}] + 373.489 [\text{benzeneacetaldehyde}] - 558.991 [(E,E)3,5\text{-octadien-2-one}]$$

This model can be used to predict the number of days fish fillets have been stored in crushed ice at 4°C to within plus or minus 1.279. Knowing the values of each of the 15 volatile compounds selected, we can predict the number of days the fish fillets have been stored and determine whether they are fresh or deteriorated. If y_i is higher than 8, the fillets are considered to have been altered. In the same way, the Significance column in Table III shows the individual contribution of each of the 15 compounds used in the

model. In the case of the fillets studied here, we can deduce that the most statistically significant compounds, with a risk of 0.05, are 2-methyl-furan and 1-hexanol.

The graphs in Figure 3 – for whole fish in (a) and fillets in (b) – shows the fit between the quality indices predicted by the models and the quality indices observed. The graphs also provide a way of qualifying the statistical hypotheses related to the residual values and assumed to be taken from a normal distribution. The fact that the values lie relatively close to the first bisector justifies the use of the prediction models.

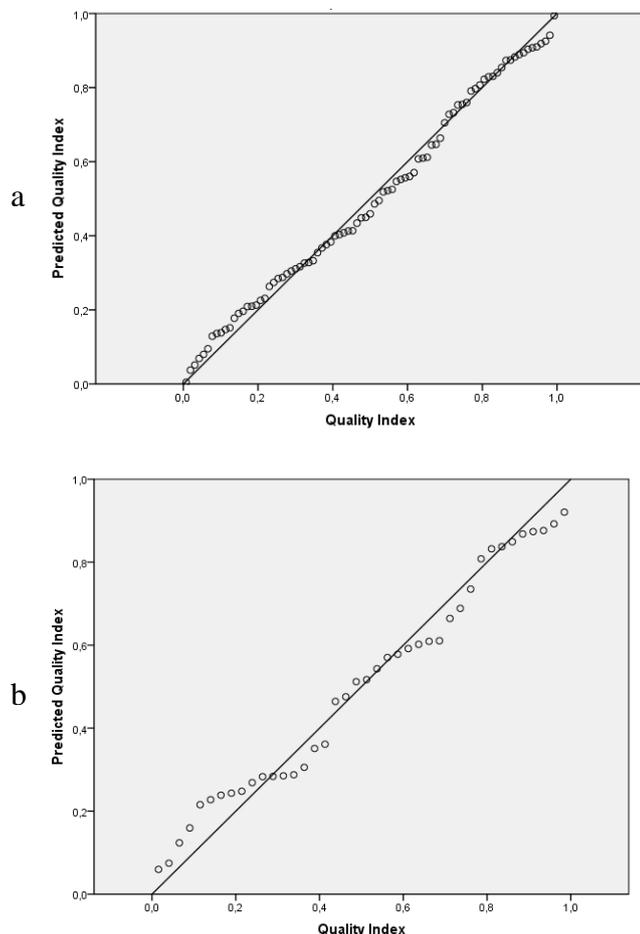


Figure 3: Regression line drawn against the prediction obtained in the calibration model.

Whole fish (a) and fillets of fish (b)

Conclusion

A study of the volatile compounds from various species of fish (European sea bass, gilthead seabream, salmon and cod), after different periods of storage (4°C in crushed ice), by HS-SPME-GC-MS, in correlation with QIM sensory analysis using a multivariate statistical approach, allowed us to identify 15 potential quality markers for fish.

By using a multiple linear regression, we proposed one model for whole fish and a second for filleted fish. The two models predict a quality index, ranging from 0 to 15 for whole fish and 0 to 14 for fillets, using a function based on 15 volatile compounds that correlates with the QIM score for the fish.

These results represent real progress as they offer a way of characterising the quality of fish using a small number of volatile compounds.

References

1. Council Regulations (EC) No 2406/96 of 26 November 1996, Laying Down Common Marketing Standards for Certain Fishery Products. *Off. J. Eur. Commun. No. L-334/2*, 23.12.1996.
2. Larsen, P.; Heldbo, J.; Jespersen, C. M.; Nielsen, J., Development of a Method for Quality Assessment of Fish for Human Consumption Based on Sensory Evaluation. In *Quality Assurance in the Fish Industry*, Huss, H. H.; Jakobsen, M.; Liston, Eds. Elsevier: **1992**; pp 351-358.
3. Olafsdóttir, G.; Martinsdóttir, E.; Oehlenschläger, J.; Dalgaard, P.; Jensen, B.; Undeland, I.; Mackie, I. M.; Henehan, G.; Nielsen, J.; Nilsen, H., Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science & Technology* **1997**, 8, (8), 258-265.
4. Pons-Sánchez-Cascado, S.; Vidal-Carou, M. C.; Nunes, M. L.; Veciana-Nogués, M. T., Sensory analysis to assess the freshness of Mediterranean anchovies (*Engraulis encrasicolus*) stored in ice. *Food Control* **2006**, 17, (7), 564-569.
5. Olafsdottir, G.; Nesvadba, P.; Di Natale, C.; Careche, M.; Oehlenschlager, J.; Tryggvadottir, S. V.; Schubring, R.; Kroeger, M.; Heia, K.; Esaiassen, M.; Macagnano, A.; Jorgensen, B. M., Multisensor for fish quality determination. *Trends in Food Science and Technology* **2004**, 15, (2), 86-93.
6. El Barbri, N.; Llobet, E.; El Bari, N.; Correig, X.; Bouchikhi, B., Application of a portable electronic nose system to assess the freshness of Moroccan sardines. *Materials Science and Engineering C* **2008**, 28, (5-6), 666-670.
7. Alasalvar, C.; Taylor, K. D. A.; Shahidi, F., Comparison of Volatiles of Cultured and Wild Sea Bream (*Sparus aurata*) during Storage in Ice by Dynamic Headspace Analysis/Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53, (7), 2616-2622.
8. Grigorakis, K.; Fountoulaki, E.; Giogios, I.; Alexis, M. N., Volatile compounds and organoleptic qualities of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed commercial diets containing different lipid sources. *Aquaculture* **2009**, 290, (1-2), 116-121.
9. Béné, A.; Hayman, A.; Reynard, E.; Luisier, J. L.; Villettaz, J. C., A new method for the rapid determination of volatile substances: the SPME-direct method: Part II. Determination of the freshness of fish. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2001**, 72, (3), 204-207.
10. Duflos, G.; Leduc, F.; N'Guessan, A.; Krzewinski, F.; Kol, O.; Malle, P., Freshness characterisation of whiting (*Merlangius merlangus*) using an SPME/GC/MS method and a statistical multivariate approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2010**, 90, (15), 2568-2575.
11. Huidobro, A.; Pastor, A.; Tejada, M., Quality Index Method Developed for Raw Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). In Blackwell Publishing Ltd: **2000**, 65, 1202-1205.

12. Cardenas Bonilla, A.; Sveinsdottir, K.; Martinsdottir, E., Development of Quality Index Method (QIM) scheme for fresh cod (*Gadus morhua*) fillets and application in shelf life study. *Food Control* **2007**, 18, (4), 352-358.
13. Kondjoyan, N.; Berdagué, J. L., A compilation of relative retention indices for analysis of aromatic compounds. In INRA, L. F., Ed. Clermont-Ferrand, **1996**.
14. Olafsdottir, G.; Fleurence, J. In *Evaluation of fish freshness using volatile compounds-classification of volatile compounds in fish*, Methods to determine the freshness of fish in research and industry, proceedings of the final meeting of the concerted action "Evaluation of fish freshness" AIR3CT94 2283, Nantes (France), 1997; Nantes (France), **1997**, 51-69.
15. Aro, T.; Tahovonen, R.; Koskinen, L.; Kallio, H., Volatile compounds of Baltic herring analysed by dynamic headspace sampling-gas chromatography-mass spectrometry. *European food research and technology* **2003**, 216, (6), 483-488.
16. Olafsdottir, G.; Jonsdottir, R.; Lauzon, H. L.; Luten, J.; Kristbergsson, K., Characterization of volatile compounds in chilled cod (*Gadus morhua*) fillets by gas chromatography and detection of quality indicators by an electronic nose. *Journal of agricultural and food chemistry* **2005**, 53, (26), 10140-10147.
17. Iglesias, J.; Medina, I., Solid-phase microextraction method for the determination of volatile compounds associated to oxidation of fish muscle. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1192, (1), 9-16.

3^{ème} partie : Application de la méthode HS-SPME-GC-MS à une autre problématique que la fraîcheur et à une autre matrice (crevette)

Dans cette partie, nous avons appliqué notre technique HS-SPME-GC-MS pour étudier les composés volatils sur des produits autres que le poisson frais. Dans un premier temps, cette méthode a été utilisée pour différencier un poisson frais d'un poisson ayant subi une congélation et décongélation :

Article 4 : Leduc, F.; Krzewinski, F.; Le Fur, B.; N'Guessan, A.; Malle, P.; Kol, O.; Duflos, G., **Differentiation of fresh and frozen-thawed fish (whole and fillets): European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*), cod (*Gadus morhua*) and salmon (*Salmo salar*), using volatile compounds by solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry.** Journal of the Science of Food and Agriculture. Submitted: 25-May-2011

Puis dans un second temps, la technique a été utilisée sur une étude de bioconservation de la crevette, en collaboration avec l'IFREMER de Nantes. La bioconservation -ou biopréservation- vise à prolonger la durée de vie des aliments en maîtrisant la croissance des flores pathogènes ou d'altération par l'utilisation de flores protectrices. Cette étude s'est penchée sur la qualité sensorielle et l'évolution physico-chimiques (pH, glucose, acide L-lactique, amines biogènes, acides aminés libres et les composés volatils) pendant le stockage à 8°C de crevettes cuites décortiquées inoculées seulement avec la bactérie spécifique d'altération *Brochothrix thermosphacta* et mélangée avec la souche de protection *Lactococcus Piscium* CNCM I-4031. Notre technique est utilisée dans le but d'étudier les composés volatils produits par les microorganismes et ainsi voir si une différenciation est possible entre un produit bioconservé ou non :

Article 5: Fall, P. A.; Pilet, M. F.; Leduc, F.; Cardinal, M.; Duflos, G.; Guérin, C.; Joffraud, J.-J.; Leroi, F., **Sensory and physicochemical evolution of tropical cooked peeled shrimp inoculated by *Brochothrix thermosphacta* and *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 during storage at 8 °C.** International Journal of Food Microbiology. **2011**. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.015

Synthèse article 4 : La différenciation d'un poisson frais d'un poisson congelé/décongelé est de nos jours très important car il est nécessaire de différencier ces produits pour éviter les pratiques frauduleuses qui consistent à l'échange entre des produits congelés/décongelés et des produits frais pour la vente. Il est donc important de développer des méthodes analytiques pour l'évaluation de la fraîcheur d'un produit afin de bien le différencier d'un produit décongelé.

Le but de ce travail est de caractériser les composés volatils des produits frais et des poissons congelés/décongelés dans un délai court et sur des produits extra frais pour permettre cette différenciation. Le travail sur des produits extra frais s'explique car dans la plupart des cas les poissons sont congelés très rapidement après la pêche et que lorsque la congélation, le stockage et la décongélation sont exécutés correctement, les propriétés sensorielles des poissons sont très similaires à celles d'échantillons frais, ce qui rend très difficile de déterminer si un poisson a déjà été congelé.

La plupart des méthodes (enzymatiques, physiques, physiologiques et de spectroscopies) qui essaient de réaliser cette différenciation sont fastidieuses et longues. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux composés volatils dans des produits extra frais et dans des produits congelés à -20°C pendant un et trois mois. La décongélation a été réalisée à 4°C durant la nuit la veille du jour de l'analyse. A ces trois stades (frais, congelé 1 mois et 3 mois), les composés volatils ont été étudiés par HS-SPME-GC-MS dans des poissons entiers avec le bar commun et la dorade royale et dans des produits mis en filets avec le cabillaud et le saumon. Pour compléter cette étude, des analyses microbiologiques avec le dénombrement de la flore totale et de deux bactéries d'altération (*Shewanella putrefaciens* et *Pseudomonas spp*) et l'analyse des amines volatils (Azote Basique Volatil Total et TriMéthylAmine) ont été réalisées. Ces analyses complémentaires ont montré que la congélation, le stockage et la décongélation des produits ont été exécutés correctement car nous ne constatons pas d'évolution de la flore totale et de la flore d'altération ainsi que l'ABVT et TMA pour les poissons congelés jusqu'à 3 mois par rapport aux produits frais. Même si nous ne l'avons pas mis en évidence dans cet article, au cours des jours d'analyse nous avons constaté que les propriétés sensorielles des poissons frais et des poissons congelés/décongelés étaient similaires, ce qui renforce les bonnes conditions de congélation, stockage et décongélation.

L'analyse des profils volatils par HS-SPME-GC-MS des poissons frais et des produits congelés/décongelés a permis de mettre en évidence une certaine évolution des composés volatils de la même façon qu'au cours des suivis d'altération des poissons frais. Il est important de noter qu'il n'y a pas d'apparition de nouveaux composés volatils au cours d'une congélation. Les composés identifiés sont similaires aux composés définis pendant les travaux de suivis d'altération. Seules leurs concentrations sont différentes. Pour les quatre espèces, une analyse descriptive (ACP et CAH) a été réalisée pour mettre en évidence différentes classes et leurs variables qui les caractérisent. Cette analyse a permis une bonne différenciation des poissons frais, des poissons congelés pendant 1 mois et des produits congelés pendant 3 mois. Quatre composés volatils communs aux espèces, qui caractérisent les différentes classes, ont été mis en évidence : le diméthyl-sulfide, le 3-méthyl-butanol, l'éthyl acétate et le 2-méthyl-butanol. Ces 4 composés qui ont été définis comme des marqueurs d'altération au cours des précédents travaux sur le poisson frais sont considérés comme de potentiels marqueurs de différenciation entre un produit frais et un produit ayant subi une congélation. La quantité de ces 4 composés dans un produit congelé un mois est supérieure à un poisson frais très altéré qui a été stocké plus de 15 jours. La méthode HS-SPME-GC-MS peut être une potentielle technique de différenciation entre des produits frais et des produits congelés. Il reste cependant des travaux de quantification de ces marqueurs et de validation de méthode pour tirer des conclusions mais ces travaux semblent prometteurs.

Differentiation of fresh and frozen-thawed fish (whole and fillets): European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*), cod (*Gadus morhua*) and salmon (*Salmo salar*), using volatile compounds by solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry

François Leduc¹, Frédéric Krzewinski², Bruno Le Fur⁴, Assi N'Guessan³, Pierre Malle¹, Ossarath Kol², Guillaume Duflos¹

¹ ANSES, Laboratory for Fishery Products, Bld Bassin Napoléon, 62200 Boulogne-sur-Mer, France.

² Unite de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR CNRS 8576, Université de Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

³ Laboratoire Paul Painlevé, UMR CNRS 8524 & Ecole Polytechnique Universitaire de Lille, Université de Lille 1, Avenue Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

⁴ Haliomer, 15-17 rue Magenta, 62200 Boulogne-sur-mer, France

ABSTRACT

BACKGROUND:

A simple method, based on solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC-MS), was developed for studying the volatile profiles of whole fish samples of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*), and fillets of cod (*Gadus morhua*) and salmon (*Salmo salar*) during frozen storage in order to be able to differentiate a fresh product from one that has been frozen.

Analysis of volatile compounds was performed on these two product types, fresh and after freezing/thawing following storage at -20°C for 30 and 90 days.

RESULTS / CONCLUSION:

More than a hundred volatile compounds were found by SPME-GC-MS. Statistical processing by principal component analysis (PCA) and ascending hierarchical classification (AHC) was used to classify the samples into categories and verify the possibility of separating fresh samples from those which had been frozen and thawed. The compounds to be used as differentiators were identified. Four compounds were common to both the whole products and the fillets: dimethyl sulfide, 3-methyl-butanal, ethyl acetate and 2-methyl-butanal. Not only were they found in larger quantities after thawing but they also increased with the length of storage at -20°C. These four compounds can therefore be considered as markers of differentiation between a fresh product and one that has been frozen.

KEYWORDS: Volatile compounds; frozen-thawed fish; solid-phase microextraction; gas chromatography-mass spectrometry

INTRODUCTION

Differentiation of fresh fish from frozen-thawed fish is nowadays very important:

- freezing is an effective means of storing fish and regulating stocks of fresh products by thawing according to demand, which enables suppliers to respond more readily to variations in consumer needs. A method is therefore needed to prevent fraudulent practices.
- a method of characterising a thawed product is also essential for fish that are consumed raw (sushi, sashimi) and for which special regulations should apply: freezing at -20°C for at least 24 h for risk products (Regulations (EC) No. 178/2002, 853/2004 and 2074/2005).

If freezing, storage and thawing are performed correctly, it is difficult to use sensory properties to differentiate a fresh

product from a frozen-thawed one¹. It is therefore important to develop analytical methods for evaluating the freshness of a product in order to differentiate it from a thawed product.

Several studies have been performed on the differentiation of fresh and frozen-thawed fish. Enzymatic (alpha-glucosidase assays and hydroxyacyl-CoA dehydrogenase or HADH assays), physical (measuring electrical resistance through the use of a Torrymeter) and physiological methods have all been studied²⁻⁶. Methods have been performed using infrared and fluorescent spectroscopy⁷ and Vis/NIR spectroscopy⁸⁻¹⁰. Other methods based on examination of the crystalline lens of the eye¹¹ have also been observed. However these methods are all tedious, time-consuming and cannot be applied to all species.

Analysing volatile compounds from frozen then thawed fish, in order to differentiate it from fresh products, has not yet been fully exploited. Only one study has explored the volatile profile of gilthead seabream in correlation with

peroxides and thiobarbituric acid as indicators¹². Volatile compounds have also been studied in order to characterise the freshness of fresh produce stored with ice (dimethylamine, trimethylamine (TMA), volatile acids and aldehydes were identified as degradation products in fish)¹³⁻¹⁵. Since then, characterising the volatile profile of a product has become a useful tool for evaluating its organoleptic quality and can be used to guarantee the authenticity of foods. In fact, the volatile profile may be considered as a chemical fingerprint of the product: the nature and relative quantities of compounds in the volatile fraction are distinctive features of the product¹⁶.

Solvent-free techniques, such as dynamic headspace (DH) and solid-phase microextraction (SPME) are widely used for extracting volatile compounds from different matrices, with the compounds in question generally being identified using gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS)^{17, 18}.

The aim of this work is to characterise the volatile compounds that could distinguish fresh fish from frozen-thawed fish in a short timeframe and on very fresh products.

EXPERIMENTAL

Chemicals

Ethyl acetate, (E)-2-heptenal, ethanol, 3-methyl-butanal, 2-methyl-butanal, 1-penten-3-ol, 1-octen-3-ol, 1-heptanol, dimethyl-sulfide, carbon-disulfide, chloroform, 2-ethyl-hexanol, 2-butenal, 2-methyl-furan, 2-methyl-propanal, benzene, benzeneacetaldehyde, butanal, pentanal, hexanal, octanal, heptanal, nonanal, benzaldehyde, 2-ethyl-furan, dodecanal, bromoform, butyrolactone, 2,3-butanedione, 2,3-hexanedione, 2-ethyl-phenol, 3-pentanone, 2-ethyl-cyclohexanone, 3-methyl-1-butanol, 1-hexanol, 2-methyl-propanol, 1-butanol, 3-methyl-3-buten-1-ol, 1-pentanol, (Z)-2-penten-1-ol, alkanes C5-C12 came from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Carboxen (CAR)/polydimethylsiloxane (PDMS) StableFlex SPME fibre (75 µm) came from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Before first use, each SPME fibre was conditioned as recommended by the manufacturer. NaCl came from Oxoid Ltd (Basingstoke, UK) and Milli-Q water (high-performance liquid chromatography water) from Fisher Scientific Labosi (Elancourt, France).

Sample preparation

European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) were obtained as whole fish from Aquanord (Gravelines, France). Cod (*Gadus morhua*) and salmon (*Salmo salar*) were obtained as fillets from Viviers Marins (Boulogne-sur-Mer, France). The different analyses of the flesh from these samples were performed immediately, then these products were stored in a vacuum at -20°C for 90 days. The day before analysis, samples were removed from the freezer and thawed overnight in a refrigerator at 4°C. On the day of analysis, the whole fish were filleted under sterile conditions. For the four species studied, some of the flesh was used for microbiological analyses and total volatile basic nitrogen/trimethylamine

(TVBN/TMA) analyses, then the remainder was prepared in the same way as with previous studies¹⁸ for the analysis of volatile compounds by SPME-GC-MS.

Enumeration of total aerobic flora, *Pseudomonas spp* and *Shewanella putrefaciens*

Total aerobic flora was enumerated after incubation for 72 hours at 30°C on Plate Count Agar (Oxoid) pH 7.0 ± 0.2, which is recommended for the enumeration of aerobic mesophilic flora¹⁹. We used a 25 g sample diluted tenfold in buffered peptone water (Biomérieux, France).

Pseudomonas spp was enumerated by the traditional plate counting method after incubation for 44 hours at 25°C on cephalothin - sodium fusidate - cetrinide (CFC) agar and having a positive reaction to oxidase²⁰.

Shewanella putrefaciens forming black colonies was enumerated by the traditional plate counting method after incubation for 48 hours at 25°C on Plate Count Agar – Hydrogen Sulfide (PCA-H₂S).

For each analyses, the value is an average from three samples.

Total Volatile Basic Nitrogen (TVBN) – Trimethylamine (TMA) assay by steam distillation

A mixture of 200 ml of a 7.5% aqueous trichloroacetic acid solution and 100 g of fish muscle was homogenised, centrifuged at 400 g for 5 min and filtered through filter paper. Steam distillation was performed using a Kjeldahl-type distillation unit (Buchi, 320). Filtrate (25 ml) was loaded into the distillation tube followed by 6 ml of 10% NaOH. 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. Distillation was started and steam distillation continued until a final volume of 50 ml was obtained in the beaker (40 ml of distillate). The boric acid solution turned green when alkalinised by the distilled TVBN which was titrated with aqueous 0.1 N sulphuric acid solution. Complete neutralisation was obtained when the solution turned pink on the addition of a further drop of sulphuric acid. If n is the number of millilitres of sulphuric acid added, the TVBN content is $n \times 16.8$ mg of nitrogen per 100 g of fish. The value is an average from three samples.

For TMA, sample preparation and operating conditions were the same as those used for TVBN. Only 20 ml of formaldehyde was added to filtrate (25 ml), and loaded into the distillation tube followed by 6 ml of 10% NaOH.

SPME procedure

In accordance with previous studies¹⁸, 11 mL of the aqueous phase from the supernatant of sample preparation was introduced into a hermetically sealed 20 mL vial. The vial was placed in the sample tray of a CombiPAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) and then transferred to the mixer, where it was heated to 50°C and mixed at 500 rpm for 10 min. After this equilibrium time the CAR/PDMS SPME fibre was inserted into the headspace of the sample and held there for 40 min at 50°C. The fibre was then removed from the headspace and inserted into the Merlin Microseal injector (250°C) of a gas

chromatograph (GC) equipped with an MS-QP2010+ mass spectrometer (MS) (Shimadzu, Kyoto, Japan) for desorption. For each day, six replicated measurements were performed.

Gas chromatography-Mass spectrometry procedure

The GC was equipped with an SLB-5ms capillary column (60m × 0.25mm × 0.25µm) (Supelco, Sigma Aldrich, France). The GC conditions were as follows: oven temperature set initially to 35°C (5 min hold), increased to 100°C at 10°C min⁻¹ then increased to 280°C at 20°C min⁻¹ and maintained at 280°C for 5 min; the splitless mode was used for injection, with a purge time of 2 min. The fibre was maintained in the injection port for 1 min. The electron impact MS conditions were as follows: temperature of interface, 280°C; ionisation voltage, 70 eV; mass range, m/z 33-200. After each injection the fibre was heated to 300°C for 10 min in the SPME fibre conditioner. Volatile compounds were identified using mass spectral databases (National Institute of Standards and Technology (NIST) 2008), relative retention indices²¹, Linear Retention Index (LRI) and chemical standards. The peak area of the tentatively identified compounds was integrated from the specific ion for each of the molecules to avoid co-elution problems.

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed to propose a grouping of the analysed fish samples and identify the volatile compounds that characterise their categories. To do this, we used SPAD 7 software (SPAD, Paris, France) to select a set of relevant volatile compounds via the first two trends in a principal component analysis (PCA). We then performed an ascending hierarchical classification (AHC) of the first two factors. The categories were then analysed in relation to the selected volatile compounds. The statistical analysis was performed in the same way as for the work by Duflos *et al.*, 2010¹⁸.

