

EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL TIEMPO SOBRE LA CARGA BACTERIANA, CONCENTRACIÓN DE HISTIDINA LIBRE Y LA PRODUCCIÓN DE HISTAMINA EN EL MÚSCULO DE LA CORVINA (*Cynoscion maracaiboensis*)

Temperature and Time Effects on Bacterial Growth, Free Histidine Concentration and Histamine Production in Corvina's Muscle (*Cynoscion maracaiboensis*)

Gabriel Torres Ferrari¹, Pedro Izquierdo Córser¹, Enrique Márquez Salas¹, Egar Sánchez Camarillo² y Yasmina Barboza¹

¹Unidad de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia.

E-mail: gtorres@luz.ve. ²Unidad de Estadística, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia.

Maracaibo 4005-A, Estado Zulia, Venezuela.

RESUMEN

Para estudiar los factores que afectan la producción de histamina en el músculo de la Corvina (*Cynoscion maracaiboensis*), se analizaron 30 ejemplares de dicha especie. Estos fueron divididos en tres grupos de 10 pescados, y colocados a temperaturas de 4, 10 y 28°C respectivamente. A todas las muestras les fueron medidas, cada 24 horas, el número de bacterias mesófilas aeróbicas totales utilizando el método de conteo en placas recomendado por la American Public Health Association (APHA). También se midieron, por cromatografía líquida de alta resolución, los niveles de histidina e histamina. Las colonias de bacterias aeróbicas fueron aisladas en agar MacConkey e identificadas utilizando el método API. Se determinó que el número de bacterias alcanzó su máximo valor a las 24 horas, a la temperatura de 28°C. No hubo diferencias significativas entre el número de bacterias a 4 y 10°C a las 0 y 24 horas, encontrándose diferencias ($P < 0,05$) a las 48 horas. La concentración de histidina aumentó en forma rápida a 28°C, de 202,75 ppm a 1003,61 ppm, siendo éste último el valor máximo para todas las muestras. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de histidina para 4 y 10°C. Se aislaron e identificaron 15 especies de bacterias mesófilas presentes en el músculo de la Corvina, 8 de las cuales dieron resultados positivos como productoras de histamina. Los valores promedio de histamina detectados en el músculo de la Corvina fueron de un mínimo 10,28 y un máximo de 59,53 ppm, sin llegar a valores considerados tóxicos por la

Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos. Se encontraron diferencias ($P < 0,05$) para los valores de histamina a los tiempos de 24 y 48 horas en todas las temperaturas, alcanzándose valores de 42,25 ppm a la temperatura de 10°C. En base a los resultados obtenidos en la presente investigación, se concluyó que el incremento de la temperatura favoreció la producción de histamina debido al aumento del número de bacterias, así como del incremento en la concentración de la histidina, la cual es precursor de la histamina. Los niveles de histamina no alcanzaron valores tóxicos, tal vez debido a que las bacterias productoras de dicho compuesto presentes en el músculo mostraron baja actividad de la enzima histidina descarboxilasa. Se recomienda continuar investigando sobre la producción de histamina en el músculo de la Corvina para precisar por qué dichos valores no alcanzaron niveles tóxicos.

Palabras clave: Histamina, producción, temperatura, corvina.

ABSTRACT

In order to study the factors affecting the histamine production in Corvina's (*Cynoscion maracaiboensis*) muscle, 30 fish of these species were sampled and divided in 3 groups of 10 fishes each. They were placed at 4°, 10° and 28°C temperatures. Every 24 hours, the mesophilic bacterial number was measured by using plate count recommended by the American Public Health Association (APHA). Histidine and histamine contents were determined by high performance liquid chromatograph. Bacterial colonies were isolated in Mac Conkey culture media and identified by using API test. Bacterial number reached its highest point at 24 hours for 28°C temperature

