

## تعیین مقادیر هیستامین و رابطه آن با بار میکروبی در ماهی شوریده (*Otolithes ruber*) نگهداری شده در یخ

امیر مجتبی ستوده\*، سهراب معینی و مژگان بنی اردلانی

دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

### Detection of histamine level and relation with microbial load of whole Tiger croaker (*Otolithes ruber*) during ice storage

Sotoodeh\*, A.; Moeini, S. & Baniardalani, M.

1, 2, 3. Faculty of Marine Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University

#### Abstract

In this study, the biogenic amine Histamine (BA) content of whole croaker (*Otolithes ruber*) was monitored during ice storage for a period of 18 days and related bacterial changes (psychrophiles and mesophiles) were studied every 3 days (0, 3, 6, 9, 12, 15 and 18th day). Histamine was not detected in the first storage day by HPLC and this amine detected after 5 days. The best correlation ( $R^2=0.98$ ) were found among Histamine and mesophilic bacterial load also showed significant variation ( $P<0.05$ ) during ice storage. Initial concentration of Histamine was  $1.49\mu\text{g/g}$  and finally reached to  $14.21\mu\text{g/g}$  when mesophilic bacterial load reached over  $107\text{cfu/g}$ . The level of Histamine seemed to be a suitable indicator of freshness of *Otolithes ruber*.

**Keyword:** Biogenic amine, histamine, *Otolithes ruber*, microbial load, ice storage

#### چکیده

در ماهیان شوریده نگهداری شده در یخ طی یک دوره ۱۸ روزه، غلظت آمین بیوژن هیستامین و ارتباط آن با تغییرات بار باکتریایی (باکتری‌های سرمادوست و مزوفیل) در بازه‌های زمانی ۳ روزه مورد بررسی قرار گرفت (روزهای صفر، ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵ و ۱۸). آمین بیوژن هیستامین در روز اول نگهداری ماهیان بوسیله دستگاه HPLC تشخیص داده نشد (ردیابی نشد) و ردیابی این آمین از روز پنجم نگهداری بود. بهترین میزان همبستگی ( $R^2=0.98$ ) بین آمین هیستامین و بار باکتریایی مزوفیل یافت شد و این باکتری‌ها، در طول دوره تفاوت معنی‌داری ( $p<0.05$ ) را نشان دادند. غلظت اولیه هیستامین  $1.49$  میکروگرم بر گرم بود و در انتهای دوره به  $14.21$  میکروگرم بر گرم رسید که در این زمان بار باکتریایی مزوفیل به بیش از  $1.07\text{CFU/g}$  رسیده بود. بنظر می‌رسد که تغییرات سطوح هیستامین شاخص مناسبی برای ارزیابی میزان تازگی ماهی شوریده بر اساس نتایج این تحقیق باشد.

#### کلمات کلیدی

آمین بیوژن، هیستامین، ماهی شوریده، بار باکتریایی، نگهداری در یخ

## مقدمه

آمین‌های بیوژن (BAS) مولکول‌های کوچک آلی با پایه ساختاری آلیفاتیک، آروماتیک و هیدروسیکلیک می‌باشند. آنها توسط آنزیم‌های دکربوکسیلاز باکتریایی از اسیدهای آمینه آزاد در مواد غذایی شکل می‌گیرند (Taylor & Summer, 1987). این پدیده در مواد غذایی و به خصوص در گوشت و ماهی تولیدی در نتیجه پدیده‌های فیزیولوژیک یا در نتیجه رشد باکتری‌ها همراه با دوره تخریبی آنها به وفور رخ می‌دهد.