RESULTS AND DISCUSSION

Total Volatile Basic Nitrogen (TVBN) + Trimethylamine (TMA) + microbiological analyses

All the results listed in Table 1 for these four species show, using total flora, spoilage flora and TVBN-TMA, that all the fresh products (D0) were of good quality and the frozen products were frozen-thawed under good conditions. This is supported by the fact that there was no significant increase in total flora, alteration flora and TVBN-TMA between the products frozen-thawed at D30 and D90 and the fresh products. A fish is considered as acceptable if it has a value <25 for TVBN^{22, 23}, and considered as satisfactory with a value <50000 CFU/g for total flora²⁴. All the samples tested were therefore of good quality. This ensures that any observations reflected the freezing and not a change in quality.

Table 1: Microbiological and TVBN-TMA analyses

Species studied	Days storage at -20°C	No.	Microbiological analyses									TVBN-TMA analyses			
			Total flora			<i>Pseudomonas</i> spp			<i>Shewanella putrefaciens</i>			TVBN		TMA	
			(CFU/g)	(log)	(mean)	(CFU/g)	(log)	(mean)	(CFU/g)	(log)	(mean)	Values	(mean)	Values	(mean)
SEA BASS	0	1	100	2.000	2.201	100	2.000	2.000	100	2.000	2.000	23	22.000	0	0.000
		2	100	2.000		100	2.000		100	2.000		20		0	
		3	400	2.602		100	2.000		100	2.000		23		0	
	30	1	100	2.000	2.000	100	2.000	2.000	100	2.000	2.000	24	21.333	0	0.000
		2	100	2.000		100	2.000		100	2.000		20		0	
		3	100	2.000		100	2.000		100	2.000		20		0	
	90	1	1200	3.079	2.923	600	2.778	2.519	100	2.000	2.000	21	23.333	0	0.000
		2	700	2.845		600	2.778		100	2.000		25		0	
		3	700	2.845		100	2.000		100	2.000		24		0	
SEABREAM	0	1	400	2.602	2.401	100	2.000	2.000	100	2.000	2.000	19	18.667	0	0.000
		2	400	2.602		100	2.000		100	2.000		19		0	
		3	100	2.000		100	2.000		100	2.000		18		0	
	30	1	100	2.000	2.100	100	2.000	2.000	100	2.000	2.000	19	19.000	0	0.000
		2	200	2.301		100	2.000		100	2.000		19		0	
		3	100	2.000		100	2.000		100	2.000		19		0	
	90	1	100	2.000	2.201	100	2.000	2.000	100	2.000	2.000	19	19.000	0	0.000
		2	100	2.000		100	2.000		100	2.000		19		0	
		3	400	2.602		100	2.000		100	2.000		19		0	
COD	0	1	32000	4.505	4.466	5000	3.699	3.593	1000	3.000	2.867	16	16.867	3	3.867
		2	41000	4.613		12000	4.079		400	2.602		17		5	
		3	19000	4.279		1000	3.000		1000	3.000		18		3	
	30	1	91000	4.959	4.685	12000	4.079	3.939	100	2.000	2.000	17	18.667	2	2.000
		2	29000	4.462		6200	3.792		100	2.000		19		1	
		3	43000	4.633		8800	3.944		100	2.000		20		3	
	90	1	27000	4.431	4.572	4000	3.602	3.668	100	2.000	2.000	21	20.333	7	4.000
		2	28000	4.447		4500	3.653		100	2.000		19		3	
		3	69000	4.839		5600	3.748		100	2.000		21		2	
SALMON	0	1	16000	4.204	3.984	3700	3.568	3.576	200	2.301	2.301	17	16.667	0	0.000
		2	7000	3.845		3200	3.505		100	2.000		16		0	
		3	8000	3.903		4500	3.653		400	2.602		17		0	
	30	1	600	2.778	3.001	400	2.602	2.800	100	2.000	2.000	18	18.000	2	1.667
		2	1400	3.146		900	2.954		100	2.000		17		1	
		3	1200	3.079		700	2.845		100	2.000		19		2	
	90	1	5600	3.748	3.755	400	2.602	2.602	100	2.000	2.000	19	17.667	1	0.333
		2	6100	3.785		400	2.602		100	2.000		17		0	
		3	5400	3.732		400	2.602		100	2.000		17		0	

Identification of volatiles in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*), cod (*Gadus morhua*) and salmon (*Salmo salar*).

The analysis by SPME-GC-MS of the salmon and cod fillets and of the flesh of the whole fish (sea bass and gilthead seabream), at different stages of freezing/thawing (D0 = fresh; D30 = products frozen for 1 month; D90 = products frozen for 3 months), identified 101 volatile compounds classified by their chemical functions (Table 2). These compounds were aldehydes (23), alcohols (12), ketones (17), esters (4), furans (6), alkanes (9), terpenes (2), benzenes (10), chlorines (2), sulfurs (3) and 13 unclassified compounds that are all found in the four species studied at different stages of analysis.

Most volatile compounds in fish are generated by enzyme reactions, oxidation processes and microbial action²⁵. According to earlier results, the action of microorganisms is negligible at negative temperatures (-20°C), so we did not expect the volatile compounds formed by this activity to be found in our study. However, freezing cannot prevent the oxidation of lipids¹² and thus leads to the formation of volatiles resulting from the degradation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs).

It is important to note that there are no volatile compounds in a frozen-thawed fish that were not already present in the fresh fish. Only an observed difference in quantity between the compounds during storage will differentiate fresh fish from frozen-thawed fish. This differentiation is mainly correlated to the oxidation of lipids¹².

Table 2: Volatile compounds identified by SPME-GC-MS in gilthead seabream, European sea bass, cod and salmon fish samples

Compounds	Name ^a	LRI ^b	Specific ion ^c	Identification ^d
Alcohols				
Ethanol	d	<500	45	MS, LRI, Std
2-methyl-1-propanol	u	629	74	MS, LRI, Std
1-butanol	db	664	56	MS, LRI, Std
1-penten-3-ol	aa	682	57	MS, LRI, Std
3-methyl-3-buten-1-ol	ah	728	56	MS, LRI, Std
3-methyl-1-butanol	ai	734	70	MS, LRI, Std
1-pentanol	an	763	70	MS, LRI, Std
(Z)-2-penten-1-ol	ao	765	68	MS, LRI, Std
1-hexanol	av	869	56	MS, LRI, Std
1-heptanol	bm	972	70	MS, LRI, Std
1-octen-3-ol	bo	981	85	MS, LRI, Std
2-ethyl-1-hexanol	bv	1031	57	MS, LRI, Std
Aldehydes				
Acetaldehyde	c	<500	43	MS, LRI
Propanal	f	<500	58	MS, LRI, Std
2-methyl-propanal	m	554	41	MS, LRI, Std
Butanal	o	596	44	MS, LRI, Std

2-butanal	v	649	70	MS, LRI, Std
3-methylbutanal	w	653	58	MS, LRI, Std
2-methylbutanal	y	663	57	MS, LRI, Std
Pentanal	ad	696	58	MS, LRI, Std
(E)-2-pentenal	al	750	83	MS, LRI
Hexanal	ar	789	44	MS, LRI, Std
(E)-2-Hexenal	at	851	83	MS, LRI
(Z)-4-heptenal	bc	898	84	MS, LRI
Heptanal	bd	900	70	MS, LRI, Std
2,4-hexadienal	be	910	81	MS, LRI
(E)-2-heptenal	bk	961	41	MS, LRI, Std
Benzaldehyde	bl	969	106	MS, LRI, Std
2,4-heptadienal	br	1000	81	MS, LRI
Octanal	bs	1002	84	MS, LRI, Std
(E,E)-2,4-heptadienal	bu	1015	81	MS, LRI
(E)-2-octenal	dc	1062	70	MS, LRI
(E)-2-nonanal	dd	1165	57	MS, LRI
Nonanal	ck	1108	82	MS, LRI, Std
Decanal	cv	1210	82	MS, LRI, Std

Ketones

2,3-butanedione	n	589	86	MS, LRI, Std
2-butanone	p	600	57	MS, LRI
2-pentanone	ab	684	43	MS, LRI
3-pentanone	ac	694	100	MS, LRI, Std
2,3-hexanedione	ap	776	71	MS, LRI, Std
2-hexanone	aq	780	43	MS, LRI
3-heptanone	ay	884	57	MS, LRI
2-heptanone	az	888	58	MS, LRI
6-methyl-2-heptanone	bj	956	43	MS, LRI
2,3-octanedione	bp	983	43	MS, LRI
2-ethylcyclohexanone	by	1050	83	MS, LRI, Std
(E,E)-3,5-octadien-2-one	cc	1075	95	MS, LRI
Acetophenone	cd	1078	105	MS, LRI
3-nonanone	cf	1088	113	MS, LRI
2-nonanone	cg	1093	58	MS, LRI
3,5-octadien-2-one	ci	1099	95	MS, LRI
2-hydroxyacetophenone	cs	1180	121	MS, LRI

Esters

acetic-acid, methyl-ester	i	523	43	MS, LRI
ethyl acetate	s	613	70	MS, LRI, Std
butanoic acid, methyl ester	ag	724	74	MS, LRI
octanoic acid, ethyl ester	ct	1194	83	MS, LRI

Furans

3-methyl-furan	q	603	82	MS, LRI
2-methyl-furan	r	611	82	MS, LRI, Std
2-ethyl-furan	ae	697	81	MS, LRI, Std
2-pentyl-furan	bq	991	81	MS, LRI
Benzofuran	bt	1005	118	MS, LRI
2,3-dihydro-benzofuran	cp	1161	120	MS, LRI

Alkanes

2-methyl-butane	e	<500	42	MS, LRI
Pentane	g	500	43	MS, LRI, Std
Hexane	cw	600	57	MS, LRI, Std
Heptane	cx	700	43	MS, LRI, Std
Octane	cy	800	43	MS, LRI, Std
Nonane	cz	900	43	MS, LRI, Std
Decane	da	1000	57	MS, LRI, Std
Undecane	cj	1100	71	MS, LRI, Std
Dodecane	cu	1200	57	MS, LRI, Std

Terpenes

alpha-pinene	bg	940	93	MS, LRI
Limonene	bw	1037	68	MS, LRI

Benzene compounds

Benzene	x	656	78	MS, LRI, Std
Toluene	am	760	91	MS, LRI
Ethylbenzene	au	860	91	MS, LRI
m-xylene	aw	869	91	MS, LRI
Styrene	ba	892	104	MS, LRI
1-chloro-2-ethyl-benzene	bx	1046	125	MS, LRI
Benzeneacetaldehyde	bz	1054	91	MS, LRI, Std
1-chloro-3-ethyl-benzene	cb	1066	125	MS, LRI
1,2,4,5-tetramethyl-benzene	cm	1134	119	MS, LRI
2,4-dimethyl-benzaldehyde	cr	1174	83	MS, LRI

Chlorine compounds

methylene chloride	j	528	84	MS, LRI
Chloroform	t	622	83	MS, LRI, Std

Sulfur compounds

carbonyl sulfide	b	<500	60	MS, LRI
dimethyl sulfide	h	516	62	MS, LRI, Std
carbon disulfide	k	533	76	MS, LRI, Std

Unclassified compounds

Unidentified	af	698	59	MS, LRI
Unidentified	aj	740	45	MS, LRI
Unidentified	ak	748	70	MS, LRI
Unidentified	ax	875	45	MS, LRI
methane, tribromo	bb	894	173	MS, LRI, Std
Butyrolactone	bf	914	42	MS, LRI, Std
Unidentified	bh	942	193	MS, LRI
Unidentified	bi	953	55	MS, LRI
Unidentified	bn	974	281	MS, LRI
Unidentified	ca	1058	57	MS, LRI
2-methoxy-phenol	ch	1095	81	MS, LRI
2-ethyl-phenol	cn	1144	107	MS, LRI, Std
Unidentified	co	1148	70	MS, LRI

^a Coding compounds for statistical analysis

^b Linear retention index on a SLB-5ms capillary column.

^c MS mass fragment which area integrated

^d Identification: MS by comparison with NIST mass spectrum, LRI by linear retention index and Std by injection of pure standards.

Classification, description and interpretation of fish using PCA and AHC

The results from the sea bass and gilthead seabream (whole fish) were analysed separately from the salmon and cod (fillets) to verify whether there was any difference between fillets and whole fish products during storage. Statistical analysis was performed with the same logical approach as in the work by Duflos *et al.*, 2010¹⁸. The principal component analysis (PCA) selected the first two factors, and was followed by an ascending hierarchical classification (AHC) and a description of the classes by selecting the main volatile compounds representing 80% of the first two axes. This demonstrated a significant difference between fresh products and those that were frozen-thawed (Figures 1a and 1b).

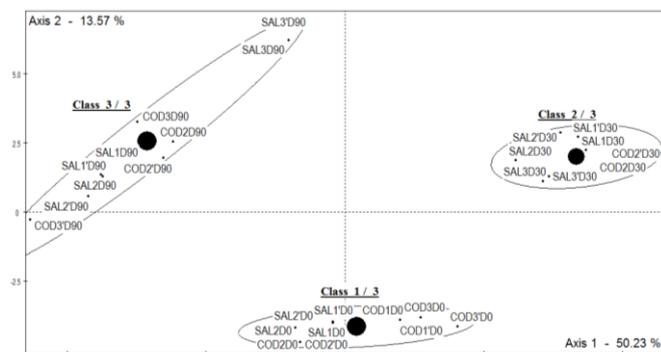


Figure 1a: PCA and AHC for salmon (SAL) and cod (COD)

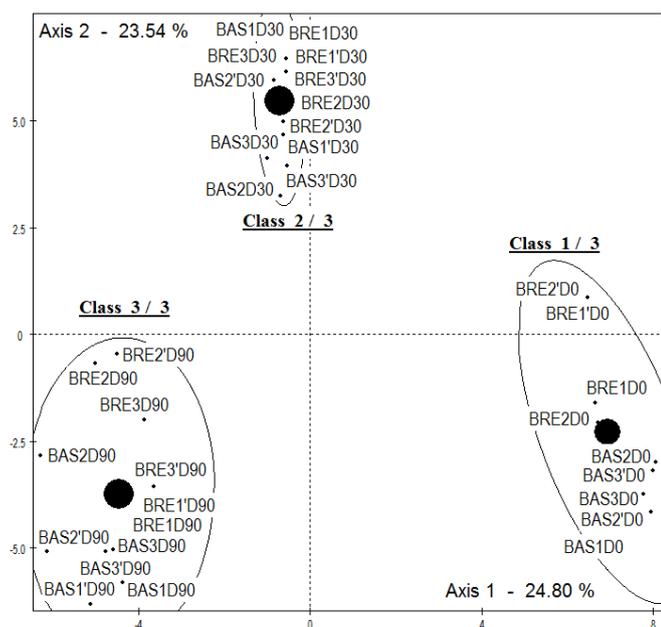


Figure 1b: PCA and AHC for sea bass (BAS) and gilthead seabream (BRE)

The creation of classes enabled us to identify the volatile compounds that were most representative of a fresh product and a frozen-thawed one (Tables 3a and 3b). Figures 1a and 1b show, either for sea bass and gilthead seabream, or for salmon and cod, the formation of three classes corresponding to fresh fish (class 1/3), fish frozen for 1 month (class 2/3) and fish frozen for 3 months (class 3/3).

For sea bass and gilthead seabream, class 1/3, corresponding to fresh fish, was characterised by ae, x, an, av, ao, ci, r, cu, ag, cd, ct, cv, u, cq and co, which had a significant and strong presence and bp, bd, aq, bs, br, cc, ck, s, h, t, cg, au, y, w, by, bz, cr and cf, which were significantly absent. Class 2/3, which contained fish frozen for 30 days, was characterised by the significant presence of bp, aq, ap, bc, br, t, cc, aw, au, bz, by and cf and the absence of f, k, g, v, i, m, d, n, s, cd, cu, ct, cv, j, cq, co, cr and e. Class 3/3, which contained fish frozen for 90 days, was characterised by the significant presence of the following compounds: f, k, g, bd, d, v, i, m, bs, s, h, ck, n, y, w, cg, j, bw, cr, e and ai together with the absence of the compounds ae, x, an, aq, ci, ao, cc, bo, r, aw, t, bv, cu, av, ct, cv, co, u and cf. By selecting only the volatile compounds that represented one class and that were not found in the other classes, we were able to differentiate between fresh and frozen-thawed products and to regard these substances as potential differentiation markers between fresh fish and frozen-thawed fish. For sea bass and gilthead seabream, ethanol (d), dimethyl-sulfide (h), methyl acetate (i), 2-methyl-propanal (m), 2,3-butanedione (n), butanal (o), ethyl acetate (s), 3-methyl-butanol (w), 2-methyl-butanol (y), 1-penten-3-ol (aa), 2-pentanone (ab), 1-octen-3-ol (ao), heptanal (bd), octanal (bs), limonene (bw), 2-nonanone (cg), nonanal (ck), 2,3-dihydro-benzofuran (cp), 2-hydroxy-acetophenone (cs), octanoic-acid-ethyl-ester (ct) and decanal (cv) are therefore potential differentiation markers between fresh sea bass and gilthead seabream and their frozen-thawed equivalents.

Similarly, for cod and salmon, ethanol (d), dimethyl-sulfide (h), 2-methyl-propanal (m), butanal (o), 2-butanone (p), ethyl

acetate (s), chloroform (t), 3-methyl-butanol (w), 2-methyl-butanol (y), 1-penten-3-ol (aa), 2-pentanone (ab), 3-methyl-1-butanol (ai), 1-octen-3-ol (ao), benzofuran (bt), 2,3-dihydro-benzofuran (cp), 2-hydroxy-acetophenone (cs), octanoic-acid-ethyl-ester (ct) and decanal (cv) can be considered as potential differentiation markers between a fresh and a frozen-thawed product.

Table 3a: Characterisation of categories by volatile compounds after PCA and AHC

Category	Distance to the centre of the category	Name*	Highly significant average presence	Highly significant average absence
1/3	0.75963	SAL1'D0	cs, cp, cv, bt	aa, ab, o, p, an, bm, av, s, t, ak, y, w ai
	0.76946	SAL1D0		
	2.51692	COD1D0		
	3.41491	COD2'D0		
	4.50916	COD2D0		
	4.89730	SAL2D0		
	5.41782	COD3D0		
	5.56782	SAL2'D0		
	5.93818	COD1'D0		
13.14680	COD3'D0			
2/3	0.17181	SAL1D30	ae, bp, bd, ac, ad, ab, bs, al, bu, bm, bl, o, ck, bc, br, ci, cc, bo, v, an, cs, av, at, bq, ao, q, bj, bk, bi, cb, az, ap, be, cj, ak, cd, ay, ct, cr, by, cm, bx, cf	u
	0.49893	SAL1'D30		
	1.08696	SAL2'D30		
	1.47907	SAL3'D30		
	2.25795	SAL3D30		
	2.41916	COD2D30		
	4.80547	SAL2D30		
8.91879	COD2'D30			

3/3	0.61420	COD3D90	ab, p, s, w, y, t, u ai, d, m	ae, bp, bd, al, bl, bs, v, bm, bu, bc, ao, q, bo, br, cs, at, ck, av, ci, bk, cc, bj, cb, cj, az, bi, bq, cd, ay, be, bz, by, cu, ct, bt, cm, bx, cr, cv, cf, cp
	0.69514	COD2'D90		
	0.87924	COD2D90		
	3.23797	SAL1D90		
	4.18102	SAL2D90		
	4.26779	SAL1'D90		
	8.52743	SAL2'D90		
	25.98120	COD3'D90		
	39.52700	SAL3D90		
	44.54930	SAL3'D90		

* SAL and COD = salmon and cod / x and x' = replicated measurements / Dx = number days of freezing

Table 3b: Characterisation of categories by volatile compounds after PCA and AHC

Category	Distance to the centre of the category	Name*	Highly significant average presence	Highly significant average absence
1/3	0.09786	BRE2D0	ae, x, an, av, ao, ci, r, cu, ag, cd, ct, cv, u, cq, co	bp, bd, aq, bs, br, cc, ck, s, h, t, cg, au, y, w, by, bz, cr, cf
	0.54256	BRE1D0		
	1.73729	BAS2D0		
	1.92866	BAS3'D0		
	2.81173	BAS3D0		
	4.52450	BAS2'D0		
	7.79749	BAS1D0		
	10.09180	BRE1'D0		
	16.56140	BRE2'D0		
2/3	0.08860	BRE2D30	bp, aq, ap, bc, br, t, cc, aw, au, bz, by, cf	f, k, g, v, i, m, d, n, s, cd, cu, ct, cv, j, cq, co, cr, e

	0.23263	BRE2'D30		
	0.26819	BAS2'D30		
	0.50317	BRE3'D30		
	0.63827	BAS1'D30		
	1.02738	BRE1'D30		
	1.18916	BRE3D30		
	1.86569	BAS3D30		
	2.17915	BRE1D30		
	2.31612	BAS3'D30		
3/3	0.70702	BRE3'D90	f, k, g , bd, d, v, i, m, bs, s, h, ck, n, y, w, cg, j, bw, cr, e, ai	ae, x, an, aq, ci, ao, cc, bo, r, aw, t, bv, cu, av, ct, cv, co, u, cf
	1.72485	BAS3D90		
	1.88185	BAS3'D90		
	1.93611	BRE1D90		
	3.38489	BRE3D90		
	4.17953	BAS2D90		
	4.31463	BAS1D90		
	4.51997	BAS2'D90		
	5.13858	BRE1'D90		
	7.11310	BAS1'D90		

* BRE and BAS = seabream and sea bass / x and x' = replicated measurements / Dx = number days of freezing

Evolution of volatiles during frozen storage

According to the statistical analyses, the compounds selected as potential differentiation markers between fresh and frozen-thawed products did not evolve in quantity in the same way for all species. By selecting only the markers that were common to the four species studied and which increased in the same way in terms of quantity, we found that only the dimethyl-sulfide (h), ethyl acetate (s), 3-methyl-butanol (w) and 2-methyl-butanol (y) appeared as good differentiation markers. The evolution of these four compounds over time is shown in Figures 2a, 2b, 2c, 2d. We found that caution is needed when comparing fresh and frozen products because even if the changes are significant, the starting point may differ depending on product quality. We noted nevertheless a clear species-by-species differentiation between fresh and frozen-thawed products using these four volatile compounds.

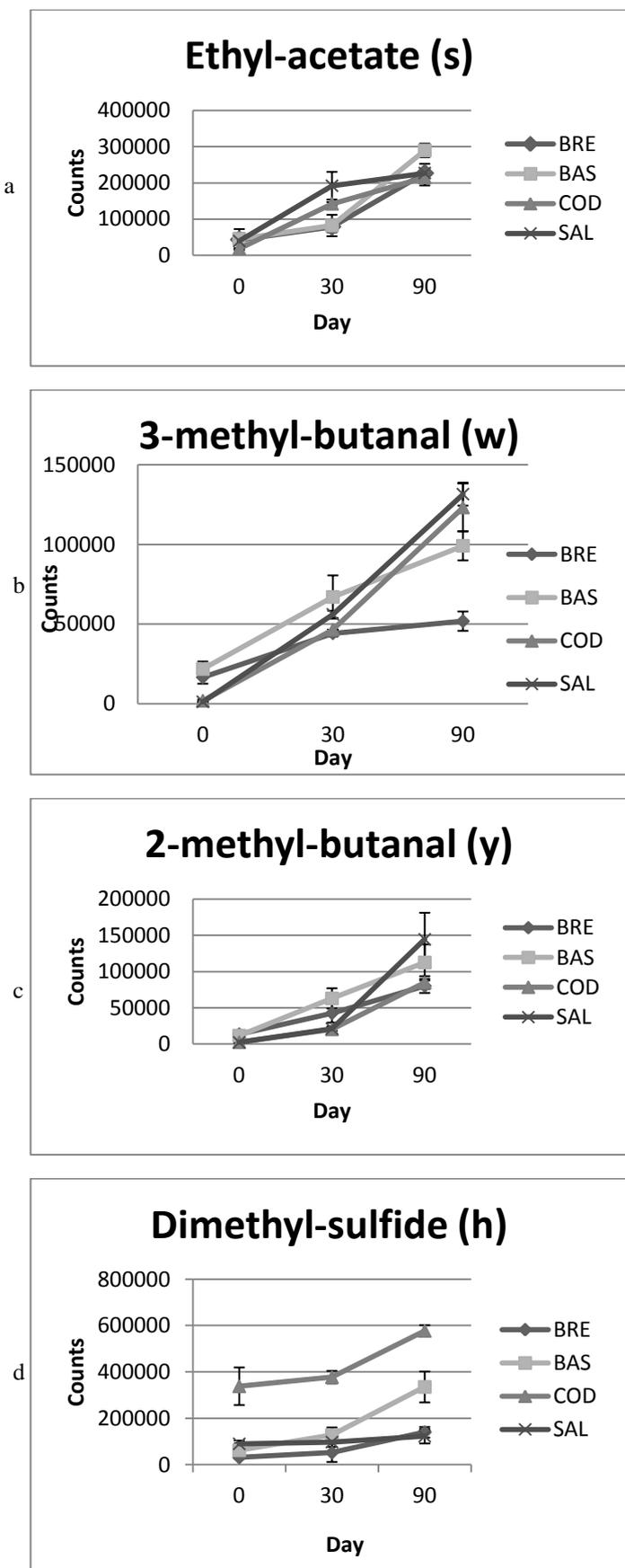


Figure 2: Evolution of potential differentiation markers between fresh fish and frozen-thawed fish stored for 90 days for sea bass, gilthead seabream, salmon and cod.