There were no significant differences in the number of bacteria between 4 and 10°C at 0 and 24 hours. Significant differences ($P < 0.05$) were found between these temperatures only at 48 hours. Histidine concentration raised quickly at 28°C from 202.75 to 1003.61 ppm. Differences were found at 4 and 10°C for histidine concentration values. 15 bacterial mesophil species were isolated and identified in Corvina's muscle, 8 of them gave positive results for histamine production test. Histamine concentration reached minimum and maximum values of 10.28 and 59.53 ppm, lower than toxic values accepted by Food and Drug Administration (FDA). Significantly different ($P < 0.05$) values were found at 24 and 48 hours for all temperatures, as reaching 42.25 ppm at 10°C. Based on these results it can be concluded that temperature increases positively histamine production, due to growth of histamine-producing bacterial populations and increasing histidine concentration. Levels of histamine did not reach toxic values, maybe due to a low activity of the histidine decarboxylase enzyme of bacteria found in this muscle. It is recommended to continue to investigate on histamine production in Corvina's muscle to determine why these values did not reach toxic levels.

Key words: Histamine, production, temperature, corvina.

INTRODUCCIÓN

La Corvina (*Cynoscion maracaiboensis*) es un pez que habita las aguas de zonas tropicales: Golfo de Venezuela y el Mar Caribe, zonas marinas donde se captura la mayor parte del pescado consumido en Venezuela. Representa el recurso pesquero de mayor importancia para la región occidental del país. Se estima que entre 1994 y 1995 se pescaron más de 15.000 TM de Corvina en las costas de Venezuela [5]. De la cantidad anterior, el 50% procedió de los estados Zulia y Falcón, de allí la importancia de este pescado para la región. Su comercialización en la ciudad de Maracaibo ocupa el primer lugar dentro de las pesquerías locales, transportándose incluso grandes cantidades de él, al resto del país.

Uno de los parámetros que se ha tomado en cuenta en los últimos años para determinar la frescura del pescado, es la cantidad de histamina que pueda presentar el tejido muscular. La histamina es un compuesto producido por algunas bacterias a partir del aminoácido histidina, y es la responsable de los envenenamientos por consumo de pescado y otros productos marinos mal conservados, es decir a consecuencia de la exposición del pescado a temperaturas no aptas para su conservación [11, 15, 16]. Las intoxicaciones producidas por la ingestión de pescado descompuesto son materia de preocupación por razones de salud pública, que aumenta en países donde la explotación pesquera tiene importancia económica. En Venezuela se hace necesario generar información que permita precisar bajo qué condiciones se produce histamina en una cantidad tóxica en las especies locales y no utilizar la in-

formación disponible sobre especies de pescado diferentes a las existentes en el país.

La producción de histamina ha sido estudiada en varias especies de pescado, tanto fresco como procesado [7, 9, 15], sin embargo es poca la información existente sobre los procesos de descomposición que se desarrollan en el músculo de la Corvina y su relación con la producción del mismo. El presente trabajo tuvo como propósito determinar la producción de histamina en el músculo de la Corvina a distintas temperaturas y tiempos de almacenamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Treinta pescados de la especie *Cynoscion maracaiboensis* recién capturados, fueron comprados a pescadores locales de la ciudad de Maracaibo y transportados refrigerados en hielo al laboratorio, donde les fueron removidas la cabeza y la cola; luego con la ayuda de un cuchillo estéril, se dividieron los cuerpos en tres secciones de 250 g cada una. Para el análisis se tomaron tres muestras que representan el tiempo inicial y el resto fue conservado a temperaturas de 4, 10 y 28°C. Posteriormente se les determinó el número de microorganismos mesófilos aeróbicos, histidina libre e histamina producida a tiempos de 0, 24 y 48 h de haberse colocado a las temperaturas indicadas.

El análisis microbiológico se realizó por el método de conteo en placas propuesto por la American Public Health Association (APHA) [1], para lo cual se tomaron 50g de músculo de Corvina se licuaron en 450 mL de agua peptonada estéril a una concentración de 0,1% y a una temperatura de 4°C durante 2 min. A partir del homogeneizado original se prepararon diluciones en agua peptonada de concentración 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . Para cada una de estas diluciones se prepararon placas de Petri con agar de conteo en placas (Merck), en las que fueron sembrados superficialmente 0,1 mL de cada muestra. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h y el recuento de las colonias se realizó usando un cuenta colonias, marca Fisher (Fisher Instruments, EUA).