باکتری‌های مستعد مختلف که قادر به دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه می‌باشند در عضله ماهی در محیطی ایزوله وجود دارند (Taylor 1989, Yoshinaya and Frank 1982, Moori *et al.*, 1986, Okuzumi *et al.*, 1990). آنها شامل باکتری‌های مزوفیلیک و سایکروفیلیک بوده و بیشتر آنها دارای آنزیم دکربوکسیلاز می‌باشد. در بین آمین‌ها، هیستامین به صورت غالب در مسمومیت غذایی نقش دارد و آمین‌های مشابه پرترسین و کدورین در تشدید و ازدیاد حالت منفی هیستامین معروفند (Bjeldanes *et al.*, 1978). عضله ماهی مستعد شکل‌گیری مجموعه وسیعی از نژاد خاص باکتریایی و ترکیبی آمین‌های بیوژن که از دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه بوجود می‌آیند، می‌باشد.

شکل‌گیری آمین‌های بیوژن در ماهی و محصولات دریایی مربوط به اسیدهای آمینه موجود در ماهی و وجود باکتری‌های تولیدکننده آنها و شرایط مساعد محیطی می‌باشد (Shalaby, 1996; Silla-Santos, 1996).

در طول نگهداری ماهی در یخ، میکروفلورها بواسطه عوامل مختلفی تغییر می‌یابند. باکتری‌های گرم منفی تخمیرکننده (Vibrionaceae) در فساد نگهداری نامناسب ماهی در جایگاه باکتری‌های گرم منفی سایکرو تولرانتها (مانند جنس *Pseudomonas* و جنس *Shewanella*) بر روی ماهی رشد می‌کنند دیده می‌شود (Gram & Hass, 2000). مفهوم خاص تخریب ارگانیکی SSO کمک قابل ملاحظه‌ای به درک مفهوم فساد غذایی در ماهی می‌نماید. فساد ارگانیکی غذای دریایی تولید آمونیاک، آمین‌های بیوژن، اسیدهای آلی و ترکیبات سولفور از اسیدهای آمینه و استات از لاکتات و هیپو گزانتین در نتیجه تولید کم ATP، می‌نماید.

هیستامین‌ها در نتیجه دکربوکسیلاسیون اورنتین بوجود آمده و به عنوان یک شاخص مطرح در مورد تازگی ماهی مطرح می‌باشد و در مراحل اولیه فساد آن ظاهر می‌شود (Dawood *et al.*, 1988, Fernanadez-Salyucro *et al.*, 1987, Yamanaka, 1989). ذخیره‌سازی ماهی و سایر آبزیان خوراکی در یخ روش متداولی از نگهداری ماهی بر روی عرشه کشتی و ساحل دریا می‌باشد. مطالعات علمی زیادی تأثیر دما بر شکل‌گیری آمین‌ها در ماهی را نشان داده است (Behling and Taylor 1982, Lopez-Sabater *et al.*, 1996 Koutsoumanis *et al.*, 1999). متعدد آمین‌ها در ماهی در طول ذخیره‌سازی آن در یخ ارائه شده است، چنین اختلافاتی اساساً نتیجه گونه میکرو فلورای موجود در ماهی و مرحله زیستی آن می‌باشد (Middlebrooks *et al.*, 1968; Loperz-Sabater *et al.*, 1996).

به محض ورود هیستامین به جریان خون، اثرات سمی بروز می‌نمایند. اثر روده‌ای در انسان شامل آنزیم‌های دی آمین اکسیداز (DAO) و هیستامین -N- متیل ترنسفرز (HMT) که هیستامین را به محصولات بی‌ضرر فساد تبدیل می‌کند، هر چند در مورد غلظت‌های بیشتر هیستامین ظرفیت DAO و HMT برای سم‌زدایی هیستامین محدود شده و به محض ورود هیستامین به جریان خون، سبب بروز اثرات سمی می‌شود (Taylor, 1986). پوتر سین و کداورین می‌توانند این واکنش‌های آنزیمی را متوقف ساخته و بنابراین سمیت هیستامین را تقویت نمایند (Eitenmilfer *et al.*, 1980). روش‌هایی از قبیل تکنیک‌های فلور سنجی، آنزیمی و کروماتوگرافی مانند کروماتوگرافی لایه نازک (TLC), 1979 (Chin & Kochler, 1983; Fleischer), و کروماتوگرافی گاز مایع (GLC) (Starusckiewicz & Bond, 1981) و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) (Mietz & Karmas 1977; Yen & Hsieh, 1991) برای آنالیز و تجزیه آمین‌های بیوژنی مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