CONCLUSIONS

SPME-GC-MS proved to be a useful tool for evaluating the effect of freezing on the volatile compounds of different fish: cod, salmon, European sea bass and gilthead seabream. Comparison of changes in volatile profiles during a short freezing period identified the volatile compounds dimethyl-sulfide, 3-methyl-butanal, ethyl acetate and 2-methyl-butanal, which can be used as differentiation indicators between samples, whole or filleted, of fresh and frozen-thawed fish.

Abbreviations and nomenclature

SPME-GC-MS: Solid Phase MicroExtraction - Gas Chromatography - Mass Spectrometry

TVBN: Total Volatile Basic Nitrogen

TMA: TriMethylAmine

PCA: Principal Component Analysis

HAC: Ascending Hierarchical Classification

Acknowledgements

We would like to thank the Nord-Pas de Calais region (France) and France Agrimer for their financial assistance.

REFERENCES

- Bennett R and Hamilton M, Consumer acceptability of cod and whiting after chilled storage and freezing and thawing. *International Journal of Food Science & Technology* **21**:311-317 (1986).
- Duflos G, Fur BL, Mulak V, Becel P and Malle P, Comparison of methods of differentiating between fresh and frozen-thawed fish or fillets. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**:1341-1345 (2002).
- Rehbein H, Physical and biochemical methods for the differentiation between fresh and frozen thawed fish or fillets. *Italian Journal of Food Science* **2**:75-86 (1992).
- Kitamikado N, Yuan C-S and Ueno R, An Enzymatic Method Designed to Differentiate between Fresh and Frozen-thawed Fish, Ed. Blackwell Publishing Ltd, pp 74-76 (1990).
- Zhang L, Shen H and Luo Y, Study on the electric conduction properties of fresh and frozen-thawed grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Food Science and Technology* **45**:2560-2564 (2010).
- Szymczak M, Comparison of physicochemical and sensory changes in fresh and frozen herring (*Clupea harengus* L.) during marinating. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**:68-74 (2011).
- Karoui R, Thomas E and Dufour E, Utilisation of a rapid technique based on front-face fluorescence spectroscopy for differentiating between fresh and frozen-thawed fish fillets. *Food Research International* **39**:349-355 (2006).
- Uddin M and Okazaki E, Classification of Fresh and Frozen-thawed Fish by Near-infrared Spectroscopy, Ed. Blackwell Publishing Ltd, pp C665-C668 (2004).
- Sivertsen AH, Kimiya T and Heia K, Automatic freshness assessment of cod (*Gadus morhua*) fillets by Vis/Nir spectroscopy. *Journal of Food Engineering* **103**:317-323 (2011).

10. Fasolato L, Manfrin A, Corrain C, Perezani A, Arcangeli G, Rosteghin M, Novelli E, Lopparelli RM, Balzan S, Mirisola M, Serva L, Segato S and Bianchi E, Assessment of quality-parameters and authentication in sole (*Solea vulgaris*) by NIRS (Near Infrared Reflectance Spectroscopy). *Industria Alimentari* **47**:355-361 (2008).
11. Yoshioka K and Kitamikado M, Differentiation of freeze-thawed fish from fresh fish by examination of medulla of crystalline lens. *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries* **49**:151-154 (1983).
12. Iglesias J, Medina I, Bianchi F, Careri M, Mangia A and Musci M, Study of the volatile compounds useful for the characterisation of fresh and frozen-thawed cultured gilthead sea bream fish by solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry* **115**:1473-1478 (2009).
13. Bene A, Hayman A, Reynard E, Luisier J and Villettaz J, A New Method for the Rapid Determination of Volatile Substances: the SPME-direct Method part II: Determination of the Freshness of Fish. *Sensors and Actuators B* **72**:204-207 (2001).
14. Ruiz-Capillas C, Gillyon CM and Horner WFA, Determination of different volatile base components as quality control indices in fish by official methods and flow injection analysis. *Journal of Food Biochemistry* **25**:541-553 (2001).
15. Baixas-Nogueras S, Bover-Cid S, Veciana-Nogués MT and Vidal-Carou MC, Effects of previous frozen storage on chemical, microbiological and sensory changes during chilled storage of Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) after thawing. *European Food Research and Technology* **226**:287-293 (2007).
16. Bianchi F, Cantoni C, Careri M, Chiesa L, Musci M and Pinna A, Characterization of the aromatic profile for the authentication and differentiation of typical Italian dry-sausages. *Talanta* **72**:1552-1563 (2007).
17. Alasalvar C, Anthony Taylor KD and Shahidi F, Comparison of volatiles of cultured and wild sea bream (*Sparus aurata*) during storage in ice by dynamic headspace analysis/gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* **53**:2616 - 2622 (2005).
18. Duflos G, Leduc F, N'Guessan A, Krzewinski F, Kol O and Malle P, Freshness characterisation of whiting (*Merlangius merlangus*) using an SPME/GC/MS method and a statistical multivariate approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**:2568-2575 (2010).
19. French standard v08-51. (December 1992).
20. International Standard ISO 13720:2010.
21. Kondjoyan N and Berdagué JL, A compilation of relative retention indices for analysis of aromatic compounds. by Laboratoire Flaveur Ed I, Clermont-Ferrand (1996).
22. Malle P, Vanelle AM and Petit A, Teneur en azote basique volatil total du tissu musculaire des poissons marins. *Recueil de Médecine Vétérinaire* **165**:395-402 (1989).
23. Malle P and Poumeyrol M, A new chemical criterion for the quality control of fish: Trimethylamine/Total Volatile Basic Nitrogen (%). *Journal of Food Protection* **52**:419-423 (1989).
24. Arrêté du 21 décembre 1979 relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire certaines denrées animales ou d'origine animale.
25. Olafsdottir G and Fleurence J, Evaluation of fish freshness using volatile compounds-classification of volatile compounds in fish, in *Methods to determine the freshness of fish in research and industry, proceedings of the final meeting of the concerted action "Evaluation of fish freshness"* AIR3CT94 2283, Ed, Nantes (France), pp 51-69 (1997).

Les résultats de cette étude montrent que notre méthode HS-SPME-GC-MS qui caractérise les composés volatils du poisson est une méthode potentielle pour différencier un poisson cru frais d'un poisson cru ayant subi des étapes de congélation / décongélation.

L'éthyl-acétate, le 3-méthyl-butanal, le diméthyl-sulfide et le 2-méthyl-butanal semblent être de bons marqueurs de congélation pour des poissons ayant une congélation supérieure à 1 mois. Ces 4 composés volatils qui sont des marqueurs d'altération du poisson ont une quantité supérieure dans des produits ayant subi une congélation / décongélation que dans des poissons très altérés.

Des analyses complémentaires de quantification de ces 4 composés sont nécessaires pour valider cette méthode de différenciation entre un produit cru frais et un poisson congelé / décongelé. Nous pouvons donner l'exemple des filets de cabillaud qui font l'objet de pratiques frauduleuses car ces produits qui sont vendus le plus souvent à l'état frais peuvent avoir subi une congélation décongélation.

Synthèse article 5 : L'objectif d'IFREMER est de pouvoir proposer des flores qui permettent de préserver la qualité des produits de la mer. Cette flore bioprotectrice doit faire diminuer la quantité de la flore d'altération naturellement présente sans perturber les qualités sensorielles des produits.

L'objectif de ces travaux est d'étudier les interactions possibles entre la souche bioprotectrice *L. piscium* CNCM I-4031 et *B. thermosphacta* l'une des bactéries altérantes majeures de la crevette cuite.

Dans cette étude, l'application de notre méthode HS-SPME-GC-MS a permis de différencier à l'aide des composés volatils des produits inoculés dans plusieurs conditions et de mettre en évidence des différences significatives lors de la bioconservation des crevettes cuites tropicales par l'inoculation de *L. piscium*.

Dans cet article, *L. piscium* a confirmé son pouvoir inhibiteur envers *B. thermosphacta* en l'inhibant de 4 log UFC/g, l'inhibition étant maintenue pendant 31 jours de stockage. Les résultats issus de l'analyse sensorielle confirment le caractère altérant de *B. thermosphacta*, qui arrive à altérer le produit après 11 jours d'incubation à 8°C avec une émission de forte odeur de beurre caramel pouvant être liée à la production des molécules suivantes : 2,3 butanedione, cyclopentanol, 3-méthylbutanol, 3-méthylbutanal, 2-méthylbutanal, 4-méthyl-3chloro-3-pentanol, et éthanol. Ce caractère altérant est noté lorsque la population de *B. thermosphacta* atteint 8 Log UFC/ml. Ces composés volatils sont donc des marqueurs potentiels d'altération de la crevette.

Par ailleurs, lorsque *B. thermosphacta* est co-inoculée avec *L. piscium*, elle n'atteint pas un niveau de population lui permettant d'altérer le produit, il en résulte une amélioration de la qualité organoleptique des crevettes, une inhibition de la production des composés d'altération (cyclopentanol, 3-méthylbutanol, 4-méthyl-3-chloro-3-pentanol et 3-méthylbutanal mis en évidence par HS-SPME-GC-MS) et une extension de leur durée de conservation. Quand au lot inoculé avec *L. piscium* en culture pure (témoin), il a été déclaré non altéré par le jury durant les 31 jours d'incubation. La bioconservation est donc un moyen efficace de conservation des crevettes cuites tropicales et notre méthode HS-SPME-GC-MS est une bonne technique descriptive de différenciation de produits de la pêche.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

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

Sensory and physicochemical evolution of tropical cooked peeled shrimp inoculated by *Brochothrix thermosphacta* and *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 during storage at 8 °C

Papa Abdoulaye Fall ^{a,b,c}, Marie France Pilet ^{b,c}, François Leduc ^d, Mireille Cardinal ^a, Guillaume Duflos ^d, Camille Guérin ^a, Jean-Jacques Joffraud ^a, Françoise Leroi ^{a,*}

^a Ifremer, Laboratoire de Science et Technologie de la Biomasse Marine, F-44311 Nantes, France

^b LUNAM Université, Oniris, UMR 1014 Secalim, Nantes, F-44307, France

^c INRA, Nantes, F-44307, France

^d Anses, Laboratoire des produits de la pêche, Boulogne/mer, F-62200, France

ARTICLE INFO

Available online xxx

Keywords:

Biopreservation
Sensory quality
Volatile compounds
Biogenic amines
Amino-acid
TTGE

ABSTRACT

This study investigated the sensory quality and physicochemical evolution (pH, glucose, L-lactic acid, biogenic amine, free amino-acids and volatile compounds) during storage at 8 °C of cooked peeled shrimp inoculated with the specific spoilage bacteria *Brochothrix thermosphacta* alone or mixed with the protective strain *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. Growth of both bacteria was monitored at regular intervals during storage by microbial counts and the thermal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) technique. Bacterial counts showed that *L. piscium* and *B. thermosphacta* inoculated at 7 log CFU/g and 3 log CFU/g were well adapted to shrimp, reaching a maximum level of 9 log CFU/g after 4 days and 10 days respectively. In mixed culture, the growth of *B. thermosphacta* was reduced by 3.2 ± 0.1 log CFU/g. The TTGE technique allowed monitoring the colonisation of the strains on the shrimp matrix and confirming the dominance of *L. piscium* in mixed culture throughout the experiment. Sensory analysis confirmed that *B. thermosphacta* spoiled the product after 11 days, when its cell number attained 8 log CFU/g with the emission of strong butter/caramel off-odours. This sensory profile could be linked to the production of 2,3 butanedione, cyclopentanol, 3-methylbutanol, 3-methylbutanal, 2-methylbutanal, 4-methyl-3-chloro-3-pentanol and ethanol, which were produced in more significant quantities in the *B. thermosphacta* batch than in the batches in which the protective strain was present. On the contrary, TVBN and TMA were not suitable as quality indicators for *B. thermosphacta* spoilage activity. In the products where the protective *L. piscium* strain was present, no adverse effect on sensory quality was noted by the sensory panels. Moreover, biogenic amine assessment did not show any histamine or tyramine production by this strain, underlining its safety profile. Both strains produced lactic acid (1850 mg/kg in *L. piscium* and *B. thermosphacta* batch on days 3 and 10 respectively; 3830 mg/kg on day 7 in mixed culture) and the pH decrease from 6.6 ± 0.0 to 5.9 ± 0.1 was similar in all batches. Lactic acid production or competition for free amino-acid was not involved in the inhibition mechanism; however rapid glucose consumption by *L. piscium* could partially explain the growth limitation of the spoilage micro-organism. This study demonstrated the spoilage characteristic of *B. thermosphacta* and the usefulness of *L. piscium* as a bioprotective culture for tropical cooked peeled shrimp without any adverse effect on the sensory quality of the product.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Seafood products permit the development of a wide range of undesirable microorganisms that include spoiling bacteria, due to

their physico-chemical characteristics (neutral pH, high content of small nitrogenous compounds) (Huis in't Veld, 1996). The growth of these unwanted bacteria leads to food spoilage which is a major economic problem. Therefore understanding bacterial mechanisms leading to sensory deterioration and developing methods to preserve seafood is obviously a priority. Ready-to-eat cooked and peeled shrimp packed under modified atmosphere is more and more popular in Europe. This product is highly perishable and shelf-life does not exceed 12 days at 4 °C when no preservatives are applied (French

* Corresponding author at: Ifremer, Laboratoire de Science et Technologie de la Biomasse Marine, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes, France. Tel: +33 240374172; fax: +33 240374071.

E-mail address: Francoise.Leroi@ifremer.fr (F. Leroi).

company communication). The spoilage microflora of cooked shrimp has been studied recently and includes lactic acid bacteria (LAB) and the specific spoilage organism *Brochothrix thermosphacta* (Dalgaard et al., 2003; Jaffrès et al., 2009; Mejholm et al., 2005; Laursen et al., 2006). As in most seafood products, microbial spoilage in shrimp often depends on the levels reached by the bacteria involved during storage. Minimising this level may help to fight against seafood product spoilage. To achieve this, the methods usually used are modified atmosphere packaging or the addition of chemical preservatives or often a combination of both these techniques (Al Dagal and Bazaraa, 1999; Mejholm et al., 2008). In recent years a new approach called biopreservation consisting in preventing the growth of unwanted microorganisms in seafood, by using added microorganisms, generally LAB, has been increasingly investigated as an alternative to chemical preservatives. The microbial antagonism of LAB against undesirable microorganisms has been attributed in many cases to metabolic products such as organic acids or bacteriocin production (Diop et al., 2009; Greer and Dilts, 2006; Mataragas et al., 2003; Pridmore et al., 2008; Smith et al., 2005) and changes in the physico-chemical environment (pH, CO₂ production) or a combination of these factors. Recent works have shown that the inhibition of undesirable bacteria may be correlated to substrate competition (Nilsson et al., 2005). An atypical strain of *Lactococcus piscium* isolated from fresh salmon steak packed under modified atmosphere (Matamoros et al., 2009a) showed a wide spectrum of activity in a model medium including *B. thermosphacta*. This strain revealed capacities for enhancing the shelf life and sensory quality of naturally contaminated seafood product such as shrimp and salmon without bacteriocin production, but no correlation was found between microbial counts (total viable counts, Enterobacteriaceae, LAB) and sensory quality (Matamoros et al., 2009a). Fall et al. (2010a) demonstrated that, this strain could limit the growth of *B. thermosphacta* and thus improve the sensorial quality of cooked shrimp; however, these activities were not linked to any specific metabolism of the strains.

This study was performed to evaluate the spoiling potential of *B. thermosphacta* and the relationship between its growth, metabolite production and sensory degradation observed during storage of tropical cooked peeled shrimp. The metabolism of *L. piscium* and its role as a protective culture were also investigated, as well as the mechanisms involved in its antagonistic effect on *B. thermosphacta*.

2. Materials and methods

2.1. Strains, media and culture conditions

Isolates came from the Ifremer/Oniris culture collection. *L. piscium* CNCM I-4031 (formerly *L. piscium* EU2241) was isolated from fresh salmon steak packed under MA (Matamoros et al., 2009b) and *B. thermosphacta* CD 340 from brined tropical cooked peeled shrimp packed under MA (Jaffrès et al., 2009). For all the experiments, strains were subcultured twice successively for 24 h at 26 °C in Elliker broth (Biokar) for *L. piscium* and 24 h at 20 °C in Brain Heart Infusion (Biokar, Diagnostic Beauvais, France) for *B. thermosphacta*.

2.2. Sterile shrimp preparation

31 kg of frozen tropical peeled and beheaded shrimp (*Penaeus vannamei*) farmed in Colombia (51/60 size i.e. 51 to 60 shrimps per pound) was obtained from a local production site, Miti industry (Nantes, France). Frozen shrimp were cooked at ONIRIS with industrial equipment by immersion in boiling salted water (3% NaCl w/v) for 2.5 min after re-ebullition and cooled in melting ice with 1.5% salt. The shrimp were vacuum packed in plastic bags (1 kg/bag) and stored at –80 °C for 9 days. The frozen cooked peeled shrimp were then sterilised by ionisation at 3.76 ± 0.16 kGy (IONISOS, Pouzauges, France).

2.3. Challenge tests

The cells were not washed before inoculation, but serial dilutions in salted peptone water (0.85% NaCl, 0.1% peptone) were performed to obtain the appropriate inoculum size. Shrimp were inoculated by spraying 10% v/w (5% of pure culture + 5% of water or 5% of protective culture + 5% of target strain for co-inoculation batch) onto the surface of the shrimp to reach a final level of approximately 7 log CFU/g and 3 log CFU/g for *L. piscium* and *B. thermosphacta* respectively. After inoculation, the samples were tumbled manually to ensure good microbial distribution.

Four batches of shrimp were used with different treatments: 1—sterility control, 2—inoculated with *L. piscium*, 3—inoculated with *B. thermosphacta*, 4—co-inoculated with *B. thermosphacta* and *L. piscium*. After inoculation, the shrimp were packed in 125 g portions under MA (50% N₂–50% CO₂) (Multivac T252, Wolfertschwenden, Germany) with a shrimp/gas ratio of approximately 2/1. Samples were stored at 8 °C for up to 31 days and removed after 1, 3, 7, 10, 14, 17, 24 and 31 days storage for microbial, physico-chemical (pH, acetic and lactic acids, total volatile basic nitrogen (TVBN), trimethylamine oxide (TMAO), trimethylamine (TMA), sugar, volatile compounds, biogenic amines, free amino-acids) and sensory analysis. All the analyses were performed in triplicate, in three separate punnets.

To investigate whether the antimicrobial activity of *L. piscium* was caused by its acid production, a new batch of shrimp was inoculated (5% v/w) by *B. thermosphacta* as described previously, portioned in 125 g packets and stored under the same conditions. After 7 days, all the packets were opened and half of them were sprayed with 5% (v/w) water and half with 5% (v/w) sodium lactate solution (44.7 g/l), in order to reach the maximum concentration of lactic acid naturally produced by *L. piscium* measured in this study. The shrimp were packed again under MA and *B. thermosphacta* was enumerated on days 0, 7, 14 and 24.

2.4. Microbial analysis

At each sampling time, the shrimp (20 g) were taken aseptically and transferred in stomacher bags containing 80 ml of saline peptone water and then blended with a Stomacher 400 (Seward Medical, London, UK) at normal speed for 2 min at room temperature. *L. piscium*, either alone or in co-inoculation, was selectively enumerated on spread plates of Elliker agar incubated at 8 °C for 96 h under anaerobiosis (Fall et al., 2010b). *B. thermosphacta* was enumerated (20 °C, 48 h) on Streptomycin Sulphate Thallous Acetate Agar with selective supplement (Oxoid, Hampshire, UK). TVC was estimated in the control once a week, by pour plating in Plate Count Agar (Biokar) before incubation at 26 °C for 48 h.

2.5. PCR-TTGE analysis

The temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) technique, a culture-independent method, was used to track the evolution of bacteria on days 1, 7, 14 and 17. For each batch, 10 ml of each triplicate of the mother solutions from microbial analysis was pooled. Bacterial DNA extraction, PCR amplification of the variable V3 region of 16S rRNA gene with v3F2 and v3F3-GC-clamp primers and TTGE analysis were performed as described by Jaffrès et al. (2009) in duplicate. 16S rRNA V3 amplicons from a mix of 10 species currently found in shrimp and including *B. thermosphacta* CD340 was used as a marker for bacterial presumptive identification and *L. piscium* CNCM I-4031 was run alone for control.

2.6. Sensory evaluation

Twelve panellists belonging to an internal Ifremer panel with long-term training and experience in seafood evaluation were asked to characterise the influence of each strain on cooked peeled shrimp

odours. They had to identify the level of spoilage of the sample by using a four-class scheme (class I: non spoiled, class II: lightly spoiled, class III: moderately spoiled, class IV: strongly spoiled) and then carry out conventional profiling (ISO, 2003) as described by Matamoros et al. (2009a). Odour descriptors were rice/crustacean, butter/caramel, pyrrolidin/spem, floorcloth, sour/fermented, amine, cheese/foot and cabbage/H₂S. The shrimp of each package were distributed in four small plastic drums covered with aluminium foil (3 shrimp per drum) and stored at 4 °C to keep the odour intact. Shrimp were removed from storage at 4 °C 15 min before the test and left at room temperature. The samples were coded and served in random order to the panellists. A quality coefficient (QC) taking into account the level of spoilage with an arbitrary weighting factor attributed to each class was calculated as follows: $QC = [(1 \times \% \text{ of answers in class I}) + (2 \times \% \text{ of answers in class II}) + (3 \times \% \text{ of answers in class III}) + (4 \times \% \text{ of answers in class IV})] / 100$. QC varied from 1 (nonspoiled product, 100% of the panellists having judged the product as nonspoiled) to 4 (strongly spoiled product, 100% of the panellists having scored the product in class IV). The profile data were treated by variance analysis with two factors (product and judge effects). Multivariate data processing in the form of principal component analysis (PCA) was performed on the mean sample sensory scores with Uniwin 6.1 software (Sigma Plus, Paris, France). This PCA was based on the correlation matrix, in order to give the same importance to all the attributes whatever the range of the scale used. On day 31, four panellists, who had been informed of the experiments, ate 3 shrimp inoculated by *L. piscium* and compared them to the control (taste and texture).

2.7. Biochemical analysis

Prior to inoculation, shrimp characteristics (pH, salt content, proteins, lipids and water content) were determined as described by Fall et al. (2010b). TMA-O, TMA and TVBN were measured in duplicate in the replicates, using the method described by Conway and Byrne (1933) on a 100 g portion of shrimp. Lactic and acetic acids were analysed with the enzymatic UV 340 nm test kit 021 (Biosentec, Toulouse, France), by using an extraction method proposed by Fall et al. (2010b). Sugar content was measured by a modified (water extraction instead of TCA extraction) colorimetric method of Dubois et al. (1956). Biogenic amine and volatile compounds were analysed in triplicate on days 1 and 14. A fraction of 1.5 ml of the five-fold dilution used for microbial analyses was kept at –80 °C and used for biogenic amine quantification. Putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, spermine and spermidine were analysed by high pressure liquid chromatography (HPLC) using a Kromasil reversed phase column C18 (5 µm, 25 cm × 4.6 mm) fitted with a Brownlee C18 precolumn (5 µm, 3 cm × 4.6 mm) according to Duflos et al. (1999). Free amino acids content was determined in all batches at day 1 and day 14 by using the amino acid analyser Biochrom 30 (Biochrom, Cambridge, United Kingdom) at LAREAL Food Research Laboratory, Vannes, France.