Para el aislamiento de los organismos gram negativos, se inoculó 1 mL del homogeneizado en 9 mL de agua peptonada y luego se incubaron a 35°C por 24 h; transcurrido este tiempo, se sembró 0,1 mL de la dilución en agar McConkey y eosina azul de metileno. Luego se incubaron las placas, a 37°C por 24 h. Las colonias fueron sembradas en el medio de Niven propuesto por Yoshinaga y col. [17], para determinar la producción de histamina, el cual está formado por 0,5% de triptona, 0,5 de extracto de levadura, 2 de L-histidina, 0,5 de cloruro de sodio y 1,5% de agar. Las colonias aisladas se conservaron posteriormente en agar nutritivo hasta su identificación que se hizo utilizando el API-20E Enterobacteriaceae System (Biome-riex, Lyon, France).

Los análisis de histidina e histamina se realizaron de acuerdo a la metodología propuesta por Gouygou y col. [6], la misma consiste en medir las concentraciones de los analitos por cromatografía líquida. Como patrones se utilizaron histidina e histamina de alta pureza (Sigma, Missouri, EUA). Los demás reactivos y solventes utilizados fueron de la marca Merck, (Alemania). El sistema de cromatografía líquida estuvo constituido por una bomba marca Shimadzu (Tokio, Japón) modelo LC-6A, una válvula de inyección marca Rheodyne equipada con un loop de 20 μ L de capacidad y una columna de fase reversa marca Merck, RP-18 Lichrospher de 12,5 cm de longitud por 4,5 mm de diámetro interno, el tamaño de las partículas de sílica fue de 5 m. Se usó un detector de fluorescencia, marca Shimadzu (Tokio, Japón) modelo FLD-6A, a una longitud de onda de excitación de 350 nm, mientras que la de emisión era de 450nm.

Las condiciones de trabajo del equipo consistieron en un sistema isocrático de solventes en el que se utilizó una fase móvil compuesta por Acetonitrilo al 40% en agua con fosfato monosódico en una concentración de 50 mmoles/L. El flujo fue constante con un caudal de 1 mL/min. El registro y análisis de la data se realizaron con el software cromatográfico Class-VP de la marca Shimadzu.

Para la derivatización de los estándares y las muestras fue utilizado el orto-ftalaldehído (OPA) preparado mezclando 10 mg del mismo en 1 mL de metanol. Se prepararon estándares de histamina que contenían 0,01; 0,015 y 0,02 mg/mL disueltos en Acido Tricloroacético (TCA) al 10%. Los mismos se filtraron a través de filtros Millipore de 0,22 μ m de poro.

El fluoróforo histamina-OPA o histidina-OPA se preparó mezclando 135 μ L de la solución stock con 1,86 mL de agua desionizada y 0,4 mL de NaOH 1N, se dejó en reposo durante un 1 min a oscuras y luego se le agregó 0,1 mL de solución de OPA. A los 4 min se le añadieron 0,2 mL de HCl de concentración 3N.

Las muestras para inyección, se prepararon licuando 50g de músculo de Corvina en 100 mL de TCA al 10% durante 2 min, a máxima velocidad, para ello se utilizó una licuadora comercial marca Oster y un vaso de acero inoxidable. Una vez trituradas, se filtraron al vacío a través de papel de filtros Whatman N° 1 y Millipore de 0,22 μ m de poro. Todas las muestras al igual que los estándares fueron conservados a 4°C para su posterior inyección.

El diseño experimental utilizado fue el diseño factorial 3 x 3, siendo los factores la temperatura a tres niveles (4, 10, 28°C), y el tiempo a tres niveles (0, 24, 48 h). También las unidades experimentales se asignaron a los tratamientos en forma aleatoria. Las variables independientes eran el tiempo y la temperatura y, las variables dependientes, la carga bacteriana, la histidina liberada y la histamina producida. Los datos se analizaron empleando el SAS PROC-GLM [10,13] y las medias se compararon usando la prueba de Tukey con un nivel de significación de $P < 0,05$ [3].