## مواد و روش‌ها

### مواد شیمیایی و میکروبی

حلال‌های استاندارد آمین با درصد تعریف شده در دستگاه HPLC و سایر موادی که برای HPLC مورد استفاده قرار گرفتند مانند تری‌کلرو استیک اسید (TCA)، HCL، MaoH، NaCl، n-هپتان، متانول، آب مقطر، آب غیر یونیزه آگار مغزی و بنزوئیل کلرید که برای ایجاد مشتقات و سنتز مورد استفاده واقع شده، نیز فراهم شدند.

### تهیه نمونه‌های ماهی و شرایط ذخیره

میزان هیستامین در ماهی شوریده در طول ۱۸ روزه دوره ذخیره‌سازی در یخ (روزهای صفر، سوم، ششم، نهم، دوازدهم، پانزدهم و هیجدهم) کنترل شده و تغییرات بار باکتریایی مربوطه (سایکروفل‌ها و مزوفیل‌ها) نیز مطالعه گردید. ماهی تازه شوریده از هندیجان (استان خوزستان) تهیه شده و سریعاً به آزمایشگاه منتقل گردید. میانگین طول و وزن ماهی‌ها به ترتیب برابر با ۳۳۰ میلی‌متر و ۴۰۰ گرم بود. ماهی‌ها در فروردین ۱۳۸۷ نمونه‌گیری شدند. ماهی‌ها تحت شرایط یخ‌گذاری در جعبه‌های عایق‌بندی شده که مجهز به خروجی‌هایی برای خارج ساختن آب حاصل از ذوب یخ بود ذخیره شدند. یخ‌های جایگزین روزانه اضافه شده و در نتیجه دما به صورت یکنواخت حفظ شد. نسبت یخ به ماهی (۳ به ۱) در طول آزمایش ثابت نگه داشته شد. نمونه‌های ماهی در روزهای صفر و سپس ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸، جهت انجام آزمایش‌های لازم خارج گردیده و نسبت به تعیین بار باکتریایی و میزان هیستامین آنها اقدام شد.

### آنالیز میکروبیولوژیکی

مقدار ۲۵ گرم از عضله بخش پشتی - شکمی هر ماهی به طور جداگانه برداشت شده و با ۲۲۵ میلی لیتر سرم استریل فیزیولوژیک (NaCl ۰/۸۵ درصد) همگن گردید و توالی رقت‌های اعشاری هر نمونه همگن با همان سرم رقیق‌کننده انجام شد. برای تعیین بار میکروبی، نمونه‌های ۵/۱ میلی‌لیتری از رقیق‌های (رقیق‌کننده ۱:۱۰، ۱:۱، ۰/۱ درصد آب-پپتون) همگن ماهی در سطح محیط کشت خشک پخش شدند. پلیت‌ها در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای باکتری‌های سایکروتروفی و ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای باکتری‌های مزوفیلی انکوبه و جداسازی شدند. پس از دوره مناسب انکو باسیون (۴۸ ساعت) داده‌های میکروبیولوژیکی جمع‌آوری شده و به لگاریتم تعداد واحدهای شکل کلونی ( $cfug^{-1}$ ) تبدیل شدند.