Analysis of volatile compounds was performed using a solid phase micro extraction coupled with a gas chromatograph interfaced with a mass spectrometer (SPME/GC-MS). For each batch, a 20 g portion of shrimp was individually introduced into a stomacher bag and 50 ml of NaCl saturated water (300 g/l) added. Samples were blended with a stomacher Lab-blender 400 Seward (Norfolk, USA) and 25 ml of the resulting aqueous phase was transferred into tubes and centrifuged at 10000 g, 10 min, 4 °C. Eleven millilitres of the supernatant was transferred to 20 ml vials to which 10 µl of 3-methyl-3-buten-1-ol (internal standard) was added. All the vials were sealed and then placed in the sample tray of the Combi Pal AOC-5000 auto injector system at 4 °C. The samples were heated to 50 °C and mixed at 500 rpm for 10 min to adsorb volatile compounds in the headspace of the vials. SPME fibre, 75 µm Carboxen/Polydimethylsiloxane (Supelco, Bellefonte, PA, USA) was inserted into the septum of the vials and exposed for 40 min for

volatile sorption. The fibre was then introduced through the injector port of the chromatograph for 10 s at 250 °C to desorb volatile compounds. The GC (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a SLB-5 ms fused silica capillary column (60 m × 0.25 mm × 0.25 µm film thickness) from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) was coupled to a Shimadzu MS detector QP2010 Plus. The injection port was kept at 250 °C in splitless mode. The flow rate of the carrier gas (helium) was 1.78 ml/min; the temperature of the column was maintained at 35 °C, 5 min and then progressively increased from 35 to 100 °C, first in the flow at 10 °C min⁻¹, and then from 100 °C to 280 °C at 20 °C min⁻¹ and maintained for 5 min. The MS detector was operated in electron ionisation mode (70 eV) and the ion source temperature was maintained at 200 °C. A continuous scan mode was used with a mass range from 33 to 200 m/z. Volatile compounds were identified by matching their mass spectra to those contained in the NIST 2008 mass spectral database (developed for Shimadzu by NIST). Analysis of variance (ANOVA) with the LSD multiple range test, was performed with Statgraphics Plus Centurion XV.1 software (Sigma Plus) on the means of volatile compounds and free amino acids. The significant level was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Shrimp characteristics

The shrimp studied contained $73.0 \pm 0.5\%$ of water, $22.1 \pm 0.0\%$ of proteins, $0.52 \pm 0.04\%$ of carbohydrates, $0.5 \pm 0.0\%$ of lipid and $1.24 \pm 0.02\%$ of NaCl.

3.2. Microbial growth in shrimp

In the uninoculated batches, no colony was detected by plate count agar (threshold 5 CFU/g) throughout the experiment, confirming that the ionisation dose is sufficient to ensure the bacterial stability of the product. Fig. 1 shows the growth kinetics of *L. piscium* and *B. thermosphacta* in pure and mixed cultures. The growths of *L. piscium* alone or in presence of *B. thermosphacta* were similar. Within the first 4 days of the challenge test at 8 °C, *L. piscium* numbers increased by 2.0 ± 0.1 log CFU/g cycles to reach a maximum of 9.1 ± 0.1 log CFU/g and remained constant till the end of the experiment. *B. thermosphacta* increased from an initial level of 3.7 ± 0.8 log CFU/g up to 8.7 ± 0.1 log CFU/g in 10 days and over. When inoculated with *L. piscium*, *B. thermosphacta* reached its maximum number of 5.5 ± 0.2 log CFU/g in 7 days. Then the growth was stopped and the count remained constant until 31 days storage, corresponding to a 3.2 ± 0.1 log CFU/g reduction when compared to *B. thermosphacta* alone.

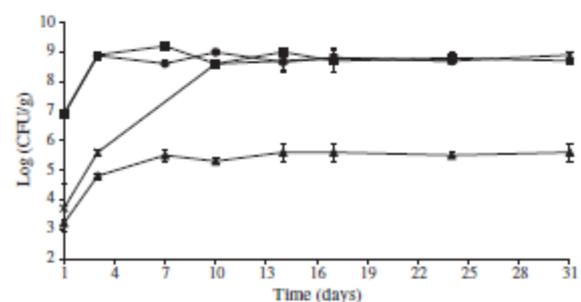


Fig. 1. Growth of *Lactococcus piscium* CNCM 1-4031 and *Brochothrix thermosphacta* CD340 in peeled and cooked shrimp packed under modified atmosphere and stored at 8 °C. (■) *L. piscium* alone; (●) *L. piscium* in co-inoculation; (▲) *B. thermosphacta* alone; (◆) *B. thermosphacta* in co-inoculation. Values are averages of three analyses ± standard deviation.

3.3. TTGE analysis

TTGE fingerprints of the V3 region of 16S rRNA gene analysis were assessed in the bacterial ecosystem monitored in order to compare the results from this technique to those from microbial counts. According to unpublished results obtained in our laboratory, the detection limit of the TTGE technique for a pure culture of bacteria is 4 log CFU/ml. The results obtained on days 1, 7 and 14 are presented in Fig. 2 (results at day 17 are similar to day 14). In the control no band was recorded at any analysis point, confirming the sterility of the matrix, whereas a highly intense band fitting to the migration position of *L. piscium* was observed on days 0, 7 and 14 in the batch inoculated with the protective culture alone, corresponding to *L. piscium* counts of approximately 7, 9 and 9 log CFU/g respectively. For *B. thermosphacta* alone on day 1 (3.7 log CFU/g), no band was detected whereas on days 7 and 14, when counts reached approximately 7 and 9 log CFU/g respectively, a migration band assigned to *B. thermosphacta* was detected. In coculture, the band corresponding to *L. piscium* was always present, whereas no band was detected for *B. thermosphacta*, whose number ranged between 3 and 5 log CFU/g throughout storage.

3.4. Sensory evaluation

In plane 1–2 of the PCA performed with the sensory characteristics of the samples (Fig. 3), the first axis (75% inertia) discriminated fresh samples with rice and crustacean odours (left part of PCA) from spoiled samples with amine, cheese/foot, sour/fermented, pyrrolidin and butter/caramel odours (right part). The second axis (11% inertia) opposed samples with milky notes (upper part) with H_2S /cabbage and floorcloth off-odours (lower part). The evolution of QC is shown in Fig. 4. During the first 4 days of the experiment, the QC of all batches was below 2, as with the control, and no off-odour was detected (samples in the left part of the PCA). On day 7 the batch inoculated with *B. thermosphacta* was characterised by a slightly cheese/foot and pyrrolidin/sperm odour with a quality index of 2.6 ± 0.7 . After 10 days, most of the panellists judged the sample as spoiled or strongly spoiled and QC varied from 2.9 ± 0.8 to 3.4 ± 0.4 throughout storage. Sensory rejection (day 10) occurred when the cell number of *B. thermosphacta* reached 8–9 log CFU/g. The samples were clustered in the right part of PCA and mainly characterised by butter/caramel and sour/fermented off-odours. On the contrary, when *B. thermosphacta* was co-inoculated with *L. piscium*, the QC of the product was below 2 for 38 days and the samples were clearly clustered in the left part of the PCA, with rice/crustacean odour typical of fresh shrimp. *L. piscium* alone did not spoil the product, except on day 38 when very slight floorcloth odours were detected. The samples were in the same cluster as *L. piscium* with *B. thermosphacta* (Fig. 3) and the QC was always lower than 2. At the end of the experiments, four judges ate

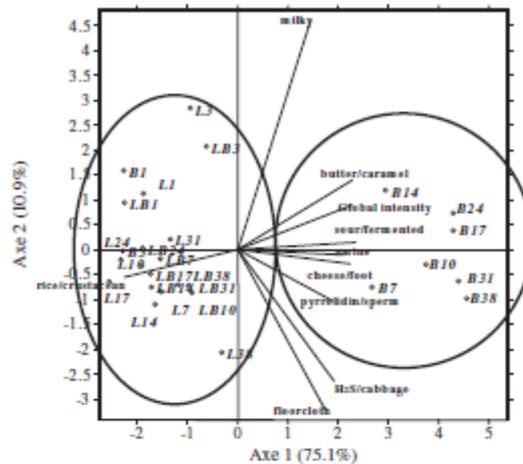


Fig. 3. Representation of the evolution of odours of cooked peeled shrimp samples stored at 8 °C on planes 1–2 of principal component analysis. Lx: *L. piscium* CNCM I-4031 at day x; Bx: *B. thermosphacta* at day x; LBx: co-inoculated with *L. piscium* and *B. thermosphacta* at day x.

the products inoculated by *L. piscium* and did not perceive any off-flavour or acid notes.

3.5. Volatile compounds analysis

The initial TVBN concentration in the control was 10.8 ± 0.2 mg-N/100 g. A slight increase up to 13.7 ± 0.7 mg-N/100 g was observed after 14 days but TVBN concentration decreased on day 24 (1.9 ± 0.1 mg-N/100 g). The same concentration patterns were observed for samples inoculated with *L. piscium* and *B. thermosphacta* alone or in mixed culture. The initial TMAO concentration in shrimp was 2.5 ± 0.1 mg-N/100 g. In the control no TMA was measured throughout the experiment. *B. thermosphacta* produced a slight amount of TMA (4.2 ± 0.1 mg-N/100 g) over 14 days. *L. piscium* alone did not produce TMA alone or in co-culture with *B. thermosphacta* (Table 1).

About 72 volatile compounds were detected by SPME/GC-MS and identified in all batches. The compounds present in the air and saline diluent and those that were not present in triplicate in studied batches were eliminated and finally, 23 molecules of interest including ketones, alcohols, aldehydes and hydrocarbons were taken into consideration to compare the batches (Table 2). In the control, the concentration of certain compounds increased or decreased from day 1 to 14 and new molecules of autolytic origin were also detected. On day 14,

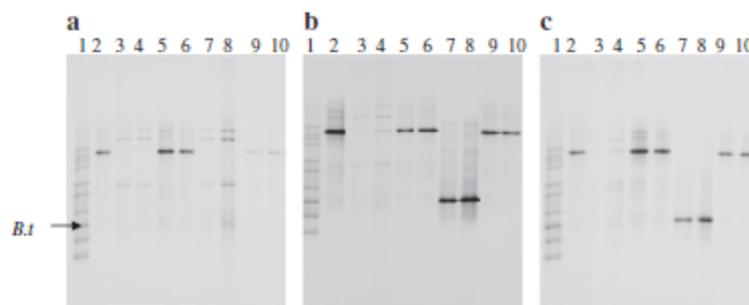


Fig. 2. TTGE fingerprints of the amplified V3 region of 16S rRNA gene of total bacterial DNA extracted from cooked peeled shrimp at different times during storage at 8 °C: (a) day 1, (b) day 7 and (c) day 14. Lane 1: marker profile (the arrow indicates *B. thermosphacta* band); lane 2: *L. piscium* marker; lanes 3–4: sterility control; lanes 5–6: *L. piscium* batch; lanes 7–8: *B. thermosphacta* batch; lanes 9–10: mixed culture.

Please cite this article as: Fall, P.A., et al., Sensory and physicochemical evolution of tropical cooked peeled shrimp inoculated by *Brochothrix thermosphacta* and *Lactococcus piscium*, Int. J. Food Microbiol. (2011), doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.015

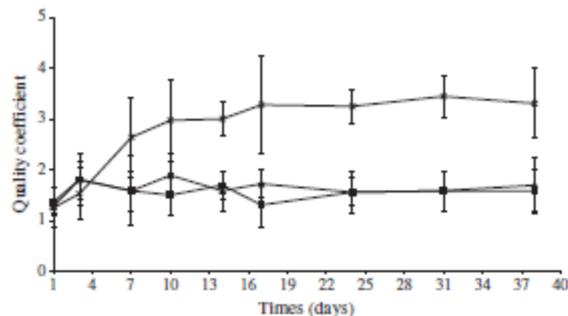


Fig. 4. Quality coefficient of inoculated cooked peeled MAP shrimp stored at 8 °C. (■) scores of batches inoculated with *L. piscium* CNCM I-4031 alone; (x) *B. thermosphacta* CD340 alone; (▲) *L. piscium* and *B. thermosphacta*. Values are averages of 36 analyses \pm standard deviation. Scores higher than 3 are judged as unacceptable.

B. thermosphacta produced 6 new compounds: 2,3 butanedione, 2-pentanone, 3-hydroxy-2-butanone, 2-pentanol, 3-methyl-1-butanol and 4-methyl-3-chloro-2-pentanol. A significant increase of ethanol, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol and hydrocarbon benzene as well as the total disappearance of 3-methyl-2-pentanone and 1-butanol were also noticed. *L. piscium* produced the same molecule, except 4-methyl-3-chloro-2-pentanol, and did not consume 1-butanol. The batch with mixed culture was mainly characterised by a production of heptanal and the absence of 2-pentanol, cyclopentanol, 3-methyl-1-pentanol and 2-methyl-1-butanol. Statistical tests showed that 2,3 butanedione, 3-methyl-1-butanol, 4-methyl-3-chloro-2-pentanol, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol and hydrocarbons benzene were significantly ($P \leq 0.05$) more concentrated in the batch with *B. thermosphacta*, characterised by strong off-odours, than in unspoiled batches with *L. piscium* alone or mixed with *B. thermosphacta*.

3.6. Biogenic amines

In the control after 14 days storage, neither histamine nor spermine was detected whilst tyramine, putrescine, cadaverine and spermidine were at very low levels (1.8 ± 0.1 mg/kg, 1.8 ± 0.2 mg/kg, 4.2 ± 0.3 mg/kg and 2.8 ± 0.2 mg/kg respectively). No biogenic amine production was observed in the batches inoculated by *L. piscium* and *B. thermosphacta* alone and in combination (data not shown).

3.7. Glucose, lactic acid and free amino acid determination

The analysis of substrates or metabolites such as free amino acids, glucose and lactic acid was performed in order to determine their possible involvement in the antagonistic mechanism of the protective *L. piscium* strain.

Free amino acids profile of tropical cooked peeled shrimp on day 1 (Table 3) showed a high level content of proline (3178 ± 252 mg/kg), arginine (3149 ± 132 mg/kg) and glycine (2575 ± 64 mg/kg) respectively. On the other hand, aspartic acid, ornithine, threonine, isoleucine

and phenylalanine were found in weak concentration (lower than 90 mg/kg). Cysteine, methionine and tryptophan were not detected. After 14 days of storage, a statistically significant difference in isoleucine concentration, in term of consumption, was established between batch inoculated with *B. thermosphacta* and non-inoculated batch (Table 3).

Mean carbohydrate concentration in *Penaeus vannamei* shrimp, probably corresponding to glucose, as demonstrated by Fall et al. (2010a), was $0.52 \pm 0.04\%$. *L. piscium* consumed sugar very quickly, with concentration dropping to 0.36 ± 0.00 and $0.16 \pm 0.03\%$ in 1 and 3 days respectively and then remaining at this level until 31 days. The same values (no significant difference) were observed in co-culture. *B. thermosphacta* alone also consumed glucose, total consumption being observed on day 7 ($0.13 \pm 0.02\%$). pH and L-lactate production are shown in Fig. 5. No acetic acid was detected in the samples. Shrimp is naturally rich in lactate (1680 ± 60 mg/kg). Both *L. piscium* and *B. thermosphacta* produced L-lactate. The maximum concentration observed was 3530 ± 130 mg/kg corresponding to an increase of 1850 mg/kg, after 3 and 10 days respectively for *L. piscium* and *B. thermosphacta*, although a fall on day 7 for *B. thermosphacta* was observed. In co-inoculated batches, lactate concentration reached 5510 ± 180 mg/kg on day 7, representing a production of 3830 ± 225 mg/kg, which is far higher than the addition of *L. piscium* and *B. thermosphacta* production. Thereafter the concentration in the co-inoculation batch was the same as with *L. piscium* alone. The mean pH value of the sterile shrimp was constant (6.56 ± 0.02) throughout the experiment. A rapid drop in pH to 6.05 ± 0.11 in 3 days was observed in batches inoculated with *L. piscium* alone or in co-culture. A similar variation was also noticed after day 10 with *B. thermosphacta* (Fig. 5).

In order to assess the effect of lactate produced by *L. piscium* on the inhibition of *B. thermosphacta*, the growth of the latter was monitored in the presence of the maximum lactate concentration produced by the protective strain (1850 mg/kg) and compared to growth without the addition of lactate. No significant difference was observed for the growth of *B. thermosphacta* under these two conditions (data not shown).

4. Discussion

In this study, the growth of *L. piscium* CNCM I-4031 and the spoilage microorganism *B. thermosphacta* in cooked peeled shrimp at 8 °C as well as the effect of their metabolites on sensory quality was evaluated. This temperature was chosen because it feigns the temperature usually observed in consumer's fridge. Moreover, the protocol of shelf-life validation for cooked/peeled shrimp stored under MAP, in the French good manufacturing and hygienic practise guide, always includes a period at 8 °C. The rapid growth of *L. piscium* and *B. thermosphacta* corroborates the fact that these two bacteria are psychrotrophic and can catabolise shrimp meat substrates for their growth.

Adaptation of *B. thermosphacta* in such matrixes has been already demonstrated by Laursen et al. (2006), as an increase from less than 1 log CFU/g to 4.5 log CFU/g after 10 days at 5 °C was observed in Nordic cooked shrimp. Mejholm et al. (2005) also proved that *B. thermosphacta*

Table 1

Concentration of total volatile basic nitrogen (TVBN) and trimethylamine (TMA) (mg-N/100 g) in cooked peeled shrimp stored at 8 °C. Values are averages of three analyses \pm standard deviation.

Days	TVBN					TMA				
	1	7	14	24	31	1	7	14	24	31
Control	10.8 ± 0.2	10.5 ± 1.3	13.7 ± 0.7	1.9 ± 0.1	nd	nd	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	nd
<i>L. piscium</i>	9.1 ± 0.7	9.8 ± 1.5	9.5 ± 0.2	3 ± 0.0	1.8 ± 0.1	nd	0.98 ± 0.8	1.8 ± 0.5	0 ± 0.0	0.6 ± 0.0
<i>Bt</i>	6.6 ± 0.5	9.7 ± 0.5	14.1 ± 1.3	2.7 ± 0.4	1.4 ± 0.5	nd	1.7 ± 0.4	4.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0	1.2 ± 0.1
<i>L. piscium</i> + <i>Bt</i>	10.5 ± 0.4	8.7 ± 0.1	11.9 ± 2.7	1.6 ± 0.3	3.9 ± 0.3	nd	0 ± 0.0	1.8 ± 0.5	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.0

nd not determined.

Please cite this article as: Fall, P.A., et al., Sensory and physicochemical evolution of tropical cooked peeled shrimp inoculated by *Brochothrix thermosphacta* and *Lactococcus piscium*, Int. J. Food Microbiol. (2011), doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.015

Table 2

Volatiles compounds identified in tropical cooked peeled shrimp inoculated with *L. piscium* CNCM I-4031 and *B. thermosphacta* CD340 in pure and mixed culture and stored under modified atmosphere at 8 °C after 1 day and 14 day.

Volatile compound	Retention time	Day 1		Day 14		
		Control	Control	<i>L. piscium</i>	<i>Bt</i>	<i>L. piscium + Bt</i>
Ketones						
2,3-Butanedione	5.07	nd	nd ^{a,c,d}	6.2 ± 0.0 ^{a,c,d}	6.7 ± 0.0 ^{a,b,d}	6.4 ± 0.0 ^{a,b,c}
2-Pentanone	5.15	nd	nd ^{a,c,d}	6.4 ± 0.2	6.5 ± 0.3	6.1 ± 0.2
3-Hydroxy-2-butanone	7.75	nd	nd ^{a,c,d}	6.6 ± 0.6	6.8 ± 0.7	6.2 ± 0.2
3-Methyl-2-pentanone	5.21	6 ± 0.0	5.7 ± 0.0 ^{b,c,d}	nd ^a	nd ^a	nd ^a
Alcohols						
Ethanol	3.84	6.8 ± 0.1	6.8 ± 0.1 ^{c,d}	6.8 ± 0.1	7.2 ± 0.1 ^{a,b}	7.3 ± 0.1 ^{a,b}
2-Pentanol	4.13	5.7 ± 0.0	nd ^{a,c,d}	5.5 ± 0.0 ^{a,d}	5.5 ± 0.00 ^{a,d}	nd ^{b,c}
1-Butanol	6.72	5.6 ± 0.2	5.1 ± 0.9 ^{c,d}	5.4 ± 0.1 ^{c,d}	nd	6.4 ± 0.1 ^{a,b,c}
1-Penten-3-ol	7.16	5.1 ± 0.1	5.8 ± 0.1	5.3 ± 0.2 ^{a,c}	5.8 ± 0.01 ^{b,d}	5.6 ± 0.4 ^{a,c}
Cyclopentanol	7.51	nd	5.8 ± 0.2 ^{b,d}	5.4 ± 0.1 ^{a,c,d}	6 ± 0.2 ^{b,d}	nd ^{b,c}
4-Pentanol	10.3	6.1 ± 0.0	5.8 ± 0.3	5.9 ± 0.2	6.2 ± 0.0	6.1 ± 0.1
3-Methyl-1-butanol	8.53	nd	nd ^{a,c,d}	6.7 ± 0.0 ^{a,c,d}	7.2 ± 0.0 ^{a,b,d}	nd ^{b,c}
4-Methyl-3-chloro-2-pentanol	10.03	nd	nd ^{a,c,d}	nd ^a	5.3 ± 0.3 ^{a,b,d}	nd ^a
Aldehydes						
3-Methyl-1-butanol	6.44	nd	5.8 ± 0.0 ^f	6.5 ± 0.7 ^f	7 ± 0.0 ^{a,b,d}	6 ± 0.2 ^f
2-Methyl-1-butanol	6.66	nd	5.6 ± 0.0 ^{b,c,d}	6.3 ± 0.0 ^{a,c,d}	6.7 ± 0.0 ^{a,b,d}	nd ^{a,b,c}
Heptanal	7.52	nd	nd ^{a,c,d}	nd ^a	nd ^a	5.9 ± 0.3 ^{a,b,c}
Pentanal	7.59	5 ± 0.0	5.1 ± 0.0	5.3 ± 0.2	5.1 ± 0.0	4.9 ± 0.0
Hydrocarbons						
Benzene	6.54	6.4 ± 0.2	5.5 ± 0.2 ^{b,c,d}	6.1 ± 0.8 ^{a,c}	6.5 ± 0.8 ^{a,b,d}	6.2 ± 1.2 ^{a,c}
3,3-Dimethyl-hexane	9.04	6.1 ± 0.1	6.7 ± 0.1	6.8 ± 0.1	6.8 ± 0.1	6.8 ± 0.2
4-Methyl-heptane	9.13	nd	5.8 ± 0.2	5.7 ± 0.1	6 ± 0.1	5.9 ± 0.1
2,3,4-Tri methyl-pentane	8.86	5.8 ± 0.1	6.3 ± 0.1	6.5 ± 0.7	6.5 ± 0.1	6.5 ± 0.0
3,3-Dimethyl-octane	12.55	nd	4.8 ± 0.1	4.8 ± 0.1	5 ± 0.0	4.9 ± 0.2
2,2,5-Tri methyl-hexane	9.71	nd	4.7 ± 0.1	4.8 ± 0.1	4.8 ± 0.0	4.9 ± 0.1
2,2,4 Trimethyl heptane	12.14	nd	5 ± 0.1	5.1 ± 0.1	5.2 ± 0.0	5.5 ± 0.1

Values are averages ± standard deviation of log (peak area/g), n = 3.

nd: not detected.

^aIndicates statistically significant difference of mean compared to control at day 14.

^bIndicates statistically significant difference of mean compared to *L. piscium* at day 14.

^cIndicates statistically significant difference of mean compared to *B. thermosphacta* at day 14.

^dIndicates statistically significant difference of mean compared to mixed culture at day 14.

can reach 8 log CFU/g in cooked peeled Nordic shrimp stored at 2, 5 and 8 °C. As shown previously by Fall et al. (2010b), *L. piscium* confirmed its adaptation on shrimp and its colonisation during the storage was also

demonstrated using the TTGE technique. TTGE or DDGE was useful for monitoring protective flora, as shown by Vasiliopoulos et al. (2010) in cooked ham stored under MAP. TTGE also permitted the detection of

Table 3

Free amino acids content (mg/kg) in all batches of tropical cooked peeled shrimp stored at 8 °C after 1 day and 14 days. Values are averages of three analysis ± standard deviation.