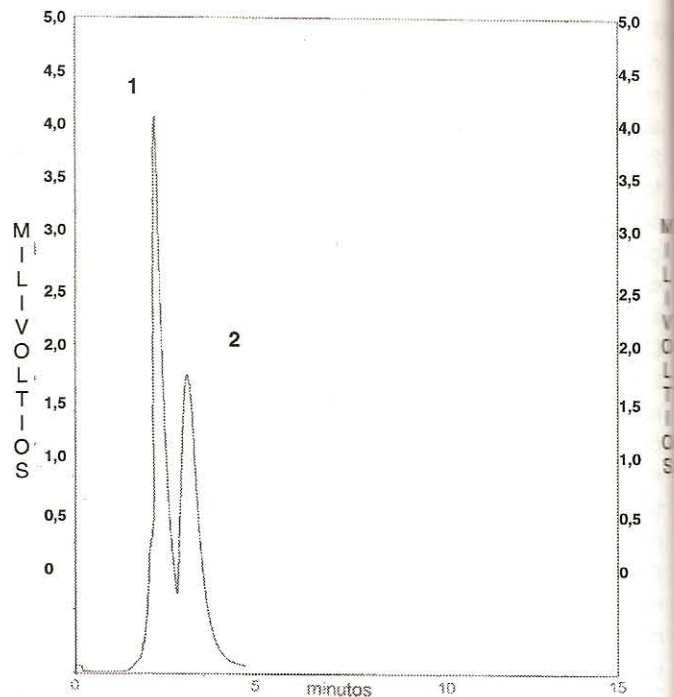


FIGURA 1. CROMATOGRAMA DE UNA MEZCLA DE PATRONES DE HISTAMINA E HISTIDINA DONDE SE APRECIAN DOS PICOS, EL N° 1 CORRESPONDIENTE A LA HISTIDINA Y EL N° 2 CORRESPONDE A LA HISTAMINA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Separación cromatográfica

La FIG. 1 muestra el cromatograma de una mezcla de histidina e histamina separadas, empleando la metodología propuesta por Gouygou y col. [6]. En la misma se puede apreciar la separación de estos analitos, utilizando un método cromatográfico isocrático. El tiempo de análisis fue de 5 min y los analitos histidina e histamina eluyeron de la columna en ese orden. El tiempo de análisis de 5 min fue distinto al reportado por Gouygou y col. [6], que fue de 10 min, atribuible al uso de una columna de diferente marca.

Efectos de la temperatura y el tiempo sobre la carga bacteriana

En la TABLA I se pueden observar los valores promedio de las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en el músculo de las Corvinas, almacenadas a tres temperaturas y tiempos diferentes. La temperatura de 4°C simula la conservación en hielo utilizada en el transporte de pescado; la temperatura de 10°C a la refrigeración en nevera, y la de 28°C representa una temperatura control que se presenta en muchos expendios de pescado ambulante y además, usada por otros autores [2, 9] como una temperatura de alto riesgo para la conservación de pescado, ya que permite el libre crecimiento de bacterias.

TABLA I
CANTIDAD DE BACTERIAS MESÓFILAS AERÓBICAS AISLADAS EN EL MÚSCULO DE LA CORVINA,
EXPRESADAS EN log UFC/g

Tiempo	Temperatura de Almacenamiento		
	4°C	10°C	28°C
0 h	5,27 ^a	5,00 ^a	5,90 ^{ab}
24 h	5,6 ^{ab}	6,37 ^{ac}	10,06 ^d
48 h	5,89 ^{ab}	6,87 ^c	10,53 ^d

a, b, c, d P < 0,05.

TABLA II
VALORES PROMEDIO DE HISTIDINA EXPRESADA EN PARTES POR MILLÓN (PPM) A DISTINTOS TIEMPOS
Y TEMPERATURAS

Tiempo	Temperatura de Almacenamiento		
	4°C	10°C	28°C
0 h	155,99 ^{ab}	202,75 ^{ab}	298,54 ^b
24 h	154,46 ^a	280,58 ^{ab}	525,03 ^c
48 h	512,05 ^c	507,63 ^c	1003,61 ^d

a, b, c, d P < 0,05.