### آنالیز شیمیایی

#### روش HPLC

کروماتوگرافی مایع شامل توالی‌ها (سری‌های) Shimadzu مدل ۱۰AD برای HPLC بوده که مجهز به دستگاه آشکارساز طول موج‌های متغییر قابل رؤیت فرابنفش در طول موج ۲۵۴ نانومتر می‌باشد. در تمام تفکیک‌ها از یک لیکروسفر ۱۸-RP-۱۰۰ [۲۴۴۳۴/۴] میلی‌لیتر I.D ستون ۵ میلی‌لیتری مرتبط با پیش ستون ضامن لیکروسفر (۱۰۳۴/۶ میلی‌متر I.D) و ترموستات در دمای ۳۰°C در یک آون ستون شیمادزو ۱۰A-CTO استفاده شد. جمع‌آوری داده‌ها و انجام تغییرات بر روی آنها با استفاده از نرم‌افزار اتوماتیک شیمادزو CLASS-VP برای کروماتوگرافی انجام شد. برای اختلاط کامل محلول‌ها از یک مخلوط‌کننده سینتیفیکا Velp استفاده شد. برای تفکیک BAها (آمین‌های بیوزنی) از نمونه‌های ماهی از یک سانتریفوژ منجمد با حداکثر سرعت (سوروال RC-5B) استفاده شد.

## آنالیز آمین‌های بیوژنی (آنالیز شیمیایی)

### تهیه محلول‌های استاندارد

محلول استاندارد ذخیره از طریق حل کردن دقیق ۰/۱ گرم هیستامین (سیگما) در ۱۰ میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۵٪ (TCA) به دست آمد. محلول‌های استاندارد در مورد استفاده از طریق رقیق کردن ۱ میلی متر از هر محلول استاندارد ذخیره در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر تهیه شدند.

### تهیه نمونه برای آنالیز آمین بیوژن

#### استخراج

۵۰ گرم از ماهیچه کناری نیمه پستی-شکمی هر ماهی در ۷۵ میلی لیتر از محلول ۵ درصد تری کلرواستیک اسید (TCA) به مدت ۲ دقیقه به صورت همگن مخلوط شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. به این ترتیب محلول supernatant به دست آمده و با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۱ فیلتر شده و به داخل بالون ۲۵۰ میلی لیتری ریخته شد. ماده باقیمانده در لوله آزمایش به دستگاه همگن کننده بازگردانده شده و این روش سه بار تکرار شد. در مرحله بعد ۱۰ میلی لیتر از محلول استخراج شده با ۴ گرم NaCl، ۱ میلی لیتر NaOH (۵۰ درصد) و ۵ میلی لیتر ترکیب کلروفرم-بوتانول (۱ به ۱) در لوله آزمایش مخلوط شده و به مدت ۲ دقیقه بر روی دستگاه لرزاننده قرار گرفت. سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد و لایه آلی رویی به دست آمد. این مرحله سه بار تکرار و ۱۵ میلی متر n-هپتان و ۱ میلی لیتر HCL ۰/۲ نرمال به آن اضافه شده و بر روی دستگاه لرزاننده قرار گرفت. این روش نیز سه بار تکرار شد. در نهایت ۱ میلی لیتر آب به آن افزوده شده و محلول تحت گاز N<sub>2</sub> یا حمام تبخیر خشک شد (Mietz and Karmas, 1978).

#### تهیه مشتقات

یک میلی لیتر از محلول ۲ مولار NaOH و ۵ میکرو لیتر بنزوئیل کلراید به ماده خشک استخراج شده اضافه شدند. این ترکیب در یک مخلوط کننده گردابی به شدت تکان داده شد و این عمل به مدت ۲۰ دقیقه ادامه یافت. ۲ میلی لیتر محلول NaCl اشباع برای جلوگیری از بنزوئیل‌اسیون افزوده شد. در نهایت ۲ میلی لیتر دی اتیل اتر اضافه گردید و سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰ rpm سانتریفوژ شد. لایه آلی به این ترتیب به دست آمده و تحت گاز N<sub>2</sub> یا حمام تبخیر خشک گردید (Dawood, 1988).