Amino acid	Day 1		Day 14		
	Control	Control	<i>L. piscium</i>	<i>Bt</i>	<i>L. piscium + Bt</i>
Taurine	189.7 ± 0.6	186.7 ± 1.5 ^c	189.3 ± 2.1 ^c	194.7 ± 5.7 ^{a,b,d}	187 ± 4.3 ^c
Aspartic acid	19.3 ± 1.1	19.3 ± 0.6 ^c	20.3 ± 1.5 ^c	25.3 ± 1.5 ^{a,b,d}	19.7 ± 1.5 ^c
Threonine	83.7 ± 7.2	70.7 ± 23 ^d	82.3 ± 5 ^d	89 ± 9.2 ^d	94.7 ± 1.5 ^{a,b,c}
Serine	101.7 ± 5.7	98.7 ± 7.6 ^d	101.7 ± 3.1 ^d	93 ± 5.3 ^d	104.7 ± 0.6 ^{a,b,c}
Asparagine	175.7 ± 6.6	170 ± 13.1	168 ± 9	158 ± 7	173.3 ± 6.4
Glutamic acid	290.7 ± 16.6	288.7 ± 7.1 ^{b,c,d}	314 ± 14.1 ^{a,c,d}	341.7 ± 13.6 ^{a,b,d}	335.7 ± 9.1 ^{a,b,c}
Glutamine	627.3 ± 15.5	581.7 ± 5.7	527 ± 43.7	566.4 ± 30.6	541.3 ± 23.8
Proline	3178 ± 252.7	3147.3 ± 88.5 ^c	3294 ± 144 ^c	3431 ± 129.5 ^{a,b,d}	3351.7 ± 53.1 ^c
Glycine	2575 ± 64.5	2461.3 ± 56.3 ^{c,d}	2501 ± 17.1 ^{c,d}	2583 ± 21.3 ^{a,b,d}	255.23 ± 47.7 ^{a,b,c}
Alanine	860 ± 39	843.7 ± 22.3 ^c	814 ± 26.2 ^c	888.3 ± 61.5 ^{a,b,d}	844.33 ± 24.5 ^c
Valine	148.3 ± 8.5	144 ± 11.1	141 ± 8.5	147 ± 6.2	143.7 ± 2.5
Isoleucine	81.7 ± 5.1	80.3 ± 4.9 ^c	74.3 ± 6 ^c	69 ± 4.3 ^{a,b,d}	73.7 ± 0.6 ^c
Leucine	158 ± 7.9	150.3 ± 5.7	148 ± 8.5	144.3 ± 7.6	150.7 ± 1.1
Tyrosine	134.3 ± 9.4	130.6 ± 11.6	125.7 ± 9.7	136 ± 9.2	131.3 ± 6.5
Phenylalanine	87.3 ± 5.5	87 ± 6	83.3 ± 3.8	86 ± 3.6	83.7 ± 2.1
Histidine	132.7 ± 10.5	130 ± 12.1 ^c	129.7 ± 5.1 ^c	149.3 ± 1.1 ^{a,b,d}	168 ± 6 ^c
Ornithine	29.7 ± 2.1	30.7 ± 2.1	29.7 ± 3.8	32.3 ± 3.2	33 ± 1
lysine	290.7 ± 16.8	272.7 ± 33.1	253 ± 14.8	279.7 ± 21	271.7 ± 23
Arginine	3149.3 ± 132.5	3042 ± 65.5 ^{b,c,d}	3240.3 ± 82 ^a	3259.4 ± 139.6 ^a	328.33 ± 98 ^a

^aIndicates statistically significant difference of mean compared to control at day 14.

^bIndicates statistically significant difference of mean compared to *L. piscium* at day 14.

^cIndicates statistically significant difference of mean compared to *B. thermosphacta* at day 14.

^dIndicates statistically significant difference of mean compared to mixed culture at day 14.

Please cite this article as: Fall, P.A., et al., Sensory and physicochemical evolution of tropical cooked peeled shrimp inoculated by *Brochothrix thermosphacta* and *Lactococcus piscium*, Int. J. Food Microbiol. (2011), doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.015

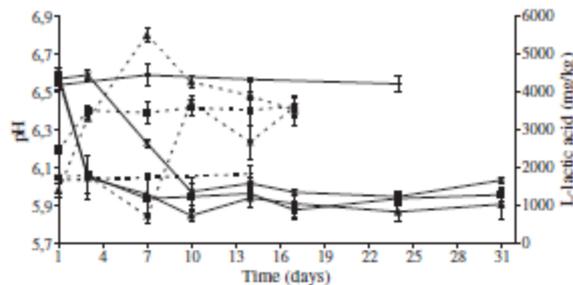


Fig. 5. L-lactic acid (dotted line) and pH (solid line) evolution in peeled and cooked shrimp packed under modified atmosphere and stored at 8 °C. (—) Non inoculated; (■) inoculated with *L. piscium* CNCM I-4031 alone; (x) *B. thermosphacta* CD340 alone; (▲) co-inoculated with *L. piscium* and *B. thermosphacta*. Values are averages of three analyses \pm standard deviation.

B. thermosphacta on day 7 before rejection of the samples by the sensory panel, and thus could be used as an alternative detection method for spoiling microbial indicators. In co-culture, species representing less than 1% of the total community are not visible in TTGE profiles (Muyzer et al., 1993; Ogier et al., 2002). Although not quantitative, the results obtained in co-culture (absence of *B. thermosphacta* and presence of *L. piscium* fingerprints) demonstrated the efficiency of this technique by revealing the inhibition of one bacterial population by another.

When growing, the metabolic activity of *B. thermosphacta* spoiled the product with the emission of off-odours. TMA resulting from the bacterial reduction of TMAO under anaerobic condition and TVBN are often used as spoilage indicators for fish and seafood products. The production of these compounds by *B. thermosphacta* was not significant in shrimp, as it has already been shown in cold-smoked salmon by Stohr et al. (2001). These compounds were found to be poor quality indices for naturally contaminated cooked shrimp (Dalgaard and Jørgensen, 2000; Mejhlholm et al., 2005) and for raw peeled royal shrimp *Penaeus kerathurus* (Sadok et al., 2004). The low initial level of TMAO in tropical shrimp may explain the weak production of TMA observed in this study, both by the Conway and SPME-GC-MS. Contrary to what has been determined for other seafood products (Jørgensen et al., 2000; Veciana-Nogues et al., 1997), biogenic amines could not be retained as spoilage indicators since they were not produced by *B. thermosphacta* at the time of rejection. The same observations were made by Mejhlholm et al. (2005).

The strong butter/caramel off-odour detected in our study has also been attributed to *B. thermosphacta* by Laursen et al. (2006) and Mejhlholm et al. (2005) after ten days storage at 5 °C in cooked, peeled Nordic shrimp. This off-odour is usually correlated to diacetyl production (2,3-butanedione) whose production was significantly higher in the batch inoculated with *B. thermosphacta* than in the batches in which *L. piscium* was present and which were not rejected by the panel. For Laursen et al. (2006), in addition to diacetyl, other volatile compounds like 3-methyl-1-butanol and 3-methyl-1-butanol may explain the formation of off-odours by *B. thermosphacta*. In our study, these two compounds were also over-produced in batches inoculated by *B. thermosphacta*. 2,3-butanedione and 3-methyl-1-butanol stem from the pyruvate metabolism, whereas for *Carnobacterium* spp. and *E. coli* (Connor et al., 2010; Larouture-Thivey et al., 2003) 3-methyl-1 butanol is known to stem from leucine metabolism, one of the main amino acids measured in shrimp (Fall et al., 2010a). It is however notable to observe that these 3 volatile compounds, although in lesser quantity, were also produced in the batches inoculated by *L. piscium* without the detection of any off-odours. Concentration of these molecules was not measured and the relation with the sensory perception remains unknown. These metabolites were probably under the olfactory threshold in the case of *L. piscium* and thus not detected by the sensory panel. It is likely that

4-methyl-3-chloro-2-pentanol, which is only produced by *B. thermosphacta*, and the production of ethanol, 1-penten-3-ol, cyclopentanol, 2-methyl-1-butanol and hydrocarbons benzene that are significantly greater in *B. thermosphacta* compared to other batches on day 14, could participate in the off-odours of the products. All these compounds, except for cyclopentanol and 4-methyl-3-chloro-2-pentanol, were identified previously by Laursen et al. (2006) and Vasilopoulos et al. (2010) in cooked peeled MAP shrimp and cooked ham inoculated with *B. thermosphacta*. The production of 2-heptanone and 2-hexanone by *B. thermosphacta* in cold-smoked salmon, leading to blue cheese off-odour (Joffraud et al., 2001) has not been shown in shrimp.

The production of diacetyl has been associated with the aerobic metabolism of *B. thermosphacta* (Dainty et al., 1979; Laursen et al., 2006; Leroy et al., 2009; Pin et al., 2002). In our study after the first day of incubation at 8 °C, the concentration of CO₂ decreased to 25% due to absorption in the shrimp flesh (the relation between CO₂ in the packaging gas and in the headspace at equilibrium at 8 °C predicts 35% with a 2/1 gas/fish ratio and 25% with 1/1). This phenomenon was followed by an alternate increase and decrease that has already been observed by Mejhlholm et al. (2005) and could be linked to the fermentative metabolism of the strains and permeability of the packaging film. Some authors suggested that higher CO₂ concentration in MAP could reduce the spoilage potential of *B. thermosphacta* in cooked peeled shrimp (Laursen et al., 2006), however, higher concentrations lead to acidic taste. Our study showed that at 8 °C an atmosphere of 50% CO₂-50% N₂ without O₂ was not efficient enough to limit the production of butter-like off-odours. However it has been shown for other bacteria such as *Listeria monocytogenes* that at lower temperature (2 °C), the solubility of CO₂ combined to the effect of the temperature was more efficient to reduce its growth in cooked MAP shrimp (Mejhlholm et al., 2005). Additional hurdles such as the protective bacteria *L. piscium* CNCM I-4031 delayed the undesirable sensory changes caused by *B. thermosphacta* and led to extending the shelf-life of cooked peeled shrimp. The effectiveness of *L. piscium* as a protective culture was demonstrated in a previous study for 21 days storage (Fall et al., 2010a) and is confirmed here for 31 days storage with no adverse effects on sensory quality of the biopreserved product. In the samples inoculated with *L. piscium*, the volatile compounds detected were similar to those inoculated with *B. thermosphacta*, but with a significantly lower amount for most of them. Diacetyl is an end product of the citric acid metabolism of LAB, including species belonging to the genus *Lactococcus* (Bartowsky, 2009; Jay, 1982) and this property is often used in the food industry for generating buttermilk flavour. In shrimp however, the production of diacetyl by *L. piscium* was not detected by smell or taste. The drop in pH and in lactic acid production by the lactic protective strain was not considered negative by the panel and the absence of TVBN, TMA and biogenic amine production confirmed the neutrality of the protective strain on this product. The absence of histamine and tyramine is also an important positive point for food applications.

B. thermosphacta was inhibited by *L. piscium* by more than 3 log CFU/g. Laursen et al. (2006) failed to demonstrate the efficacy of *Camobacterium maltaromaticum* cluster I as a protective culture on the sensory quality of cooked peeled MAP shrimp inoculated with *B. thermosphacta*, although positive results had been obtained in a Petri dish. To our knowledge, no extension of shelf-life has been obtained in shrimp by using biopreservation technology. Al Dagal and Bazarraa (1999) had little success with *Bifidobacterium breve* on either whole or peeled *Penaeus* sp. at 0 °C. Einarsson and Lauzon (1995) extended the shelf-life of brine *P. borealis* with crude extract of bacteriocins (bavaricin A and nisin Z), but did not test for live bacteria. Most of the promising studies concerning the specific inhibition of *B. thermosphacta* by LAB have been performed on meat products. Castellano et al. (2010), Vasilopoulos et al. (2010) and Vermeiren et al. (2006a,b) have successfully improved the shelf-life of different meat

products with selected *Leuconostoc carnosum* and *Lactobacillus sakei* strains that inhibited *B. thermosphacta* but the application was limited due to acidic flavours in the inoculated products. Despite a glucose concentration close to those of certain cooked meat products, the final pH in shrimp inoculated by the protective *L. piscium* strain remains higher than in meat (5.9 versus 5.2 to 5.8), probably due to the higher initial pH and higher buffering capacity of shrimp meat. The antimicrobial activity mechanism of *L. piscium* against *B. thermosphacta* has not yet been elucidated. Previous works rejected the hypothesis of bacteriocin production (Matamoros et al., 2009a) and pH diminution (Fall et al., 2010a). The current study shows that each strain produces equivalent amounts of lactic acid when their bacterial population is maximal. The same results were observed by Vermeiren et al. (2006a) and Vasilopoulos et al. (2010) when comparing the lactic acid production of protective LAB and *B. thermosphacta* in cooked ham and meat model media. The results of *B. thermosphacta* growth in the presence of lactic acid confirmed that the antagonism of *L. piscium* is not only due to lactic acid production and that nutrient competition may be involved. Indeed, the rapid use of glucose by the *L. piscium* strain in shrimp coincided with the termination of *B. thermosphacta* development. Glucose competition has already been demonstrated in the inhibition of *L. monocytogenes* by a strain of *C. maltaromaticum* (Nilsson et al., 2005). On the other hand, Vermeiren et al. (2006a) claimed that the inhibition between *B. thermosphacta* and *L. sakei* could not be due to glucose consumption since the antagonistic effect was equivalent in model media with both high and low glucose content. Concerning amino acid consumption that was assessed at day 14 when the population level of the two bacteria was stable and the maximal inhibition obtained, the current study shows that, except for isoleucine that is consumed by *B. thermosphacta*, none of the 19 compounds analysed was used by any of the two strains. For *B. thermosphacta* these results are in agreement with those of Laursen et al. (2006) for arginine, ornithine and tyrosine but the consumption of leucine observed in Nordic shrimp stored at 5 °C was not recorded here. However, it is clear that the antagonistic mechanism of *L. piscium* is not linked to a competition for free amino acids. Further studies on nutrient competition for other nutrients such as nucleotides or vitamins are currently in progress in our laboratory, using chemically defined model media. It is not excluded that the quorum sensing phenomenon may also be involved. The inhibition of *B. thermosphacta* may explain the extension of sensory shelf-life of naturally contaminated shrimp observed by Matamoros et al. (2009a). The study of the effect of environmental parameters (MAP, temperature, etc.) influencing the protective effect of *L. piscium* will be also required in order to improve the use of protective cultures in shrimp and other seafood products, in combination with product formulations and processes.

Acknowledgements

The authors are grateful to Frédérique Chevalier for her assistance in experiment preparation.

References

- Al Dagal, M.M., Bazana, W.A., 1999. Extension of shelf life of whole and peeled shrimp with organic acid salts and bifidobacteria. *Journal of Food Protection* 62, 51–56.
- Bartowsky, E.J., 2009. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology* 48, 149–156.
- Castellano, P., González, C., Carduza, F., Vignolo, G., 2010. Protective action of *Lactobacillus curvatus* CRL705 on vacuum-packaged raw beef. Effect on sensory and structural characteristics. *Meat Science* 85, 394–401.
- Connor, M.R., Cann, A.F., Iiao, J.C., 2010. 3-Methyl-1-butanol production in *Escherichia coli*: random mutagenesis and two-phase fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86, 1155–1164.
- Conway, E.J., Byrne, A., 1933. An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances. I. The micro-determination of ammonia. *Biochemical Journal* 27, 419–429.
- Dainty, R.H., Shaw, B.G., Charmagne, D., Harding, C., Michanie, S., 1979. The spoilage of vacuum-packed beef by cold tolerant bacteria. In: Russell, A.D., Fuller, R. (Eds.), *Cold Tolerant Microbes in Spoilage and the Environment*. Academic Press, London, pp. 83–100.
- Dalgaard, P., Jørgensen, L.V., 2000. Cooked and brined shrimps packed in a modified atmosphere have a shelf-life of >7 months at 0 °C, but spoil in 4–6 days at 25 °C. *International Journal of Food Science and Technology* 35, 431–442.
- Dalgaard, P., Vancanneyt, M., Eiras Vilalta, N., Swings, J., Fruekilde, P., Leisner, J.J., 2003. Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0 °C and 25 °C. *Journal of Applied Microbiology* 94, 80–89.
- Diop, M.B., Dubois-Dauphin, R., Destain, J., Tine, E., Thonart, P., 2009. Use of a nisin-producing starter culture of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* to improve traditional fish fermentation in Senegal. *Journal of Food Protection* 72, 1930–1934.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Method for determination of sugars and related substances. *Analyse Chemistry* 28, 350–356.
- Duflos, G., Dervin, C., Malle, P., Bouquelet, S., 1999. Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in plaice (*Pleuronectes platessa*) and whiting (*Merlangius merlangus*). *Journal of AOAC International* 82, 1097–1101.
- Einarsson, H., Lauzon, L., 1995. Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 669–676.
- Fall, P.A., Leroi, F., Cardinal, M., Chevalier, F., Pilet, M.F., 2010a. Inhibition of *Brochothrix thermosphacta* and sensory improvement of tropical peeled cooked shrimp by *Lactococcus piscium* CNCM1-4031. *Letters in Applied Microbiology* 50, 357–361.
- Fall, P.A., Leroi, F., Chevalier, F., Guérin, C., Pilet, M.F., 2010b. Protective effect of a non-bacteriocinogenic *Lactococcus piscium* CNCM 14031 strain against *Listeria monocytogenes* in sterilized tropical cooked peeled shrimp. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 19, 84–92.
- Greer, G.G., Dilts, B.D., 2006. Control of meatborne *Listeria monocytogenes* and *Brochothrix thermosphacta* by a bacteriocinogenic *Brochothrix campestris* ATCC 43754. *Food Microbiology* 23, 785–790.
- Huis in't Veld, J.H.J., 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology* 33, 1–18.
- ISO, International Organization for Standardization, 2003. *Sensory Analysis—Methodology—General Guidance for Establishing a Sensory Profile*. ISO 13299, Geneva, Switzerland.
- Jaffrès, E., Sohier, D., Leroi, F., Pilet, M.F., Prévost, H., Joffraud, J.J., Dousset, X., 2009. Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology* 131, 20–29.
- Jay, J.M., 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology* 44, 525–532.
- Joffraud, J.J., Leroi, F., Roy, C., Berdagué, J.L., 2001. Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* 66, 175–184.
- Jørgensen, L.V., Dalgaard, P., Huss, H.H., 2000. Multiple compound quality index for cold-smoked salmon (*Salmo salar*) developed by multivariate regression of biogenic amines and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2448–2453.
- Larrouette-Thiveyrat, C., Monte, M.C., 2003. Effects of environmental factors on leucine catabolism by *Carnobacterium piscicola*. *International Journal of Food Microbiology* 81, 177–184.
- Laursen, B.G., Leisner, J.J., Dalgaard, P., 2006. *Carnobacterium* species: effect of metabolic activity and interaction with *Brochothrix thermosphacta* on sensory characteristics of modified atmosphere packed shrimp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3604–3611.
- Leroi, F., Vasilopoulos, C., Van Hemelryck, S., Falony, G., De Vuyst, L., 2009. Volatile analysis of spoiled, artisan-type, modified-atmosphere-packaged cooked ham stored under different temperatures. *Food Microbiology* 26, 94–102.
- Matamoros, S., Leroi, F., Cardinal, M., Gigout, F., Chadli, F.K., Cornet, J., Prevost, H., Pilet, M.F., 2009a. Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. *Journal of Food Protection* 72, 365–374.
- Matamoros, S., Pilet, M.F., Gigout, F., Prevost, H., Leroi, F., 2009b. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology* 26, 638–644.
- Mataragas, M., Drosinos, E.H., Metaxopoulos, J., 2003. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4 ± 2 °C. *Food Microbiology* 20, 259–265.
- Mejholm, O., Boknes, N., Dalgaard, P., 2005. Shelf life and safety aspects of chilled cooked and peeled shrimps (*Pandalus borealis*) in modified atmosphere packaging. *Journal of Applied Microbiology* 99, 66–76.
- Mejholm, O., Kjeldgaard, J., Modberg, A., Vest, M.B., Boknes, N., Koort, J., Björkroth, J., Dalgaard, P., 2008. Microbial changes and growth of *Listeria monocytogenes* during chilled storage of brined shrimp (*Pandalus borealis*). *International Journal of Food Microbiology* 124, 250–259.
- Muyzer, G., Dewaal, E.C., Litterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S ribosomal RNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695–700.
- Nilsson, L., Hansen, T.B., Garrido, P., Buchrieser, C., Glaser, P., Knochel, S., Gram, L., Gravesen, A., 2005. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a non-bacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *Journal of Applied Microbiology* 98, 172–183.
- Ogier, J.C., Son, O., Guss, A., Talliez, P., Delacroix-Buchet, A., 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3691–3701.

- Pin, C., García de Fernando, G.D., Ordoñez, J.A., 2002. Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4441–4447.
- Pridmore, R.D., Pittet, A.C., Praplan, F., Cavadini, C., 2008. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-salmonella activity. *FEMS Microbiology Letters* 283, 210–215.
- Sadok, S., Abdelmoula, A., El Abed, A., 2004. Combined effect of sepia soaking and temperature on the shelf life of peeled shrimp *Penaeus kerathurus*. *Food Chemistry* 88, 115–122.
- Smith, L., Mann, J.E., Harris, K., Miller, M.F., Brashears, M.M., 2005. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and salmonella in ground beef using lactic acid bacteria and the impact on sensory properties. *Journal of Food Protection* 68, 1587–1592.
- Stohr, V., Joffraud, J.J., Cardinal, M., Leroi, F., 2001. Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Research International* 34, 797–806.
- Vasilopoulos, C., De Mey, E., Dewulf, L., Paelinck, H., De Smedt, A., Vandendriessche, F., De Vuyst, L., Leroy, F., 2010. Interactions between bacterial isolates from modified-atmosphere-packaged artisan-type cooked ham in view of the development of a bioprotective culture. *Food Microbiology* 27, 1086–1094.
- Vedana-Noguez, M.T., Marine Font, A., Vidal-Carou, M.C., 1997. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2036–2041.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Debevere, J., 2006a. Co-culture experiments demonstrate the usefulness of *Lactobacillus sakei* 10A to prolong the shelf-life of a model cooked ham. *International Journal of Food Microbiology* 108, 68–77.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Vandekinderen, I., Rajtak, U., Debevere, J., 2006b. The sensory acceptability of cooked meat products treated with a protective culture depends on glucose content and buffering capacity: a case study with *Lactobacillus sakei* 10A. *Meat Science* 74, 532–545.

Dans cette étude, l'application de notre méthode HS-SPME-GC-MS permet de bien différencier des produits inoculés par différents micro-organismes à l'aide des composés volatils et de mettre en évidence la bioconservation des crevettes cuites tropicales avec l'aide de l'inoculation de *L. piscium*.

Il a été démontré que *L. piscium* a un pouvoir inhibiteur envers *B. thermosphacta*. Les résultats issus de l'analyse sensorielle confirment le caractère altérant de *B. thermosphacta*, qui arrive à altérer le produit avec une émission de forte odeur de beurre caramel pouvant être liée à la production des molécules suivantes identifiées par HS-SPME-GC-MS : 2,3 butanedione, cyclopentanol, 3-méthylbutanol, 3-méthylbutanal, 2-méthylbutanal, 4-méthyl-3-chloro-3-pentanol, et éthanol. Ces composés volatils sont donc des marqueurs potentiels d'altération de la crevette.

Par ailleurs, lorsque *B. thermosphacta* est co-inoculée avec *L. piscium*, elle n'atteint pas un niveau de population lui permettant d'altérer le produit, il en résulte une amélioration de la qualité organoleptique des crevettes, une inhibition de la production des composés d'altération (cyclopentanol, 3-méthylbutanol, 4-méthyl-3-chloro-3-pentanol et 3-méthylbutanal mis en évidence par HS-SPME-GC-MS) et une extension de leur durée de conservation.

La bioconservation est donc un moyen efficace de conservation des crevettes cuites tropicales et notre méthode HS-SPME-GC-MS est une bonne technique descriptive de différenciation de produits de la pêche.

Conclusions & Perspectives

Les travaux de cette thèse avaient pour objectif de mettre en place une méthode utilisant la HS-SPME-GC-MS, capable de caractériser les composés volatils de la chair du poisson afin d'identifier des marqueurs de qualité (fraicheur et altération) pour aboutir à une proposition de modèle qui prédit un indice de fraicheur.