A la temperatura de 28°C se observó un rápido crecimiento de bacterias mesófilas que alcanzaron su valor máximo a las 48 h. Este comportamiento no difiere de los estudios realizados por Baranowsky y col., López y col. y Yoshinaga y Frank [2, 9, 17], en otras especies de pescado. Los valores de UFC a la temperatura de 28°C fueron significativamente diferentes (P<0,05) a 24 y 48 h, con respecto al resto de las temperaturas debido al rápido crecimiento bacteriano y al efecto inhibitor del crecimiento a 4 y 10°C [9].

Con relación a las muestras conservadas en refrigeración a 4 y 10°C se presentaron diferencias significativas (P<0,05) a los tiempos de 24 y 48 h, ya que a la temperatura de 10°C no se detiene eficientemente el crecimiento de bacterias mesófilas en la Corvina [2, 9]; además el crecimiento bacteriano que se presenta a 4°C pudiera explicarse por la presencia de organismos psicrotróficos, menores en número [2]. El músculo de la corvina presentó un número de bacterias mayor al atún (*Thunnus thynnus*) y ligeramente superior al mahimahi (*Coryphaena hippurus*) [2, 9], se obtuvieron recuentos mayores de organismos aerobios mesófilos en el músculo de la Corvina. En el análisis de varianza se obtuvo un R² de 0,973, lo que significa que un 97% del crecimiento bacteriano se debe al efecto de la temperatura y el tiempo, encontrándose interacción entre ambos.

Efecto de la temperatura y el tiempo sobre los niveles de histidina libre

En la TABLA II se aprecia el efecto de las distintas temperaturas y tiempos sobre la liberación de histidina en el músculo de pescado; se observa así mismo, que a 4 y a 10°C, los niveles de histidina difieren significativamente (P<0,05) de los valores promedio registrados a 28°C, en todos los tiempos, de-

bido a la violenta autólisis que ocurre en el músculo de la Corvina por efecto de la temperatura de 28°C. A 4 y 10°C se detiene la liberación de histidina, posiblemente por inhibición de las enzimas proteolíticas de estos procesos degradativos, tal como lo establecen Stoknes y Rustad [14].

Los resultados parecen indicar que la baja temperatura detiene o retarda los procesos de autólisis que ocurren a 28°C en el músculo de la Corvina, que al igual que el de otras especies, sufre procesos proteolíticos que liberan histidina [14]. La histidina es el sustrato de la enzima histidina descarboxilasa que la convierte en histamina. El hecho de que a 4 y 10°C se inhibe la autólisis, también pudiera explicar que la producción de histamina se detiene por una limitación en la provisión de sustrato [4].

El valor de R² obtenido fue de 0,917, lo que indica que un 91% de la histidina se libera por efecto de la temperatura y/o el tiempo.

Bacterias presentes en el músculo de la corvina

Se observa una lista de las bacterias identificadas en el músculo de las Corvinas conservadas a 28°C, TABLA III. De allí fueron aisladas e identificadas 15 especies bacterianas mesófilas aeróbicas, 8 de las cuales demostraron ser productoras de histamina con ayuda del medio modificado de Niven [17]. López y col. [9], han reportado los valores promedio de histamina producidos por las especies aisladas en el atún (*Thunnus thynnus*) ya que son de elevada producción de histamina. La *Klebsiella pneumoniae* es, entre las 8 especies aisladas, la única que produce histamina a elevadas concentraciones. El resto de las bacterias identificadas sólo producen histamina a baja concentración, o no producen [9].