#### تزریق به HPLC

ماده خشک استخراج شده در روش‌های گفته شده در ۲۰۰ میکرو لیتر متانول با درجه HPLC حل و از صافی میلی پور (۰/۴۵ میکرومتر) عبور داده شد و ۲۰ میکرو لیتر از ماده فیلتر شده با استفاده از سرنگ همیلتون به HPLC تزریق شد. آمین‌ها تحت پرتو فرابنفش (UV) در طول موج ۲۵۴ نانومتر آشکار شده و تفکیک تحت فاز معکوس با شرایط ایزو کراتیک و با استفاده از یک فاز متحرک ساخته شده از متانول/آب (با نسبت ۷۰ به ۳۰) و سرعت جریان معادل ۱/۱ میلی لیتر در دقیقه صورت گرفت (Dawood, 1988).

#### تجزیه آماری

داده‌های حاصل با آنالیز واریانس یکطرفه، تحت آزمون LSD با نرم افزار Spss بررسی شدند. نتایج آنالیز آمین‌های میکروبیولوژیکی و بیوژنی به صورت میانگین ارزش‌ها، با توجه به خطای استاندارد گزارش شدند.

## نتایج

تغییرات حاصل در کل شمارش باکتریایی (لگاریتم cfu/g) در ماهی *Otolithes ruber* در طول دوره ذخیره در جدول (۱) نشان داده شده است. شمارش‌های اولیه قابل رؤیت مزوفیلی و سایکروفیلی *Otolithes ruber* به ترتیب معادل ۳/۶ و ۲/۶ log cfu/g بودند. مجموع باکتری‌هایی مزوفیلی در ماهی‌های تازه و (در یخ) به اندازه یک واحد لگاریتمی در دوره اولیه (۳ روز) کاهش یافته و سپس به طور ثابت تا  $10^3 \text{cfu g}^{-1}$  در ۶ روز ذخیره افزایش یافت. کاهش اولیه در مجموع باکتری‌های مزوفیلی احتمالاً به دلیل تأثیر شوک سرما بوده است (Ingram, 1951) مجموع باکتری‌های سایکروتروفی که در ابتدا یک واحد لگاریتمی کمتر از باکتری‌های مزوفیلی بودند به طور ثابت در ذخیره افزایش یافتند و به سطحی معادل  $10^8 \text{cfu g}^{-1}$  در روز هیجدهم رسیدند. در بین مجموع باکتری‌های سایکروتروفی، ظرفیت باکتری‌ها در تولید آمین‌ها در ماهی در ابتدا بسیار کم بوده اما در طول دوره ذخیره به سرعت افزایش یافته و به سطح  $10^8 \text{cfu g}^{-1}$  رسید. افزایش معادل ۲ واحد لگاریتمی در مجموع بار مزوفیل‌ها و سایکروفیل‌ها به ترتیب در روزهای نهم و دوازدهم ذخیره مشاهده گردید. مجموع بار باکتریایی مزوفیلی و سایکروفیلی در روز پانزدهم و هیجدهم هیچ تفاوت معنی‌داری در سطح ۹۵ درصد نداشت ( $P \geq 0.05$ ).

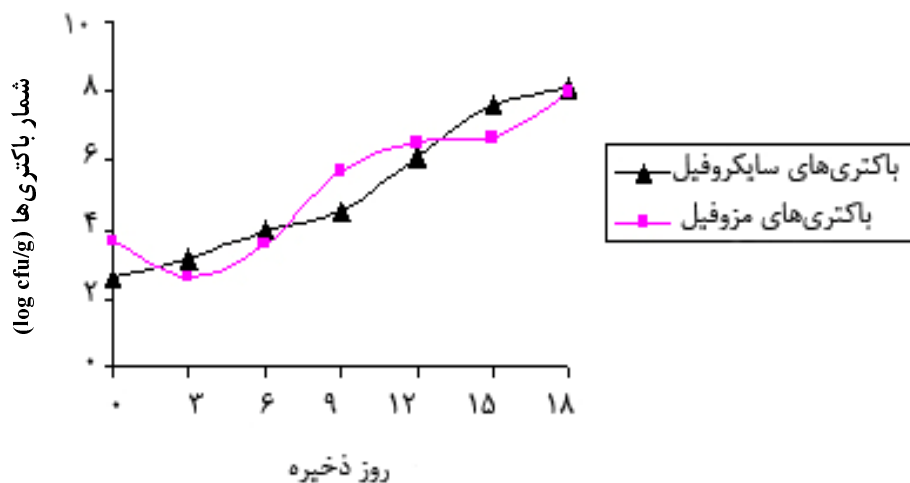
جدول ۱- مجموع شمارش باکتریایی در ماهی شوریده (*Otolithes ruber*) در طول دوره ذخیره در یخ بر حسب  $\log \text{cfu g}^{-1}$  (Mean±SD)