Les premiers résultats (méthode HS-SPME-GC-MS) obtenus sur la chair de différents poissons sauvages (merlan, maquereau, limande sole, grande vive) avec plusieurs suivis de conservation ont permis d'identifier à l'aide d'une analyse statistique multidimensionnelle une soixantaine de composés volatils. L'**article 1** sur le merlan a montré que parmi l'ensemble des composés volatils identifiés, 39 semblent avoir un rôle de marqueurs potentiels de qualité : le propanal, l'hexanal, le 1-penten-3-ol, le pentanal, le 2,3-pentanedione, le 1-penten-3-one, l'heptanal, le (E)-2-pentenal, le 2,3-octanedione, le (Z)-2-penten-1-ol, le 1-octen-3-ol, le 1-pentanol, le butanal, l'octanal, le 3,5,5-triméthyl-2-hexène, le 1-hexanol, le 4,4-diméthyl-1,3-dioxane, le méthanthiol, le 1-heptanol, le (E)-2-hexenal, le 2-éthyl-1-hexanol, le nonanal, le (E,E)-2,4-heptadiénal, le benzaldéhyde, le 3,5-octadien-2-one, l'éthanol, le 3-méthyl-1-butanol, le 3-méthyl-butanal, le 2-méthyl-1-butanol, le 2-méthyl-1-propanol, le 2,3-butanedione, l'éthylacétate, le limonène, le méthylène chloride, le (Z)-4-heptenal, l'heptane, le 2,4-heptadiénal, le 2-hexanone et le 2-éthylfurane. Ces résultats de la chair du merlan se vérifient sur les 3 autres espèces. La plupart de ces composés volatils (aldéhydes, alcools et cétones) proviennent principalement de l'oxydation des lipides et de la dégradation microbienne.

Ces premiers résultats ont montré la difficulté d'avoir un marqueur unique pouvant servir de référence à la qualité du poisson en général. Il faut considérer un ensemble de composés volatils aromatiques pouvant être des marqueurs associés soit à la fraicheur soit à l'altération.

Ensuite, après l'adaptation sur un nouveau matériel et l'optimisation de la méthode HS-SPME-GC-MS, plus d'une centaine de composés volatils, présents à tous les jours d'analyse et pour toutes les espèces, ont pu être identifiés.

Parallèlement, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'odeur spécifique des composés volatils de la chair du bar commun par DH-GC-MS/80 et DH-GC-GC-MS/O (**article 2**). Au total 144 composés volatils ont été détectés. Cette technique d'extraction « purge and trap » a permis d'extraire un plus grand nombre de composés volatils que la technique « HS-SPME-GC-MS » mais la plupart des composés identifiés sont communs aux deux techniques. Le méthane-thiobis, le thiophène, le toluène coélué avec l'acide butanoïque éthyl ester, l'hexanal, le 1-hexanol, le 1-octen-3-one, le 1-octen-3-ol, le diméthyl-trisulfide, l'octanal, le 1-nonen-3-ol, le (E)-2-nonenal et 2 composés non identifiés ont une odeur significative de la chair du bar commun. Une analyse de variance (ANOVA) des aromagrammes obtenus en DH-GC-MS/80 a été réalisée. En prenant comme variable « la durée de stockage » cette ANOVA a permis de mettre en évidence le thiophène (note de végétaux cuits, d'ail), l'hexanal (note de pomme verte, fruitée), le 1-octen-3-one (note de champignon), le diméthyl-trisulfide (note soufrée) et le 1-nonen-3-ol (odeur de champignon) comme des marqueurs de qualité odorants du bar. Mis à part l'hexanal, ces composés volatils odorants sont intéressants dans notre recherche de marqueurs de qualité du poisson au niveau de l'analyse olfactive. Il est important de souligner que ces composés qui ont un seuil de perception bas sont mis en évidence principalement par l'analyse en olfactométrie alors qu'en spectrométrie de masse ils apparaissent en faible quantité et sont donc difficiles à utiliser. Par contre ces travaux ont montré que le méthane-thiobis, l'hexanal, le 1-hexanol, l'octanal et le (E)-2-nonenal qui ont une odeur caractéristique de la chair du bar commun sont des composés bien détectés au niveau de la spectrométrie de masse et évoluent de la même manière que ce soit en DH-GC-MS ou en HS-SPME-GC-MS. Ces cinq composés ont donc été pris en compte dans la suite de nos travaux.

A la suite de cette étude sur les odeurs, nous avons étudié l'ensemble des composés volatils à la fois sur des poissons entiers mais aussi sur des filets lors de suivis d'altération de 15 jours. Afin d'avoir une garantie sur la qualité initiale des produits, nous avons travaillé principalement sur des poissons d'aquaculture (bar commun, dorade royale, tilapia, filet de cabillaud et de saumon). Nous avons réalisé deux suivis d'altérations sur le bar commun et la dorade royale, un suivi sur le tilapia, le cabillaud, le saumon et le merlan avec des analyses à 1, 4, 7, 10 et 15 jours de stockage à 4°C sous glace. Pour ces six espèces et à chaque jour

d'analyses (1, 4, 7, 10 et 15), la méthode HS-SPME-GC-MS optimisée identifie bien les composés volatils des études précédentes. Des analyses descriptives sur chacune des espèces, utilisant le logiciel SPAD 7 software pour des analyses en composantes principales (ACP), des classifications ascendantes hiérarchiques (CAH), des coupures de l'arbre et une caractérisation des classes de la typologie, toujours en corrélation avec les analyses sensorielles (QIM ou schéma de l'EU) ont permis d'identifier 15 marqueurs de qualité communs à toutes ces espèces quelles que soient leurs formes. Le 2-éthyl-furan, le benzène, le 2-méthyl-furan, le 3-méthyl-butanol, l'éthanol, le carbon-disulfide, le diméthyl-sulfide, l'éthyl-acétate, le 3-méthyl-butanal, le 2-éthyl-1-hexanol, le 2,3-octadione, le chloroforme, le 1-hexanol, le (E,E)3,5-octadien-2-one et le benzèneacétaldehyde sont des marqueurs de qualité communs de ces 6 espèces de poisson. Des analyses prédictives, utilisant le logiciel PASW Statistics 18 pour des régressions linéaires multiples, d'une part sur les poissons entiers et d'autre part sur les filets, permettent d'obtenir 2 modèles qui prédisent un indice de fraîcheur y_i (donc la qualité du poisson et la durée minimale restante de conservation) en relation avec les marqueurs de qualité (**article 3**).

Pour les poissons entiers, le modèle proposé est :

$$y_i = 1,770 + 10,431 [\text{éthanol}] + 106,949 [\text{diméthyl-sulfide}] + 4,415 [\text{carbon-disulfide}] - 1354,390 [2\text{-méthyl-furan}] + 2382,350 [\text{éthyl-acétate}] + 167,989 [\text{chloroforme}] + 10912,273 [3\text{-méthyl-butanal}] - 374,658 [\text{benzène}] - 77,519 [2\text{-éthyl-furan}] + 640,948 [3\text{-méthyl-butanol}] + 269,257 [1\text{-hexanol}] + 414,125 [2,3\text{-octadione}] - 1600,213 [2\text{-éthyl-1-hexanol}] + 47114,155 [\text{benzèneacétaldehyde}] + 1172,167 [(E,E)3,5\text{-octadien-2-one}]$$

Pour les filets de poissons, la proposition d'un modèle est :

$$y_i = 6,827 + 70,013 [\text{éthanol}] + 13,603 [\text{diméthyl-sulfide}] + 8,879 [\text{carbon-disulfide}] - 5690,099 [2\text{-méthyl-furan}] - 557,848 [\text{éthyl-acétate}] + 14394,333 [\text{chloroforme}] - 274,097 [3\text{-méthyl-butanal}] - 959,425 [\text{benzène}] + 3,575 [2\text{-éthyl-furan}] - 395,516 [3\text{-méthyl-butanol}] + 4184,178 [1\text{-hexanol}] + 63,968 [2,3\text{-octadione}] + 1778,127 [2\text{-éthyl-1-hexanol}] + 373,489 [\text{benzèneacétaldehyde}] - 558,991 [(E,E)3,5\text{-octadien-2-one}]$$

Parallèlement à ces travaux, la méthode HS-SPME-GC-MS a pu être appliquée à une autre problématique que la fraîcheur et à une autre matrice que le poisson.

Dans un premier temps, cette méthode a été appliquée pour différencier un poisson frais d'un poisson ayant subi une étape de congélation décongélation. L'analyse des composés volatils de poissons entiers (bar commun et dorade royale) et de filets de poisson (cabillaud et saumon) avec la méthode HS-SPME-GC-MS sur des produits frais et sur des produits congelés au minimum un mois a permis de mettre en évidence 4 composés volatils : l'éthyl-acétate, le 3-méthyl-butanal, le 2-méthyl-butanal et le diméthyl-sulfide qui peuvent permettre de différencier un produit frais d'un produit congelé décongelé. Ces composés sont donc de potentiels marqueurs de congélation du poisson (**article 4**). Ces 4 composés qui sont aussi des marqueurs de qualité (altération) du poisson frais sont quantitativement supérieurs dans un produit ayant été congelé que dans un poisson très altéré.

Dans un second temps, cette méthode a été utilisée pour observer les composés volatils produits sur des crevettes lors d'une étude de bioconservation (**article 5**). La bioconservation vise à prolonger la durée de vie des aliments en maîtrisant la croissance des flores pathogènes ou d'altération par l'utilisation de flores protectrices. Cette étude s'est penchée sur la qualité sensorielle et l'évolution physico-chimique (pH, glucose, acide L-lactique, amines biogènes, acides aminés libres et composés volatils) pendant le stockage à 8°C de crevettes cuites décortiquées inoculées seulement avec la bactérie spécifique d'altération *Brochothrix thermosphacta* et mélangée avec la souche de protection *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 (article 4). Cette étude a confirmé l'effet inhibiteur de *L. piscium* envers *B. thermosphacta* en l'inhibant de 4 log UFC/g et en prolongeant la durée de conservation des crevettes jusqu'à 31 jours de stockage contre 11 jours lorsque les crevettes sont inoculées seulement avec *B. thermosphacta* qui atteint une population de 10^8 UFC/g. L'étude des composés volatils par HS-SPME-GC-MS a permis de mettre en évidence des composés produits par le développement de *B. thermosphacta* : le 2,3-butanedione, le cyclopentanol, le 3-méthyl-butanal, le 2-méthyl-butanal, le 4-méthyl-3-chloro-3-pentanol et l'éthanol. Le jury de l'analyse sensorielle a associé ces molécules aux fortes odeurs de beurre-caramel.

La méthode HS-SPME-GC-MS développée montre tout son intérêt à la fois sur des poissons frais mais aussi sur d'autres matrices et d'autres problématiques que celle de la fraîcheur. La HS-SPME-GC-MS est une très bonne méthode descriptive qui permet à l'aide des composés volatils de bien séparer et identifier des matrices qui ont peu de différences entre elles. Un autre avantage de cette technique est de pouvoir extraire en headspace par la SPME un maximum de composés volatils avec une préparation minimale des échantillons, avec peu d'interférence avec des substances non volatiles, et sans utilisation de solvant. La simplification de ces étapes d'extraction permet aussi de réduire significativement le temps analytique, et l'automatisation de prélèvements permet une meilleure reproductibilité des essais.

La première perspective est la quantification des marqueurs de qualité pour pouvoir mettre en place une méthode de dosage par HS-SPME-GC-MS pour caractériser la qualité du poisson et ce dès les premiers stades d'altération.

En plus de la quantification qui est une perspective à court terme, l'alimentation de la base de données des marqueurs de qualité pour optimiser le modèle de prédiction de la fraîcheur des poissons doit être complétée avec d'autres essais et d'autres espèces.

Une autre perspective est une meilleure connaissance de la production des composés volatils dans cette matrice en réalisant des approches de biologie moléculaire sur les bactéries responsables de l'altération et en faisant le lien avec les composés volatils.

D'autre part la méthode HS-SPME-GC-MS qui est une bonne méthode descriptive pourrait être utilisée pour étudier les produits cuits et les produits transformés (ex : fumés) en analysant les composés volatils néoformés. Cette analyse de composés de fumaison permettrait de déterminer un taux de fumage des produits de la mer.

Pour finir, la perspective la plus ambitieuse est la création d'un système portatif qui contiendrait une fibre SPME pour pouvoir prélever facilement des échantillons à différents endroits (quai de débarquement, étal des poissonneries...). Ceci répondrait à l'objectif initial qui consiste à disposer d'une méthode d'évaluation objective de la fraîcheur permettant des applications aux différents niveaux de la filière.

Bibliographie

A

- Abe, H. and E. Okuma (1991). *Rigor mortis* progress of carp acclimated to different water temperatures. Nippon Suisan Gakkaishi **57**: 2095-2100.
- Ackman, R.G. (1994). Seafood lipid, In Seafoods chemistry, processing technology and quality. Shahidi, F.& Botta, J.R. (Eds.), Blackie Academic & professional, New York: 34-38.
- Aksnes, A. (1989). Effect of proteinase inhibitors from potato on the quality of stored herring. Journal of the Science of Food and Agriculture **49**(2): 225-234.
- Aksnes, A. and B. Brekken (1988). Tissue degradation, amino acid liberation and bacterial decomposition of bulk stored capelin, John Wiley & Sons, Ltd. **45**: 53-60.
- Alasalvar, C. (1994). Factors Affecting the Safety and Quality of Fish during Chill Distribution. 282p
- Alasalvar, C., T. Aishima, and P.C. Quantick (1995). Dynamic headspace analysis of volatile aroma products in fresh and deteriorated mackerel (*Scomber scombrus*). Food Science and Technology International **1**: 125-127.
- Alasalvar, C., K.D. Anthony Taylor, and F. Shahidi (2005). Comparison of volatiles of cultured and wild sea bream (*Sparus aurata*) during storage in ice by dynamic headspace analysis/gas chromatography-mass spectrometry. Journal of agricultural and food chemistry **53**(7): 2616 - 2622.
- Alasalvar, C., P.C. Quantick, and J.M. Grigor (1997). Aroma compounds of fresh and stored mackerel (*Scomber scombrus*). Flavor and Lipid Chemistry of Seafoods (ACS Symposium Series 674). F. Shaidi and K. R. Cadwallader. Washington, DC, American Chemical Society. **674**: 39-54.
- Alasalvar, C., K.D. Taylor, and F. Shahidi (2002). Comparative quality assessment of cultured and wild sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. Journal of agricultural and food chemistry. **50**(7): 2039-2045.
- Alimelli, A., G. Pennazza, M. Santonico, R. Paolesse, D. Filippini, A. D'Amico, I. Lundström, and C. Di Natale (2007). Fish freshness detection by a computer screen photoassisted based gas sensor array. Analytica Chimica Acta **582**(2): 320-328.
- Anderson, D.W.J. and C.R. Fellers (1952). The occurrence of trimethylamine and trimethylamine oxide in fresh water fishes. Food Research **17**: 472-474.
- Arce, L., A. Rios, and M. Valcárcel (1997). Selective and rapid determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis. Chromatographia **46**(3): 170-176.

- Aro, T., C. Brede, P. Manninen, and H. Kallio (2002). Determination of Semivolatile Compounds in Baltic Herring (*clupea harengus membras*) by Supercritical Fluid Extraction - Supercritical Fluid Chromatography - Gas Chromatography - Mass Spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**: 1970-1975.
- Aro, T., R. Tahovonen, L. Koskinen, and H. Kallio (2003). Volatile compounds of Baltic herring analysed by dynamic headspace sampling-gas chromatography-mass spectrometry. European food research and technology **216**(6): 483-488.
- Aubourg, S.P. (2001). Damage detection in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) during chilled storage. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society **78**(8): 857-862.
- Aubourg, S.P. (2001a). Fluorescence study of the pro-oxidant effect of free fatty acids on marine lipids. Journal of the Science of Food and Agriculture **81**(4): 385-390.
- Aubourg, S.P., I. Medina, and J.M. Gallardo (1998). Quality Assessment of Blue Whiting (*Micromesistius poutassou*) during Chilled Storage by Monitoring Lipid Damages. Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**(9): 3662-3666.
- Aubourg, S.P., C.G. Sotelo, and R. Pérez-Martin (1998). Assessment of quality changes in frozen sardine (*Sardina pilchardus*) by fluorescence detection. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society **75**(5): 575-580.
- Audley, M.A., K.J. Shetty, and J.E. Kinsella (1978). Isolation and properties of phospholipase a from pollock muscle. Journal of Food Science **43**(6): 1771-1775.

B

- Baixas-Nogueras, S., S. Bover-Cid, M.C. Vidal-Carou, and M.T. Veciana-Nogues (2001). Volatile and Nonvolatile Amines in Mediterranean Hake as a Function of their Storage Temperature. Food Science **66**(1).
- Barassi, C.A., R.L. Boeri, M. Crupkin, L.A. Davidovich, D.H. Giannini, C.L. Soulé, R.E. Trucco, and H.M. Lupin (1981). The storage life of iced southern blue whiting (*Micromesistius australis*). International Journal of Food Science & Technology **16**(2): 185-197.
- Bechmann, I.E. and B.M. Jørgensen (1998). Rapid Assessment of Quality Parameters for Frozen Cod Using Near Infrared Spectroscopy. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie **31**(7-8): 648-652.
- Beddows, C.G., A.G. Ardeshir, and W.J. Bin Daud (1980). Development and origin of the volatile fatty acids in budu. Journal of the science of food and agriculture **31**: 86-92.
- Bene, A., A. Fornage, J. Luisier, P. Pichler, and J. Villettaz (2001). A New Method for the Rapid Determination of Volatile Substances : the SPME-direct Method part I: Apparatus and Working Conditions. Sensors and Actuators B **72**: 184-187.

- Bene, A., A. Hayman, E. Reynard, J. Luisier, and J. Villettaz (2001a). A New Method for the Rapid Determination of Volatile Substances : the SPME-direct Method part II: Determination of the Freshness of Fish. Sensors and Actuators B **72**: 204-207.
- Berset, C. and M.E. Cuvelier (1996). Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. Sciences des Aliments **16**: 219-245.
- Bianchi, F., C. Cantoni, M. Careri, L. Chiesa, M. Musci, and A. Pinna (2007). Characterization of the aromatic profile for the authentication and differentiation of typical Italian dry-sausages. Talanta **72**(4): 1552-1563.
- Bianchi, F., M. Careri, M. Musci, and A. Mangia (2007). Fish and food safety: Determination of formaldehyde in 12 fish species by SPME extraction and GC-MS analysis. Food Chemistry **100**(3): 1049-1053.
- Bodmer, S., C. Imark, and M. Kneubühl (1999). Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. Inflammation Research **48**(6): 296-300.
- Body, D.R. and P. Vlieg (1989). Distribution of the lipid classes and eicosapentaenoic (20:5) and docosahexaenoic (22:6) acids in different sites in blue mackerel (*Scomber australasicus*) fillets. Journal of Food Science **54**: 569-572.
- Bøknæs, N., K.N. Jensen, C.M. Andersen, and H. Martens (2002). Freshness Assessment of Thawed and Chilled Cod Fillets Packed in Modified Atmosphere Using Near-infrared Spectroscopy. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie **35**(7): 628-634.
- Botta, J.R., Ed. (1995). Evaluation of Seafood Freshness Quality. Cambridge, UK, VCH Publishers Ltd.
- Botta, J.R., K.M. Kennedy, .W. Kiceniuk, and J. Legrow (1992). Importance of redfeed level, fish size and roe content to the quality of roe capelin. International Journal of Food Science & Technology **27**(1): 93-98.
- Boyle, J.L., R.C. Lindsay, and D.A. Stuibler (1993). Occurrence and Properties of Flavor-Related Bromophenols Found in the Marine Environment. Journal of Aquatic Food Product Technology **2**(2): 75-112.
- Bremner, H.A. and I.C. Hallett (1985). Muscle fiber-connective tissue junctions in the blue grenadier (*Macruronus novaezelandiae*). Journal of Food Science **50**: 975-980.
- Burat, K. and O. Bozkurt (1996). Improvement of calibration curve for determining peroxide values of food lipids by the modified ferrous oxidation-xylene orange method. Journal of AOAC International **79**(4): 995-997.
- Burcham, P.C. and Y.T. Kuhan (1996). Introduction of Carbonyl Groups into Proteins by the Lipid Peroxidation Product, Malondialdehyde. Biochemical and Biophysical Research Communications **220**(3): 996-1001.

- Burns, B.G., P.Ke, and B.B. Irvine. (1985). Objective Procedure for Fis Freshness Evaluation Based on Nucleotide Changes Using a PLC System. Canadian Technica Report of Fisheries and Aqua ic Sciences N°1373.
- Burt, J.R., D.M. Gibson, A.C. Jason, and H.R. Sanders (1976). Comparison of methods of freshness assessment of wet fish. International Journal of Food Science & Technology **11**(2): 117-128.
- Buss, H., T.P. Chan, K.B. Sluis, N.M. Domigan, and C.C. Winterbourn (1997). Protein Carbonyl Measurement by a Sensitive ELISA Method. Free Radical Biology and Medicine **23**(3): 361-366.

C

- Cadwallader, K.R. and A.J. Macleod (1998). Instrumental methods for analyzing the flavor of muscle foods. Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods: 355-372.
- Chang, K.L.B., J. Chang, C.Y. Shiau, and B.S. Pan (1998). Biochemical, microbiological, and sensory changes of sea bass (*Lateolabrax japonicus*) under partial freezing and refrigerated storage. Journal of agricultural and food chemistry **46**: 682-686.
- Charvet, S., R. Belabbes, and M. Derbesy (2000). La SPME, une méthode simple et rapide. Application au dosage des eaux de fleur d'oranger. Ann. Fals. Exp. Chim (952): 291-300.
- Chiba, A., M. Hamaguchi, M. Kosaka, T. Tokuno, T. Asai, and S. Chichibu (1991). Quality Evaluation of Fish Meat by 31 Phosphorus-Nuclear Magnetic Resonance, Blackwell Publishing Ltd **56**: 660-664.
- Chinivasagam, H.N., H.A. Bremner, A.F. Wood, and S.M. Nottingham (1998). Volatile Components Associated with Bacterial Spoilage of Tropical Prawns. International Journal of Food Microbiology **42**: 45-55.
- Chung, H.Y. and K.R. Cadwallader (1994). Aroma extract dilution analysis of blue crab claw meat volatiles. Journal of Agricultural and Food Chemistry **42**(12): 2867-2870.
- Colwell, R.R., M.T. Macdonell, and J. De Ley (1986). Proposal to Recognize the Family Aeromonadaceae fam. nov. International Journal of Systematic Bacteriology **36**(3): 473-477.
- Conway, E.J. (1947). Microdiffusion analysis and volumetric error. Crosby Lockwood and Sons. London, U.K.
- Corongiu, F.P., S. Banni, and P. Lester (1994). Detection of conjugated dienes by second derivative ultraviolet spectrophotometry. Methods in Enzymology, Academic Press **233**: 303-310.
- Corraze, G. and S. Kaushik (1999). Les lipides des poissons marins et d'eau douce. Oléagineux, Corps gras, Lipides **6**(1): 111-115.

Cozzolino, D., I. Murray, A. Chree, and J.R. Scaife (2005). Multivariate determination of free fatty acids and moisture in fish oils by partial least-squares regression and near-infrared spectroscopy. LWT - Food Science and Technology **38**(8): 821-828.

D

Da Silva, M.V., O. Pinho, I. Ferreira, L. Plestilová, and P.A. Gibbs (2002). Production of histamine and tyramine by bacteria isolated from Portuguese vacuum-packed cold-smoked fish. Food Control **13**(6-7): 457-461.

Dalgaard, P. (1993). Evaluation and prediction of microbial fish spoilage. Ph.D. Thesis. The Technological Laboratory of the Danish Ministry of Fisheries and the Royal Veterinary and Agricultural University. Denmark.

Dalgaard, P. (2000). Fresness, Quality and safety in seafoods. Flair-Flow Europe, Technical Manual, F-FE 380A/00.

Davis, H.K. (1982). Fluorescence of fish muscle: Description and measurement of changes occurring during frozen storage. John Wiley & Sons, Ltd **33**: 1135-1142.

De Koning, A.J. and T.H. Mol (1990). Rates of free fatty acid formation from phospholipids and neutral lipids in frozen cape hake (*Merluccius* spp) mince at various temperatures. Journal of the Science of Food and Agriculture **50**(3): 391-398.

Decker, E.A. and H.O. Hultin (1990). Nonenzymic Catalysts of Lipid Oxidation in Mackerel Ordinary Muscle. Journal of Food Science **55**(4): 951-953.

Decker, E.A. and Z. Xu (1998). Minimizing rancidity in muscle food. Food technology **52**: 54-61.

Delbarre-Ladrat, C., V. Verrez-Bagnis, J. Noël, and J. Fleurence (2004). Relative contribution of calpain and cathepsins to protein degradation in muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Food Chemistry **88**(3): 389-395.

Devaraju, A.N. and T.M.R. Setty (1985). Comparative study of fish bacteria from tropical and cold/temperate marine waters. Spoilage of tropical fish and product development. FAO Fisheries Report.