TABLA III
BACTERIAS MESÓFILAS AISLADAS E IDENTIFICADAS EN
EL MÚSCULO DE LA CORVINA
(*Cynoscion maracaiboensis*) UTILIZANDO EL MEDIO
MODIFICADO DE NIVEN

Especies	Producción de Histamina
<i>Aeromonas hydrophyla / caviae</i>	-
<i>Aeromonas sobria</i>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
<i>Citrobacter freundii</i>	+
<i>Citrobacter diversus / amalonaticus</i>	+
<i>Enterobacter sakazakii</i>	+
<i>Enterobacter agglomerans</i>	+
<i>Enterobacter spp</i>	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
<i>Pseudomonas spp</i>	-
<i>Vibrio hollisae</i>	-
<i>Proteus penneri</i>	-
<i>Proteus vulgaris</i>	+
<i>Hafnia alvei</i>	+
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-

Efectos de la temperatura y el tiempo sobre la producción de histamina

En la TABLA IV se aprecian los valores promedio de histamina producida en el músculo de la Corvina a tres temperaturas y tiempos. Se puede apreciar que el valor más bajo, corresponde al tiempo cero sin encontrarse diferencias significativas para las distintas temperaturas. La cantidad inicial de histamina no alcanza las 11 ppm, lo que la asemeja a las aseveraciones hechas por otros autores en especies distintas a la corvina, donde se han encontrado cantidades iniciales que llegan a las 20 ppm [9, 12]. Transcurridas 24 h, TABLA IV, se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los valores promedio de histamina a 4 y 28°C, producto del crecimiento y actividad bacteriana en el músculo de la Corvina. Transcurridas 48 h, TABLA IV, se aprecian diferencias significativas en los valores de histamina producida a las temperaturas de refrigeración con respecto a la de 28°C. Con el transcurrir del tiempo y a pesar de estar refrigerado, se podrían alcanzar valores

de concentración de histamina mayores [8, 9]. Sin embargo debe señalarse que los valores máximos de histamina logrados a las 48 h a 28°C, no alcanzaron la cifra establecida como tóxica por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA), que es de 200 ppm [9].

El valor de R^2 para la producción de histamina fue de 0,973 lo que explica que el 97% de la histamina generada en el músculo de la Corvina es debida a los efectos de la temperatura y el tiempo, por separado o en interacción. A pesar de que el modelo expresa que la histamina se debe en un 97% a los efectos de la temperatura y el tiempo, existen dos factores que no pueden ser ignorados: la carga bacteriana y la cantidad de histidina presente en las muestras analizadas. En las TABLAS I y II se observa que los factores antes mencionados aumentan en el tiempo y a todas las temperaturas estudiadas. El valor promedio máximo de histamina encontrado a las 48 h fue de 59,53 ppm, menor a los valores tóxicos establecidos por la FDA; lo que podría explicarse por la presencia de microorganismos poco eficientes como productores de histamina [9].

CONCLUSIONES

Sobre la base de los resultados obtenidos en esta investigación, se puede concluir que:

- La concentración de histidina libre en la Corvina aumenta con el incremento de la temperatura.
- A las temperaturas de 4 y 10°C se detiene la liberación masiva de histidina en el músculo de la Corvina hasta 48 h después de ser capturada.
- El número de bacterias en el músculo de la Corvina aumenta con el incremento de la temperatura y el tiempo de conservación.
- La flora bacteriana de la Corvina conservada a 28°C estuvo conformada por al menos 15 especies de bacterias mesófilas aeróbicas, de las cuales la *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter spp*, *Proteus vulgaris* y *Hafnia alvei* son consideradas cada una como productoras de histamina.
- Los niveles de Histamina en el músculo de la Corvina aumentan como consecuencia del incremento de la tem-

TABLA IV
VALORES DE HISTAMINA EXPRESADOS EN PARTES POR MILLÓN (PPM) A DISTINTOS TIEMPOS Y TEMPERATURAS

Tiempo	Temperatura de Almacenamiento		
	4°C	10°C	28°C
0 h	10,28 ^a	10,42 ^a	13,55 ^{ab}
24 h	10,31 ^a	11,12 ^a	42,25 ^d
48 h	16,125 ^{bc}	20,1 ^c	59,53 ^e

a, b, c, d $P < 0,05$.

peratura y tiempo de conservación, sin embargo, fueron inferiores a 200 ppm, por lo que no se consideraron tóxicos.