زمان ذخیره (d)	باکتری مزوفیلی	باکتری سایکروفیلی
۰	$3/60 \pm 0/19$	$2/60 \pm 0/42$
۳	$2/57 \pm 0/11$	$3/18 \pm 0/08$
۶	$3/58 \pm 0/15$	$3/97 \pm 0/42$
۹	$5/69 \pm 0/25$	$4/55 \pm 0/21$
۱۲	$6/51 \pm 0/02$	$6/09 \pm 0/07$
۱۵	$6/63 \pm 0/03$	$7/62 \pm 0/16$
۱۸	$7/95 \pm 0/00$	$8/09 \pm 0/12$

نتایج آزمون حداقل معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ ( $P < 0.05$ )

در طول دوره ذخیره اولیه به صورت نگهداری در یخ، یک واحد لگاریتمی کاهش در بار باکتریایی مزوفیلی دیده شد و سپس تا  $10^7 \text{cfu g}^{-1}$  در روز هجدهم افزایش یافت. در طول دوره ذخیره باکتری‌های سایکروتروفی تکثیر یافته و تعداد آنها غالب شد زیرا دمای کم بر رشد آنها تأثیر مثبت داشته و در روز هیجدهم تعداد آنها تا  $10^8 \text{cfu g}^{-1}$  افزایش یافت. تجزیه آماری تفاوت‌های معنی‌داری را بین بار اولیه و نهایی (روز هیجدهم) باکتریایی در شرایط یخ‌گذاری نشان داد ( $P < 0.05$ ). همبستگی زیادی ( $R^2 = 0.98$ ) بین بار باکتری‌های مزوفیلیکی ( $10^7$  در روز نهایی) و آمین بی‌وزنی هیستامین مشاهده گردید. تغییرات حاصل در بار کل باکتریایی مزوفیل و سایکروفیل در کل ماهی‌های ذخیره شده در شکل (۱) نشان داده شده است.

غلظت‌های پوترسین در ماهی *Otolithes ruber* نگهداری شده در یخ به مدت ۱۸ روز در جدول ۲ نشان داده شده است. هیستامین در روز اول (روز صفر) ذخیره آشکار نشده و برای اولین بار در روز پنجم ذخیره آشکار شد. تغییرات و نوسانات زیادی در سطوح هیستامین در سر تا سر دوره ذخیره در ماهی *Otolithes ruber* مشاهده گردید.



شکل ۱- نمودار میانگین بار باکتریایی مزوفیل و سایکروفیلی در ماهی *Otolithes ruber* در طول دوره ذخیره در یخ

جدول ۲- میانگین آمین بیوژن هیستامین در ماهی شوریده (*Otolithes ruber*) نگهداری شده در یخ (Mean±SD) (μgr/gr)

هیستامین	زمان ذخیره (روز)
غیر قابل تشخیص	۰
غیر قابل تشخیص	۳
۱/۴۹ ± ۰/۰۵	۶
۷/۶۳ ± ۰/۰۴	۹
۱۰/۰۲ ± ۰/۲۲	۱۲
۱۰/۳۷ ± ۰/۵۳	۱۵
۱۴/۲۱ ± ۰/۰۹	۱۸

سطح این آمین در طول ذخیره ۱۸ روزه افزایش یافت. دو ۱، ۲ در غلظت هیستامین در روزهای ۹ و ۱۸ ذخیره یعنی وقتی که بار باکتریایی مزوفیلی به ترتیب به ۱۰۵ و  $10^8 \text{cfu/g}^{-1}$  رسید. مشاهده گردید تجزیه آماری، تفاوت‌های معنی‌داری را بین اولین و آخرین روز ذخیره نشان داد.