Dhaouadi, A., L. Monser, S. Sadok, and N. Adhoum (2007). Validation of a flow-injection-gas diffusion method for total volatile basic nitrogen determination in seafood products. Food Chemistry **103**(3): 1049-1053.

Di Natale, C., J.A.J. Brunink, F. Bungaro, F. Davide, A. D'amico, R. Paolesse, T. Boschi, M. Faccio, and G. Ferri (1996). Recognition of fish storage time by a metalloporphyrins-coated QMB sensor array. Measurement Science and Technology **7**: 1103-1114.

- Di Natale, C., G. Olafsdottir, S. Einarsson, E. Martinelli, R. Paolesse, and A. D'Amico (2001). Comparison and Integration of Different Electronic Noses for Freshness Evaluation of Cod-Fish Fillets. Sensors and Actuators B **72**: 572-578.
- Dobarganes, M.C. and J. Velasco (2002). Analysis of lipid hydroperoxides. European Journal of Lipid Science and Technology **104**(7): 420-428.
- Downey, G. (1996). Non-invasive and non-destructive percutaneous analysis of farmed salmon flesh by near infra-red spectroscopy. Food Chemistry **55**(3): 305-311.
- Duflos, G., V.M. Coin, M. Cornu, J.-F. Antinelli, and P. Malle (2006). Determination of volatile compounds to characterize fish spoilage using headspace/mass spectrometry and solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry. Journal of Science of Food and Agriculture **86**: 600-611.
- Duflos, G., F. Moine, V.M. Coin, and P. Malle (2005). Determination of volatile compounds in Whiting (*Merlangius merlangus*) using headspace-solid-phase-microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatographic Science **43**: 277-332.
- Dufour, E., J.P. Frencia, and E. Kane (2003). Development of a rapid method based on front-face fluorescence spectroscopy for the monitoring of fish freshness. Food Research International **36**(5): 415-423.
- Durnford, E. and F. Shahidi (1998). Flavour of fish meat. Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods: 131-158.
- Dyer, W.J. and D.I. Fraser (1959). Proteins in Fish Muscle. 13. Lipid Hydrolysis. Journal of Fisheries Research Board of Canada **16**: 43-52.

E

- Edirisinghe, R.K.B., A.J. Graffham, and S.J. Taylor (2007). Characterisation of the volatiles of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) during storage by solid phase microextraction and GC-MS and their relationship to fish quality parameters. International Journal of Food Science and Technology **42**(10): 1139-1147.
- El Barbri, N., A. Amari, M. Vinaixa, B. Bouchikhi, X. Correig, and E. Llobet (2007). Building of a metal oxide gas sensor-based electronic nose to assess the freshness of sardines under cold storage. Sensors and Actuators, B: Chemical **128**(1): 235-244.

F

- Feier, U. and P.H. Goetsch (1993). Inter-laboratory studies on precision characteristics of analytical methods. Determination of biogenic amines in fish and fish products - HPLC method. Archiv für Lebensmittelhygiene **44**(6): 134-135.

Frankel, E.N. (1993). Formation of headspace volatiles by thermal decomposition of oxidized fish oils vs. oxidized vegetable oils. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society **70**(8): 767-772.

Frankel, E.N. (1998). Lipid oxidation. The Oily Press (vol. 10). Dundee, Scotland.

Frankel, E.N., W.E. Neff, D. Weisleder, and A.N.G. Lester Packer (1990). Determination of methyl linoleate hydroperoxides by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. Methods in Enzymology **186**: 380-387.

Fujioka, R.S., K. Tenno, and S. Kansako (1988). Naturally occurring fecal coliforms and fecal streptococci in Hawaii's freshwater streams. Toxicity Assessment **3**(5): 613-630.

G

Gardner, H.W. (1979). Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: a review. Journal of Agricultural and Food Chemistry **27**: 220-229.

Garthwaite, G.A. (1992). Chilling and freezing of fish In Fish Processing Technology. Hall, G.M. (Ed.). Blackie Academic & Professional, New York: 89-113.

Gelman, A., V. Drabkin, and L. Glatman (2003). A rapid non-destructive method for fish quality control by determination of smell intensity. Journal of the science of food and agriculture **83**(6): 580 - 585.

German, J.B., S.E. Chen, and J.E. Kinsella (1985). Lipid oxidation in fish tissue. Enzymic initiation via lipoxygenase. Journal of Agricultural and Food Chemistry **33**(4): 680-683.

Gill, T.A. (1990). Objective analysis of sea food quality. Food Reviews International **6**: 681-714.

Gill, T.A. (1992). Biochemical and chemical indices of seafood quality. Quality Assurance in the Fish Industry. Elsevier, Amsterdam.

Gill, T.A., J. Conway, and J. Evrovski (1992). Changes in fish muscle proteins at high and low temperature. Advances in seafood biochemistry-composition and quality. G.J. Flick and R.E. Martin. Lancaster, Pennsylvania, Technomic Publishing: 213-231.

Gill, T.A., R.A. Keith, and B.S. Lall (1979). Textural deterioration of red hake and haddock muscle in frozen storage as related to chemical parameters and changes in the myofibrillar proteins. Journal of Food Science **44**(3): 661-667.

Gill, T.A., J.W. Thompson, S. Gould, and D. Sherwood (1987). Characterization of Quality Deterioration in Yellowfin Tuna, Blackwell Publishing Ltd. **52**: 580-583.

Girard, B. and T. Durance (2000). Headspace volatiles of sockeye and pink salmon as affected by retort process. Journal of Food Science **65**(1): 34-39.

- Girard, B. and S. Nakai (1991). Static headspace gas chromatographic method for volatiles in canned salmon. Journal of Food Science **56**(5): 1271-1274.
- Gram, L. (1990). Spoilage of three Senegalese fish species stored in ice and at ambient temperature. Paper presented at SEAFOOD 2000. Halifax, Canada.
- Gram, L. and P. Dalgaard (2002). Fish spoilage bacteria - problems and solutions. Current Opinion in Biotechnology **13**(3): 262-266.
- Gram, L., G. Trolle, and H.H. Huss (1987). Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. International Journal of Food Microbiology **4**(1): 65-72.
- Gram, L., C. Wedell-Neergaard, and H.H. Huss (1990). The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). International Journal of Food Microbiology **10**(3-4): 303-316.
- Gray, J. (1978). Measurement of lipid oxidation: A review. Journal of the American Oil Chemists' Society **55**(6): 539-546.
- Greaser, M.L. and A.M. Pearson (1999). Flesh foods and their analogues. In: Food texture measurement and perception. A. J. Rosenthal. Aspen Publication, Gaithersburg: 236-246.
- Grün, I.U., W.E. Barbeau, and J.B. Crowther (1996). Changes in headspace volatiles and peroxide values of undeodorized menhaden oil over 20 weeks of storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry **44**(5): 1190-1194.
- Guillén, M.D. and N. Cabo (1997). Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats. Journal of the Science of Food and Agriculture **75**(1): 1-11.
- Guillén, M.D. and M. C. Errecalde (2002). Volatile Components of Raw and Smoked Black Bream (*Brama raii*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) studied by means of Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography/mass Spectrometry. Journal of the Science of Food and Agriculture **82**: 945-952.

H

- Haard, N. (2002). The role of enzymes in determining seafood color, flavor and texture. In: Safety and quality issues in fish processing H.A. Bremner. Cambridge, UK, Woodhead Publishing in Food Science and Technology: 221-254.
- Han, T.J. and J. Liston (1987). Lipid Peroxidation and Phospholipid Hydrolysis in Fish Muscle Microsomes and Frozen Fish. Journal of Food Science **52**(2): 294-296.
- Hasegawa, K., Y. Endo, and K. Fujimoto (1992). Oxidative Deterioration in Dried Fish Model Systems Assessed by Solid Sample Fluorescence Spectrophotometry, Blackwell Publishing Ltd. **57**: 1123-1126.

- Hattula, T., T. Luoma, R. Kostiaainen, J. Poutanen, M. Kallio, and P. Suuronen (1995). Effects of catching method on different quality parameters of Baltic herring (*Clupea harengus* L.). Fisheries Research **23**(3-4): 209-221.
- Haugen, J.E., E. Chanie, F. Westad, R. Jonsdottir, S. Bazzo, S. Labreche, P. Marcq, F. Lundby, and G. Olafsdottir (2006). Rapid control of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) quality by electronic nose: Correlation with classical evaluation methods. Sensors and Actuators B: Chemical **116**(1-2): 72-77.
- Heath, H.B. and G. Reineccius (1986). Off-flavors in foods. Flavor Chemistry and Technology: 121-127.
- Hebard, C.E., G.J. Flick, and R.E. Martin (1982). Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shellfish. Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products: 149-304.
- Hermes-Lima, M., W.G. Willmore, and K.B. Storey (1995). Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. Free Radical Biology & Medicine **19**: 271-280.
- Hjelmeland, K., M. Christie, and J. Raa (1983). Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance. Journal of Fish Biology **23**(1): 13-22.
- Hognadottir, A. (1999). Flavor Perception and volatile Compounds in Fish.
- Howgate, P. (2005). Kinetics of degradation of adenosine triphosphate in chill-stored rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). International Journal of Food Science & Technology **40**(6): 579-588.
- Hsieh, R.J., J.B. German, and J.E. Kinsella (1988). Lipoxygenase in fish tissue: some properties of the 12-lipoxygenase from trout gill. Journal of Agricultural and Food Chemistry **36**(4): 680-685.
- Hsieh, R.J., J.E. Kinsella, and E.K. John (1989a). Oxidation of Polyunsaturated Fatty Acids: Mechanisms, Products, and Inhibition with Emphasis on Fish. Advances in Food and Nutrition Research **33**: 233-341.
- Hsieh, R.J. and J.E. Kinsella (1989b). Lipoxygenase generation of specific volatile flavor carbonyl compounds in fish tissues. Journal of Agricultural and Food Chemistry **37**(2): 279-286.
- Hsieh, T.C., S.S. Williams, W. Vejaphan, and S.P. Meyers (1989). Characterization of volatile components of menhaden fish (*Brevoortia tyrannus*) oil. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society **66**(1): 114-117.
- Huang, C.H., H.O. Hultin, and S.S. Jafar (1993). Some aspects of iron(2+)-catalyzed oxidation of fish sarcoplasmic reticular lipid. Journal of Agricultural and Food Chemistry **41**(11): 1886-1892.

Hughes, R.B. and N.R. Jones (1966). Measurement of hypoxanthine concentration in canned herring as an index of the freshness of the raw material, with a comment on flavour relations, John Wiley & Sons, Ltd **17**: 434-436.

Hultin, H.O. (1992). Lipid Oxidation in Fish Muscle. In Advances in seafood biochemistry: Composition and quality Flick, G.J. & Martin, R.E. (Eds.), Technomics Publishing Company Inc, Lancaster: 99-122.

Hultin, H.O. (1994). Oxidation of lipids in seafoods. Seafoods: Chemistry, Processing, Technology and Quality. Shahidi, F. & Botta, J.R. (Eds), Blackie Academic & Professional. New York: 49-74.

Huss, H. (1994). Assurance of Seafood Quality. FAO Fisheries Technical Paper **334**: FAO Rome

Huss, H.H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. Rome, FAO. **195**

Hwang, D.F., S.H. Chang, C.-Y. Shiu, and C. Tuu-ji (1997). High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications **693**(1): 23-30.

Hwang, K.T. and J.M. Regenstein (1993). Characteristics of Mackerel Mince Lipid Hydrolysis. Journal of Food Science **58**(1): 79-83.

I

Iglesias, J. and I. Medina (2008). Solid-phase microextraction method for the determination of volatile compounds associated to oxidation of fish muscle. Journal of Chromatography A **1192**(1): 9-16.

Iwamoto, M., H. Yamanaka, S. Watabe, and K. Hashimoto (1987). Effect of Storage Temperature on Rigor-Mortis and ATP Degradation in Plaice *Paralichthys olivaceus* Muscle, Blackwell Publishing Ltd. **52**: 1514-1517.

J

Jason, A.C. and J.C.S. Richards (1975). The development of an electronic fish freshness meter Journal of Physics E: Scientific Instruments **8**: 826-830.

Jensen, B., H.H.F. Refsgaard, and G. Olafsdottir (1997). Headspace and Extraction Methods for Analysis of Volatile and Semivolatile Compounds in Fish. Proceeding of the final meeting of the concerted action Evaluation of fish freshness AIR3CT94 2283, Nantes (France).

Jiang, Z.Y., A.C. Woollard, and S.P. Wolff (1991). Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. Lipids **26**(10): 853-856.

- Jonsdottir, R., G. Olafsdottir, E. Chanie, and J.E. Haugen (2008). Volatile compounds suitable for rapid detection as quality indicators of cold smoked salmon (*Salmo salar*). Food Chemistry **109**(1): 184-195.
- Jonsdottir, R., G. Olafsdottir, E. Martinsdottir, and G. Stefansson (2004). Flavor characterization of ripened cod roe by gas chromatography, sensory analysis, and electronic nose. Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(20): 6250-6256.
- Jorgensen, L.V., H.H. Huss, and P. Dalgaard (2001). Significance of Volatile compounds produced by Spoilage Bacteria in vacuum-Packed Cold-Smoked Salmon (*Salmo salar*) Analyzed by GC-MS and Multivariate Regression. Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**: 2376-2381.
- Josephson, D. (1991). Seafood. Volatils compounds in food and beverages. Maarse H., Marcel decker Inc: 179-204.
- Josephson, D.B. and R.C. Lindsay (1986). Enzymic Generation of Volatile Aroma Compounds from Fresh Fish. Biogeneration of aroma in ACS Symporium Series **317**: 201-219.
- Josephson, D.B., R.C. Lindsay (1986b). Measurement of volatile aroma constituents as a means for following sensory deterioration of fresh fish and fishery products. Proceedings of an international symposium on quality determinations.
- Josephson, D.B., R.C. Lindsay (1983). Identification of Compounds Characterizing the Aroma of Fresh Whitefish (*Coregonus clupeaformis*). Journal of Agricultural and Food Chemistry **31**: 326-330.
- Josephson, D.B., R.C. Lindsay, and D.A. Stuibler (1984). Variations in the Occurrences of Enzymically Derived Volatile Aroma Compounds in salt and freshwater Fish. Journal of Agricultural and Food Chemistry **32**(6): 1347-1352.

K

- Kaewsritthong, J., H. Ushio, and T. Ohshima (2001). Seasonal variation of phosphatidylcholine hydroperoxides in blood of sweet smelt *Plecoglossus altivelis*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **130**(1): 33-42.
- Kamal-Eldin, A. and N.V. Yanishlieva (2002). N-3 fatty acids for human nutrition: Stability considerations. European Journal of Lipid Science and Technology **104**(12): 825-836.
- Kanazawa, A., T. Sawa, T. Akaik, and H. Maeda (2000). Formation of abasic sites in DNA by t-butyl peroxy radicals: implication for potent genotoxicity of lipid peroxy radicals. Cancer Letters **156**: 51-55.
- Kanner, J., J.B. German, J.E. Kinsella, and H.O. Hultin (1987). Initiation of lipid peroxidation in biological systems. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition **25**(4): 317-364.

- Karahadian, C. and R.C. Lindsay (1989). Evaluation of compounds contributing characterizing fishy flavors in fish oils. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society **66**(7): 953-960.
- Karube, I., H. Matsuoka, S. Suzuki, E. Watanabe, and K. Toyama (1984). Determination of Fish Freshness with an Enzyme Sensor System. Journal of Agricultural and Food Chemistry **32**: 314-319.
- Kawabata, T. (1953). Studies on the trimethylamine oxide-reductase. 1. Reduction of trimethylamine oxide in the dark muscle of pelagic migrating fish under aseptic conditions. Bulletin of the Japanese Society Scientific Fisheries **19**: 505-512.
- Kawai, T. (1996). Fish Flavor. Critical Reviews in Food Science and Nutrition **36**(3): 257-298.
- Kennish, J.M. and D.E. Kramer (1987). A Review of High-Pressure Liquid Chromatographic Methods for Measuring Nucleotide Degradation in Fish Muscle. Seafood Quality Determination, Developments in Food Science. D. E. Kramer and J. Liston. New York. **15**, 209.
- Khodabux, K., M.S.S. L'Omelette, S. Jhaumeer-Laulloo, P. Ramasami, and P. Rondeau (2007). Chemical and near-infrared determination of moisture, fat and protein in tuna fishes. Food Chemistry **102**(3): 669-675.
- Klein, R. A. (1970). The detection of oxidation in liposome preparations. Biochimica et biophysica acta **210**(3): 486-9.
- Klimankova, E., K. Riddellova, J. Hajslova, J. Poustka, J. Kolarova, and V. Kocourek (2008). Development of an SPME-GC-MS/MS procedure for the monitoring of 2-phenoxyethanol in anaesthetised fish. Talanta.
- Koskas, J.P., J. Cillard, and P. Cillard (1983). Direct high-performance liquid-chromatographic separation of hydroperoxide isomers of linoleic acid. Journal Chromatography **258**: 280-283.
- Krzynowek, J., J. Murphy, E. Pariser, and A. Clifton (1990). Six Northwest Atlantic Finfish Species as a Potential Fish Oil Source, Blackwell Publishing Ltd. **55**: 1743-1744.
- Kuda, T., M. Fujita, H. Goto, and T. Yano (2007). Effects of freshness on ATP-related compounds in retorted chub mackerel *Scomber japonicus*. LWT - Food Science and Technology **40**(7): 1186-1190.
- Kyranas, V.R. and V.P. Lougovois (2002). Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. International Journal of Food Science & Technology **37**(3): 319-328.

L

- Ladikos, D. and V. Lougovois (1990). Lipid oxidation in muscle foods: a review. Food Chemistry **35**: 295-314.
- Larsen, J., N. Jensen, and N. Christensen (1978). Water pollution and the ulcer syndrome in the cod (*Gadus morhua*). Veterinary Research Communications **2**(1): 207-216.
- Levine, R.L., D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, S. Shaltiel, and E.R. Stadtman (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods in Enzymology **186**: 464-478.
- Lin, D.S. and W.E. Connor (1990). Are the n-3 fatty acids from dietary fish oil deposited in the triglyceride stores of adipose tissue. American Journal of Clinical Nutrition **51**(4): 535-539.
- Lindsay, R.C. (1990). Fish flavors. Food Reviews International **6**(4): 437-455.
- Lindsay, R.C., D.B. Josephson, and G. Olafsdottir (1986). Chemical and biochemical indices for assessing the quality of fish packaged in controlled atmospheres. Seafood Quality Determination, Proceedings of an International Symposium (University of Alaska Sea Grant Program, Anchorage, Alaska). D. E. Kramer and J. Liston. Amsterdam, Elsevier Science Publishers. **15**: 221-234.
- Liston, J. (1980). Microbiology in fishery science. Advances in fishery science and technology. J.J. Connell. Farnham, England, Fishing News Books Ltd: 138-157.
- Lougovois, V.P., E.R. Kyranas, and V.R. Kyrana (2003). Comparison of selected methods of assessing freshness quality and remaining storage life of iced gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Food Research International **36**(6): 551-560.
- Love, R.M. (1975). Variability in Atlantic Cod (*Gadus morhua*) from the Northeast Atlantic: a Review of Seasonal and Environmental Influences on Various Attributes of the Flesh. Journal of the Fisheries Research Board of Canada **32**(12): 2333-2342
- Lowry, R. and I. Tinsley (1976). Rapid colorimetric determination of free fatty acids. Journal of the American Oil Chemists' Society **53**(7): 470-472.
- Lundstrom, R.C. (1980). Fish species identification by thin layer polyacrylamide gel isoelectric focusing Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **63**: 69-73.
- Lundstrom, R.C., F.F. Correia, and K.A. Wilhelm (1982). Enzymatic dimethylamine and formaldehyde production in minced American plaice and blackback flounder mixed with a red hake TMAO-ase active fraction. Journal of Food Science **47**: 1305-1310.
- Luong, J.H.T., K.B. Male, and M.D. Huynh (1991). Applications of Polarography for Assessment of Fish Freshness, Blackwell Publishing Ltd **56**: 335-337.

- Luong, J.H.T., K.B. Male, C. Masson, and A.L. Nguyen (1992). Hypoxanthine Ratio Determination in Fish Extract Using Capillary Electrophoresis and Immobilized Enzymes, Blackwell Publishing Ltd **57**: 77-81.
- Luong, J.H.T. and K.N. Male (1992). Development of a new biosensor system for the determination of the hypoxanthine ratio, an indicator of fish freshness. Enzyme and Microbial Technology **14**(2): 125-130.
- Lupin, H.M., D.H. Giannini, C.L. Soule, L.A. Davidovich, and R.L. Boeri (1980). Storage life of chilled Patagonian hake (*Merluccius hubbsi*). International Journal of Food Science & Technology **15**(3): 285-300.

M

- Maage, A., K. Julshamn, and Y. Ulgenes (1991). A comparison of tissue levels of four essential trace elements in wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fiskeridir. Skr., Ser. Ernaering, IV: 111-116.
- MacDonnell, M.T. and R.R. Colwell (1985). Phylogeny of the Vibrionaceae and recommendation for two new genera, Listonella and Shewanella. Systematic & Applied Microbiology **6**: 171-182.
- Mackie, I.M., L. Pirie, A.H. Ritchie, and H. Yamanaka (1997). The formation of non-volatile amines in relation to concentrations of free basic amino acids during postmortem storage of the muscle of scallop (*Pecten maximus*), herring (*Clupea harengus*) and mackerel (*Scomber scombrus*). Food Chemistry **60**(3): 291-295.
- Malle, P., M. Valle, P. Eb, and R. Tailliez (1998). Optimization of culture conditions for enumeration of H₂S⁺ bacteria in the flesh of seafish. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology **6**: 129-142.
- Malle, P. and M. Poumeyrol (1989). A new chemical criterion for the quality control of fish: Trimethylamine/Total Volatile Basic Nitrogen (%). Journal of Food Protection. **52**: 419-423.
- Malle, P., M. Valle, and S. Bouquelet (1996). Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society **79**(1): 43-49.
- Marsili, R.T. (1999). Comparison of Solid-Phase Microextraction and Dynamic Headspace Methods for the Gas Chromatographic-Mass Spectrophotometric Analysis of Light-Induced Lipid Oxidation Products in Milk. Journal of Chromatography Science **37**(1): 17-23.
- Marsili, R.T. (2000). Shelf-Life Prediction of Processed Milk by Solid-Phase Microextraction, Mass Spectrometry, and Multivariate Analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**: 3470-3475.

- McGill, A.S., R. Hardy, and F.D. Gunstone (1977). Further analysis of the volatile components of frozen cold stored cod and the influence of these on flavour. Journal of the Science of Food and Agriculture **28**(1): 200-205.
- Medina, I., M. Satué-Gracia, and E. Frankel (1999). Static headspace gas chromatographic analyses to determine oxidation of fish muscle lipids during thermal processing. Journal of the American Oil Chemists' Society **76**(2): 231-236.
- Mendel, B., A. Kemp, and D.K. Myers (1954). A colorimetric micro-method for the determination of glucose. Biochemical Journal **56**(4): 639-646.
- Mietz, J.L. and E. Karmas (1977). Chemical quality index of canned tuna as determined by High-Pressure Liquid Chromatography, Blackwell Publishing Ltd **42**: 155-158.
- Miller III, A., R.A. Scanlan, J.S. Lee, and L.M. Libbey (1973). Identification of the volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas fragi*. Journal of Applied Microbiology **25**(6): 952-955.
- Miller III, A., R.A. Scanlan, J.S. Lee, L.M. Libbey, and M.E. Morgan (1973). Volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas perolens*. Journal of Applied Microbiology **25**: 257-261.
- Milo, C. and W. Grosch (1996). Changes in the Odorants of Boiled Salmon and Cod As Affected by the Storage of the Raw Material. Journal of Agricultural and Food Chemistry **44**(8): 2366-2371.
- Mitsubayashi, K., Y. Kubotera, K. Yano, Y. Hashimoto, T. Kon, S. Nakakura, Y. Nishi, and H. Endo (2004). Trimethylamine biosensor with flavin-containing monooxygenase type 3 (FMO3) for fish-freshness analysis. Sensors and Actuators B: Chemical **103**(1-2): 463-467.
- Moret, S. and L.S. Conte (1996). High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods an analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. Journal of Chromatography A **729**(1-2): 363-369.
- Morita, R.Y. (1975). Psychrophilic bacteria. Bacteriological reviews **39**: 144-167.
- Morrow, J.D., G.R. Margolies, J. Rowland, and L.J. Roberts (1991). Evidence That Histamine Is the Causative Toxin of Scombroid-Fish Poisoning. New England Journal of Medicine **324**(11): 716-720.
- Morzel, M. and H. Van De Vis (2003). Effect of the slaughter method on the quality of raw and smoked eels (*Anguilla anguilla* L.), Blackwell Science Ltd **34**: 1-11.
- Muramoto, M., Y. Yamamoto, and N. Seki (1989). Comparison of calpain of various fish myosins in relation to their thermal stabilities. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. **55**: 917-923.