RECOMENDACIONES

Para continuar el estudio de la producción de histamina en la carne de la Corvina se recomienda lo siguiente:

- Realizar trabajos que permitan estudiar el efecto individual que tiene sobre la producción de histamina la temperatura y la concentración de histidina, evitando el solapamiento de dichos efectos. Esto permitiría determinar el verdadero aporte de cada uno en la producción de histamina en la Corvina.
- Estudiar la baja producción de histamina en la Corvina midiendo la actividad de la enzima histidina descarboxilasa en el músculo de dicha especie.
- Es importante medir en el músculo de la corvina la presencia de otras aminas biógenas. Finalmente se recomienda el almacenamiento de la Corvina a temperaturas menores a los 4°C, de ser a esta temperatura, dicho pescado debe ser consumido en las siguientes 48 horas luego de su captura y refrigeración.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean agradecer al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES), por el financiamiento de esta investigación a través de su proyecto N° 0613-99.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Compendium of methods for the Microbiological examination of foods: 107-108. 1976.
- [2] BARANOWSKI, J.D.; FRANK, H.; BRUST, P.; CHONGRISIWATANA, M.; PREMARATNE, R. Decomposition and histamine content in Mahimahi (*Coryphaena hippurus*). **J. Food Protect.** 53(3): 217-222. 1990.
- [3] DANIEL W.W. 1991. **Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud**. Editorial Limusa. México: 415-455. 1991.
- [4] DAVIS, B.; DULBECCO, R.; GINSBERG, H.; WOOD, B.; MCCARTHY, M. **Microbiology**. 2nd Edition. Harper & Row Publishers. 46 pp. 1973.
- [5] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. (FAO). **Species identification sheets Sciaen Cynos 1.FAO**. 1977.
- [6] GOUYGOU, J.P.; SINQUIN, C.; DURAND, P. High pressure liquid Chromatography determination of histamine in fish. **J. Food Sci.** 52(4): 925-927. 1987.
- [7] HARDY, R.; SMITH, J. The storage of Mackerel (*Scomber scombrus*). Development of Histamine and Rancidity. **J. Sci. Food Agric.** 27: 595-599. 1976.
- [8] HOLLINGWORTH, T.A.; WEKELL, M.M.; SULLIVAN, J.J.; TORKELSON, J.D.; THROM, H.R. Chemical indicators of decomposition for raw surimi and flakes artificial crab. **J. Food Sci.** 55(2): 349-352.
- [9] LOPEZ, E.I.; RODRIGUEZ, J.; HERNANDEZ, M.; ROIG, A.; MORA, M. Sensory Quality and histamine formation during controlled decomposition of Tuna (*Thunnus thynnus*). **J. Food Sci.** 59(2): 167-174. 1995.
- [10] LITTLE, R.C.; FREUND, R.J.; SPECTOR, P. **SAS "System for linear models"**. SAS institute Inc. North Carolina. USA: 1-49. 1991.
- [11] MIETZ, J.; KARMAS, E. Chemical index of canned tuna as determined by High pressure liquid chromatography. **J. Food Sci.** 42: 155-158. 1977.
- [12] RICE, S.; EITENMILLER, R.; KOEHLER, P. Biologically active amines in food: a Review. **J. Milk and Food Tech.** 39(5): 353-358. 1976.
- [13] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **User's guide**. Version 5.0. Cary, N.C. 1985.
- [14] STOKNES, I.; RUSTAD, T. Proteolytic activity in muscle from atlantic Salmon (*Salmo salar*). **J. Food Sci.** 60(4): 711-714. 1995.
- [15] WOOD, G.; HINTZ, L.; SALWIN, H. Chemical Alterations in fish tissue during storage at low temperatures. **J. of AOAC.** 52(5): 904-910. 1969.
- [16] YEN, G.C.;HSIEH, C.L. Simultaneous Analysis of biogenic amines in canned fish by HPLC. **J. Food Sci.** 56(1): 158-160. 1991.
- [17] YOSHINAGA, D.; FRANK, H. Histamine-Producing bacteria in decomposing Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*). **Appl. and Envir. Microb.** 44(2): 447-452. 1982.