## بحث و نتیجه‌گیری

در آنالیز انجام گرفته بر روی ماهی شوریده نگهداری شده در یخ هیستامین در روز اول تا پنجم آشکار نشد که دلیل احتمالی آن عدم بیان فعالیت باکتریایی مزوفیلیک تحت شرایط خاص ذخیره در این تحقیق می‌باشد. در تحقیق مشابهی ایجاد آمین بیوژنی و رابطه آنان با تغییرات حسی و میکروبی کل و بخش صاف شده (عبور داده شده از صافی) قزل‌آلای رنگین‌کمانی که به صورت نگهداری در یخ بود نشان داد که غلظت هیستامین در طول ۱۸ روز یعنی هنگامی که باکتری‌های مزوفیلی به سطحی معادل  $10^7 \text{cfu/g}^{-1}$  رسیدند افزایش یافت (Chytiri et al., 2004). هر چند گزارش‌هایی در دست است که نشان می‌دهند انواع و سطوح BAهای شکل گرفته به میکروفلورها و شمارش بستگی دارند (Vrciana-Noques et al., 1997). داهار و سیمارد در سال ۱۹۸۵ نشان دادند که در مورد گوشت گاو شمارش باکتریایی مزوفیلی همبستگی خوبی با ایجاد هیستامین دارد که با نتایج به دست آمده در این آزمایش در مورد ماهی *Otolithes ruber* تحت شرایط ذخیره منجمد سازگار می‌باشد. در تحقیقی نشان داده شده که باکتری‌های

مزوفیلی مسئول دکربوکسیلاسیون آمینو اسید هیستیدین هستند که منجر به ایجاد هیستامین می‌شود (Okuzumi *et al.*, 1990). در تحقیقی مشابه بهترین همبستگی بین هیستامین با بار باکتریایی مزوفیلی در قزل‌آلای رنگین‌کمانی در طول دوره ۱۸ روزه ذخیره به صورت منجمد تعیین گردید (منتظری، ۱۳۸۴). به طور کلی آمین‌ها در ماهی‌ها توسط باکتری‌های متعلق به خانواده انتروباکتریاسه مانند لاکتوباسیلوس و کلوستریدیوم ایجاد می‌شوند (Taylor, 1986). اما این مطلب فقط در مورد ماهی‌هایی صادق است که در دمای ۲۰ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند. در مورد ماهی‌هایی که در یخ ذخیره می‌شوند. باکتری‌های متعلق به خانواده انتروباکتریاسه (مزوفیلی) بسیار اندک بوده و بنابراین این گروه از باکتری‌های اصلی ایجادکننده آمین نیستند. از طرفی بیان شده که در دمای پایین باکتری‌های متعلق به خانواده انتروباکتریاسه در ایجاد آمین‌ها خیلی فعال نیستند (Moore *et al.*, 1986). هر چند، باکتری‌های متعلق به خانواده ویبر یوناسه، ویبریو، آئروموناس و فتو باکتریوم (سایکروفیلی) در ذخیره یخ، بقای خود را حفظ کرده، به کندی تکثیر یافته و به باکتری‌های غالب ایجادکننده آمین در مراحل بعدی در ماهی‌های ذخیره شده در یخ تبدیل می‌شوند. ارزشی از هیستامین معادل ۱۲ تا ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم که برای تمام قزل‌آلای رنگین‌کمانی که پس از ۱۲ روز ذخیره به دست آمد ممکن است به عنوان حد بالایی برای آغاز فساد (باز دارنده تازگی) در قزل‌آلای رنگین‌کمانی، در نظر گرفته شود که این مطلب براساس داده‌های حسی و میکروبیولوژیکی (مجموع شمارش زیست‌پذیر معادل  $10^6$  تا  $10^7$ ) عنوان می‌گردد (Chytiri *et al.*, 2004).