Murata, M. and M. Sakaguchi (1986). Storage of Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) White and Dark Muscles in Ice: Changes in Content of Adenine Nucleotides and Related Compounds. Blackwell Publishing Ltd **51**: 321-326.

Murray, C.K. and T.C. Fletcher (1976). The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. Journal of Fish Biology **9**(4): 329-334.

N

Nakamura, K., H. Iida, and T. Tokunaga (1980). Separation and identification of odor in oxidized sardine oil. Bulletin of the Japanese Society Scientific Fisheries **46**: 355-360.

Nielsen, M.K. and B.M. Jorgensen (2004). Quantitative Relationship between Trimethylamine Oxide Aldolase Activity and Formaldehyde Accumulation in White Muscle from Gadiform Fish during Frozen Storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(12): 3814-3822.

Nilsen, H. and M. Esaiassen (2005). Predicting sensory score of cod (*Gadus morhua*) from visible spectroscopy. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie **38**(1): 95-99.

Nortvedt, R., O.J. Torrissen, and S. Tuene (1998). Application of near-infrared transmittance spectroscopy in the determination of fat, protein and dry matter in Atlantic halibut fillet. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems **42**(1-2): 199-207.

Nunes, M.L., I. Batista, and R.M. De Campos (1992). Physical, chemical and sensory analysis of sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice. Journal of the Science of Food and Agriculture **59**(1): 37-43.

Nunes, M.L., M. Cardinal, R. Mendes, R.M. Campos, N.M. Bandarra, H. Lourenço, and M. Jerome (1992) Effect of season and storage on proteins and lipids of sardine (*Sardina pilchardus*) minces and surimi. In Quality Assurance in the Fish Industry: 73-79.

O

Olafsdottir, G. and J. Fleurence (1997). Evaluation of fish freshness using volatile compounds-classification of volatile compounds in fish. Methods to determine the freshness of fish in research and industry, proceedings of the final meeting of the concerted action Evaluation of fish freshness AIR3CT94 2283, Nantes (France).

Olafsdottir, G., A. Hognadottir, E. Martinsdottir, and H. Jonsdottir (2000). Application of an Electronic Nose To Predict Total Volatile Bases in Capelin (*Mallotus villosus*) for Fishmeal Production. Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**(6): 2353-2359.

Olafsdottir, G., R. Jonsdottir, H.L. Lauzon, J. Luten, and K. Kristbergsson (2005). Characterization of volatile compounds in chilled cod (*Gadus morhua*) fillets by gas chromatography and detection of quality indicators by an electronic nose. Journal of agricultural and food chemistry **53**(26): 10140-10147.

- Olafsdottir, G., H.L. Lauzon, E. Martinsdottir, and K. Kristbergsson (2006). Influence of storage temperature on microbial spoilage characteristics of haddock fillets (*Melanogrammus aeglefinus*) evaluated by multivariate quality prediction. International Journal of Food Microbiology **111**(2): 112-125.
- Olafsdottir, G., H.L. Lauzon, E. Martinsdóttir, J. Oehlenschläger, and K. Kristbergsson (2006b). Evaluation of Shelf Life of Superchilled Cod (*Gadus morhua*) Fillets and the Influence of Temperature Fluctuations During Storage on Microbial and Chemical Quality Indicators. Journal of Food Science **71**(2): S97-S109.
- Olafsdottir, G., X. Li, H.L. Lauzon, and R. Jonsdottir (2002). Precision and application of electronic nose for freshness monitoring of whole redfish (*Sebastes marinus*) stored in ice and modified atmosphere bulk storage. Journal of Aquatic Food Product Technology **11**(3-4): 229-249.
- Olafsdottir, G., E. Martinsdottir, and E.H. Jonsson (1997). Gas sensor and GC measurements of volatile compounds in capelin (*Mallotus villosus*). In Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality. Eds. Luten, J.B., Børresen, T. and Oehlenschläger, J. Amsterdam, Elsevier: 507-520.
- Olafsdottir, G., E. Martinsdottir, and E.H. Jonsson (1997). Rapid Gas Sensor Measurements To Determine Spoilage of Capelin (*Mallotus villosus*). Journal of Agricultural and Food Chemistry **45**(7): 2654-2659.
- Olafsdóttir, G., E. Martinsdóttir, J. Oehlenschläger, P. Dalgaard, B. Jensen, I. Undeland, I.M. Mackie, G. Henehan, J. Nielsen, and H. Nilsen (1997). Methods to evaluate fish freshness in research and industry. Trends in Food Science & Technology **8**(8): 258-265.
- Olafsdottir, G., E. Martinsdottir, P. Oehlenschläger, P. Dalgaard, B. Jensen, I. Undeland, I.M. Mackie, G. Henehan, J. Nielsen, and H. Nilsen (1997). Freshness assessments of Moroccan sardine (*Sardina pilchardus*): comparison of overall sensory changes to instrumentally determined volatiles. Trends in Food Science and Technology **8**: 258-265.
- Özogul, F. and Y. Özogul (2006). Biogenic amine content and biogenic amine quality indices of sardines (*Sardina pilchardus*) stored in modified atmosphere packaging and vacuum packaging. Food Chemistry **99**(3): 574-578.
- Özogul, F., K.D.A. Taylor, P. Quantick, and Y. Özogul (2002). Biogenic amines formation in Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored under modified atmosphere packaging using a rapid HPLC method. International Journal of Food Science & Technology **37**(5): 515-522.
- Özogul, Y., F. Özogul, E. Kuley, A.S. Özkutuk, C. Gökbulut, and S. Köse (2006). Biochemical, sensory and microbiological attributes of wild turbot (*Scophthalmus maximus*), from the Black Sea, during chilled storage. Food Chemistry **99**(4): 752-758.

Özogul, Y., G. Özyurt, F. Özogul, E. Kuley, and A. Polat (2005). Freshness assessment of European eel (*Anguilla anguilla*) by sensory, chemical and microbiological methods. Food Chemistry **92**(4): 745-751.

P

Pacquit, A., K.T. Lau, H. McLaughlin, J. Frisby, B. Quilty, and D. Diamond (2006). Development of a volatile amine sensor for the monitoring of fish spoilage. Talanta **69**(2): 515-520.

Parkin, K.L. and H.O. Hultin (1986). Partial purification of trimethylamine-N-oxide (TMAO) demethylase from crude fish muscle microsomes by detergents. Journal of Biochemistry **100**: 87-97.

Pawliszyn, J. (2000). Theory of Solid-Phase Microextraction. Journal of Chromatography Science **38**: 270-278.

Pink, J., M. Naczka, and D. Pink (1999). Evaluation of the quality of frozen minced red hake; use of Fourier transform near-infrared spectroscopy. Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**(10): 4280-4284.

Pivarnik, L.F., D. Kazantzis, P.A. Karakoltsidis, S. Constantinides, S.N. Jhaveri, and A.G. Rand (1990). Freshness Assessment of Six New England Fish Species Using the Torrymeter. Journal of Food Science **55**(1): 79-82.

Pokorny, J. (1977). Interactions of oxidized lipids with protein. La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse **4**: 389-393.

Poli, B.M., G. Zampacavallo, G. Parisi, A. Poli, and M. Mascini (2000). Biosensors applied to biochemical fish quality indicators in refrigerated and frozen sea bass reared in aerated or hyperoxic conditions. Aquaculture International **8**(4): 335-348.

Poulter, R.G., C.A. Curran, B. Rowlands, and J.G. Disney (1982). Comparison of the biochemistry and bacteriology of tropical and temperate water fish during preservation and processing. Paper presented at the Symposium on Harvest and Post-Harvest Technology of Fish, Cochin, India, Trop. Dev. and Res. Inst., London.

Prost, C., A. Hallier, M. Cardinal, T. Serot, and P. Courcoux (2004). Effect of storage time on raw sardine (*Sardina pilchardus*) flavor and aroma quality. Journal of food science **69**(5): 198-204.

R

Rawles, D.D., G.J. Flick, R.E. Martin, and L.T. Steve (1996). Biogenic Amines in Fish and Shellfish. Advances in Food and Nutrition Research, Academic Press. **39**: 329-365.

Refsgaard, H.H., P.M. B. Brockhoff, and B. Jensen (2000). Free polyunsaturated fatty acids cause taste deterioration of salmon during frozen storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**(8): 3280-3285.

- Refsgaard, H.H.F., A.M. Haahr, and B. Jensen (1999). Isolation and Quantification of Volatiles in Fish by Dynamic Headspace Sampling and Mass Spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**: 1114-1118.
- Rey-Mansilla, M.d.M., C. Sotelo, C. Sotelo, S. Aubourg, H. Rehbein, W. Havemeister, B. Jørgensen, and M. Nielsen (2001). Localization of formaldehyde production during frozen storage of European hake (*Merluccius merluccius*). European Food Research and Technology **213**(1): 43-47.
- Rhee, K.S. (1988). Enzymic and nonenzymic catalysis of lipid oxidation in muscle foods. Food Technology: 127-132.
- Richards, M.P. and H.O. Hultin (2002). Contributions of Blood and Blood Components to Lipid Oxidation in Fish Muscle. Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(3): 555-564.
- Richards, M.P., S.D. Kelleher, and H.O. Hultin (1998). Effect of Washing with or without Antioxidants on Quality Retention of Mackerel Fillets during Refrigerated and Frozen Storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**(10): 4363-4371.
- Rodriguez-Casado, A., P. Carmona, P. Moreno, I. Sánchez-González, A. Macagnano, C.D. Natale, and M. Careche (2007). Structural changes in sardine (*Sardina pilchardus*) muscle during iced storage: Investigation by DRIFT spectroscopy. Food Chemistry **103**(3): 1024-1030.
- Rodríguez, C.J., I. Besteiro, and C. Pascual (1999). Biochemical changes in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chilled storage, John Wiley & Sons, Ltd. **79**: 1473-1480.
- Rose, D.P. and J.M. Connolly (1999). Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. Pharmacology & Therapeutics **83**(3): 217-244.
- Ruíz, A., M.J.A. Canada, and B. Lendl (2001). A rapid method for peroxide value determination in edible oils based on flow analysis with Fourier transform infrared spectroscopic detection. The Analyst **126**: 242-246.
- Ruskol, D. and P. Bendsen (1992). Invasion of *S. putrefaciens* during spoilage of fish. Technological Laboratory and the Technical University. Denmark.
- Ryder, J.M., D.H. Buisson, D.N. Scott, and G.C. Fletcher (1984). Storage of New Zealand Jack Mackerel (*Trachurus novaezelandiae*) In Ice: Chemical, Microbiological and Sensory Assessment. Blackwell Publishing Ltd **49**: 1453-1456.

S

- Saeed, S. and N.K. Howell (2001). 12-Lipoxygenase activity in the muscle tissue of atlantic mackerel (*scomber scombrus*) and its prevention by antioxidants. Journal of the science of Food and Agriculture **81**: 745-750.

- Saito, T., K. Arai, and M. Matsuyoshi (1959). A new method for estimating the freshness of fish. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries **24**: 749-750.
- Sato, K., C. Ohashi, K. Ohtsuki, and M. Kawabata (1991). Type V collagen in trout (*Salmo gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. Journal of Agricultural and Food Chemistry **39**(7): 1222-1225.
- Sato, K., R. Yoshinaka, and M. Sato (1989). Hydroxyproline content in the acid-soluble collagen from muscle of several fishes. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries **55**: 1467.
- Schulz, M., A.D. Liese, E.J. Mayer-Davis, R.B. D'Agostino Jr, F. Fang, K.C. Sparks, and T.M. Wolever (2005). Nutritional correlates of dietary glycaemic index: New aspects from a population perspective. British Journal of Nutrition **94**(3): 397-406.
- Schweizer-Berberich, P.M., S. Vaihinger, S. Vaihinger, and W. Göpel (1994). Characterisation of food freshness with sensor arrays. Sensors and Actuators B: Chemical **18**(1-3): 282-290.
- Shahidi, F., X. Chong, and E. Dunajski (1994). Freshness Quality of Harp Seal (*Phoca groenlandica*) Meat. Journal of Agricultural and Food Chemistry **42**(4): 868-872.
- Shalaby, A.R. (1995). Multidetector, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods. Food Chemistry **52**(4): 367-372.
- Shantha, N.C. and E.A. Decker (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. Journal Of AOAC International **77**: 421-424.
- Sheridan, M.A. (1988). Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry **90**(4): 679-690.
- Shewan, J.M. (1962). The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes. Recent Advances in Food Science **1**: 167-193.
- Shewan, J.M. (1974). The biodeterioration of certain proteinaceous foodstuffs at chill temperatures. Industrial Aspects of Biochemistry. Edited by B. Spencer. London : North-Holland Publishing Company.
- Shewan, J.M. (1977). The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. Proceedings of the Conference on Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish. London, Tropical Products Institute: 51-66.
- Shewfelt, R.L. (1981). Fish muscle lipolysis - A review. Journal of Food Biochemistry **5**(2): 79-100.

Sikorski, Z.E., A. Lolakowska, and B.S. Pan (1990). The nutritive composition of the major groups of marine food organisms In Sikorski Z. E. (Ed.) (1990), Resources Nutritional Composition and Preservation(Boca Raton, Florida: CRC Press-Inc): 30-52.

Simeonidou, S., A. Govaris, and K. Vareltzis (1997). Effect of frozen storage on the quality of whole fish and fillets of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) and mediterranean hake (*Merluccius mediterraneus*). Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A **204**(6): 405-410.

Spurvey, S., B.S. Pan, and F. Shahidi (1998). Flavour of shellfish. Flavor of Meat, Meat Products, and Seafoods, 2nd ed.: 159-196.

Stroem, A.R., J.A. Olafsen, and H. Larsen (1979). Trimethylamine oxide: a terminal electron acceptor in anaerobic respiration of bacteria. Journal of General Microbiology **112**(315-320).

T

Tanchotikul, U. and T.C.Y. Hsieh (1991). Analysis of volatile flavor components in steamed rangia clam by dynamic headspace sampling and simultaneous distillation and extraction. Journal of Food Science **56**(2): 327-331.

Tejada, M., C. De las Heras, and M. Kent (2007). Changes in the quality indices during ice storage of farmed Senegalese sole. European Food Research and Technology **225**(2): 225-232.

Timm, M. and B.M. Jørgensen (2002). Simultaneous determination of ammonia, dimethylamine, trimethylamine and trimethylamine--oxide in fish extracts by capillary electrophoresis with indirect UV-detection. Food Chemistry **76**(4): 509-518.

Tokunaga, T. (1970). Trimethylamine oxide and its decomposition in the bloody muscle of fish. 1. TMAO, TMA and DMA contents in ordinary and bloody muscles. Bulletin of the Japanese Society Scientific Fisheries **36**: 502-509.

Toyohara, H., Y. Makinodan, K. Tanaka, and S. Ikeda (1985). Purification and properties of carp (*Cyprinus carpio*) muscle calpain II (high-Ca²⁺-requiring form of calpain). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry **81**(3): 573-578.

Toyohara, H., T. Sakata, K. Yamashita, M. Kinoshita, and Y. Shimizu (1990). Degradation of Oval-Filefish Meat Gel Caused by Myofibrillar Proteinase(s). Journal of Food Science **55**(2): 364-368.

Tranchant, J. (1995). Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Gazeuse: 4ème Edition: 452-492.

Tryggvadottir, S.V. and G. Olaafsdottir (2000). Multisensor for fish. Questionnaire on quality attributes and control methods, Texture and Electronic Nose to Evaluate Fish Freshness. Project Report Fair ct-98-4076. Reykjavik, Iceland.

U

Uchiyama, H. and S. Ehira (1974). Relation between freshness and acid soluble nucleotides in aseptic cod and yellow tail muscles during ice storage. Bulletin of Tokai Refrigeration Fisheries Research Laboratory **78**: 23-32.

Undeland, I., G. Hall, and H. Lingnert (1999). Lipid Oxidation in Fillets of Herring (*Clupea harengus*) during Ice Storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**(2): 524-532.

V

Van Kuijk, F.J., D.W. Thomas, R.J. Stephens, and E.A. Dratz (1990). Gas chromatographymass spectrometry assays for lipid peroxides. Methods in Enzymology **186**: 388-398.

Veciana-Nogues, M.T., M.S. Albala-Hurtado, M. Izquierdo-Pulido, and M.C. Vidal-Carou (1996). Validation of a gas-chromatographic method for volatile amine determination in fish samples. Food Chemistry **57**(4): 569-573.

Veciana-Nogues, M.T., A. Marine-Font, and M.C. Vidal-Carou (1997). Biogenic Amines in Fresh and Canned Tuna. Effects of Canning on Biogenic Amine Contents. Journal of Agricultural and Food Chemistry **45**(11): 4324-4328.

Vejaphan, W., T.C.Y. Hsieh, and S.S. Williams (1988). Volatile flavor components from boiled crayfish (*Procambarus clarkii*) tail meat. Journal of Food Science **53**(6): 1666-1670.

Vogt, A., T.R. Gormley, G. Downey, and J. Somers (2002). A Comparison of Selected Rapid Methods for Fat Measurement in Fresh Herring (*Clupea harengus*). Journal of Food Composition and Analysis **15**(2): 205-215.

W

Waagbø, R., K. Sandnes, O.J. Torrissen, A. Sandvin, and Ø. Lie (1993). Chemical and sensory evaluation of fillets from Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed three levels of N-3 polyunsaturated fatty acids at two levels of vitamin E. Food Chemistry **46**(4): 361-366.

Wampler, T.P. (1997). Analysis of food volatiles using headspace-gas chromatographic techniques. Techniques for Analyzing Food Aroma: 27-58.

- Wang, J.H., W.C. Ma, J.C. Su, C.S. Chen, and S.T. Jiang (1993). Comparison of the properties of m-calpain from tilapia and grass shrimp muscles. Journal of Agricultural and Food Chemistry **41**(9): 1379-1384.
- Westerdahl, A., J.C. Olsson, S. Kjelleberg, and P.L. Conway (1991). Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. Applied and Environmental Microbiology **57**(8): 2223-2228.
- Whitfield, F.B., J.H. Last, K.J. Shaw, and C.R. Tindale (1988). 2,6-Dibromophenol: The cause of an iodoform-like off-flavour in some Australian crustacea, John Wiley & Sons, Ltd **46**: 29-42.
- Wold, J.P. and T. Isaksson (1997). Non-Destructive Determination of Fat and Moisture in Whole Atlantic Salmon by Near-Infrared Diffuse Spectroscopy, Blackwell Publishing Ltd **62**: 734-736.
- Wolff, S.P. and P. Lester (1994). Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. Methods in Enzymology **233**: 182-189.

Y

- Yamanaka, H. and M. Matsumoto (1989). Simultaneous determination of polyamines in red meat fishes by high performance liquid chromatography and evaluation of freshness. Journal of the Food Hygienic Society of Japan **30**: 396-400.
- Yamanaka, H., K. Shiomi, and T. Kikuchi (1989). Cadaverine as a potential index for decomposition of salmonid fishes. Journal of the Food Hygienic Society of Japan **30**: 170-174.
- Yang, G.C., W. Qiang, K.M. Morehouse, I. Rosenthal, Y. Ku, and P. Yurawecz (1991). Determination of hydroperoxides in edible oils by electron spin resonance, thiobarbituric acid assay, and liquid chromatography-chemiluminescence techniques. Journal of Agricultural and Food Chemistry **39**(5): 896-898.
- Yildiz, G., R. Wehling, and S. Cuppett (2003). Comparison of four analytical methods for the determination of peroxide value in oxidized soybean oils. Journal of the American Oil Chemists' Society **80**(2): 103-107.

Z

- Zhang, H.Z. and T.C. Lee (1997). Rapid near-infrared spectroscopic method for the determination of free fatty acid in fish and its application in fish quality assessment. Journal of agricultural and food chemistry **45**(9): 3515-3521.
- Zhi, Z.L., A. Rios, and M. Valcarcel (1995). Direct Determination of Trimethylamine in Fish in the Flow-Reversal Injection Mode Using a Gas Extraction Sampling Device. Analytical Chemistry **67**(5): 871-877.

Evaluation de la qualité des poissons frais par des approches chimiques

La fraîcheur est un paramètre déterminant de la qualité sanitaire du poisson. S'agissant d'une matrice très altérable, l'évaluation objective de sa fraîcheur est essentielle pour les opérateurs de la filière mais également pour les services d'inspection. Différents outils et techniques sensoriels, chimiques, physiques et microbiologiques ont été développés pour essayer de déterminer le niveau d'altération mais présentent plusieurs limites et caractérisent le plus souvent des seuils de rejet. L'objectif de la thèse est de proposer une nouvelle méthode basée sur l'étude des composés volatils de la chair du poisson qui permette de déterminer sa qualité de manière fiable et objective dès les premiers stades d'altération.

Pour cela, différentes méthodes d'extraction des composés volatils [Headspace Statique avec la Micro-Extraction en Phase Solide (HS-SPME) et Headspace Dynamique (DH) avec le système « Purge and Trap »] ont été employées, et différents outils analytiques [Chromatographie en phase Gazeuse à une et deux dimensions (GC et GC-GC) couplée à la Spectrométrie de Masse (MS) ou à l'Olfactométrie (O)] ont été testés sur diverses espèces de poissons entiers ou en filets [merlan (*Merlangius merlangus*), bar commun (*Dicentrarchus labrax*), dorade royale (*Sparus aurata*), cabillaud (*Gadus morhua*) et saumon (*Salmo salar*)] au cours de plusieurs suivis d'altération.

Les analyses en HS-SPME-GC-MS, DH-GC-MS-8O et DH-GC-GC-MS-O des fractions volatiles de ces cinq espèces en complément des analyses sensorielles, à différents jours de conservation (1, 4, 7, 10 et 15), ont permis d'identifier plus de 122 composés volatils communs aux 5 espèces, qui font partie principalement des familles des aldéhydes, des alcools et des cétones. Différentes études statistiques basées sur des analyses descriptives (ACP et CAH) ont permis d'identifier des marqueurs de qualité du poisson dès les premiers stades d'altération (3-méthyl-1-butanol, 3-méthyl-butanal, diméthyl-sulfide, éthyl-acetate, 2-éthyl-furan...) et sur des analyses prédictives (ANOVA et RLM) pour aboutir à un modèle qui prédit un indice de fraîcheur en relation avec le profil volatil du poisson.

Mots clés : qualité, fraîcheur, composés volatils, analyse sensorielle, HS-SPME-GC-MS

Quality assessment of fresh fish by biochemical approaches

Freshness is a key parameter for assessing the quality of fish. As fish is a very sensitive matrix to spoilage, the purpose of the freshness assessment is essential for all professionals of the seafood industry and for official fish inspection authorities as well. Various tools and sensorial, chemical, physical and microbiological technics have been developed to try to determine the level of spoilage but have several limitations and most of the time characterizes rejection thresholds. The aim of the thesis is to propose a new method based on the study of volatile compounds that may ensures to clearly and objectively determine the quality of the fish from the first stage of spoilage.

Indeed, different extraction methods of volatile compounds [Static Headspace with Solid Phase Micro-Extraction (SH-SPME) and Dynamic Headspace (DH) with the system "Purge and Trap"] were used, and different analytical tools [Gas chromatography with one and two-dimensional (GC and GC-GC) coupled with Mass Spectrometry (MS) or Olfactometry (O)] were tested on various species of whole fish or fillets [Whiting (*Merlangius merlangus*), sea bass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead seabream (*Sparus aurata*), cod (*Gadus morhua*) and salmon (*Salmo salar*)] during the storage.

In addition to the sensory analysis at different days of storage (1, 4, 7, 10 and 15), SH-SPME-GC-MS, DH-GC-MS-8O and DH-GC-GC-MS-O analysis of volatile fractions of these five species have shown over 122 volatile compounds common to those species, which are mainly parts of aldehydes, alcohols and ketones groups. Various statistical studies based on descriptive analysis (PCA and AHC) were used to identify markers of fish quality from the first stage of spoilage (3-methyl-1-butanol, 3-methyl-butanal, dimethyl-sulfide, ethyl-acetate, 2-ethyl-furan...) and predictive analysis (ANOVA and MLR) to produce a model that predicts an index of freshness in relation to the volatile profile of the fish.

Keywords: quality, freshness, volatile compounds, sensory analysis, HS-SPME-GC-MS