سطحی از هیستامین معادل ۵ میکروگرم در گرم اولین علامت فرآیندهای استفاده در عضله‌های ماهی است. (Rodriguez *et al.*, 1999). در این تحقیق، غلظت اولیه هیستامین معادل  $1/49$  میکروگرم در گرم بوده و در نهایت به  $14/21$  میکروگرم در گرم رسید یعنی زمانی که بار باکتریایی مزوفیلی به بیش از  $10^7 \text{cfug}^{-1}$  رسید و احتمالاً سطح پوترسین برای نشان دادن تازگی ماهی *Otolithes ruber* مناسب بود. هر چند گزارش‌های مختلفی حاکی از آن هستند که تفاوت‌هایی در ایجاد آمین‌ها در ماهی‌ها وجود دارد که عمدتاً به دلیل نوع و سطح میکروفلور موجود در ماهی است. عضله‌های ماهی سبب بقاء باکتری‌های ایجادکننده آمین بیوژن پس از مرحله قرارگیری در یخ می‌شوند که این نشان‌دهنده آن است که باکتری‌هایی که در محیط سرد تکثیر می‌یابند قادر به دکربوکسیله کردن آمینو اسیدها جهت ایجاد آمین‌ها می‌باشند. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که در مورد ماهی emperor، باکتری‌هایی تولیدکننده هیستامین و پوترسین می‌توانند در طول دوره ذخیره در یخ به بقا وجود ادامه دارد و به سرعت تکثیر یابند و در ایجاد آمین‌ها نقش داشته باشند (Lopez-sabater *et al.*, 1996). در این تحقیق به نظر می‌رسد که باکتری‌های غالب ایجادکننده آمین هیستامین عمدتاً به باکتری‌های مزوفیلی تعلق دارند. هر چند، جهت تعیین میزان سمیت تمام آمین‌های بیوژن و حفظ آنها در سطوح مطمئن در مواد غذایی مورد استفاده انسان، به تحقیقات بیشتری نیاز داریم.

## فهرست منابع

- منتظری، نعیم، ۱۳۸۴. اندازه‌گیری میزان تغییرات آمین‌های بیوژن و رابطه آنها با بار میکروبی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نگهداری شده در یخ. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد لاهیجان.
- Behling, A.R. & Taylor, S.L. 1982. Bacterial histamine production as a function of temperature and time of incubation. *J. Food Sci.*, 47: 1311-1317.
- Bjeldanes, L.F.; Shutz, D.E. & Morris, M.M. 1978. Etiology of scombroid poisoning. Potentiation of histamine toxicity in guinea pigs. *Food Cosmet. Toxicol.*, 16: 157-162.
- Chin, K. D. H. & Koehler, P. E. 1983. Identification and estimation of histamine, tryptamine, phenylethylamine and tyramine in soy sauce by thin-layer chromatography of dansyl derivatives. *Journal of Food Science*, 48: 1826-1828.
- Chytiri, S.; Paleologos, E.; Savvaidis, I.N. & Kontominas, M.G. 2004. Relation of biogenic amines with microbial and sensory changes of whole and filleted freshwater Rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) stored on ice. *Journal of Food Protection*, 67(5): 960-965.
- Daher, N.S. & Simard, R.E. 1985. Putrefactive amine changes in relation to microbial counts of ground beef during storage. *J. Food Protect.*, 48: 54-58.
- Dalgaard, P. 1995. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *Int. J. Food Microbiol.*, 26: 319-333.
- Dawood, A.A.; Karkalas, J.; Roy, R.N. & Williams, C.A. 1988. The occurrence of non-volatile amines in chilled-stored Rainbow trout (*Salmo irideus*). *Food Chem.*, 27, 33-45.
- Eitenmiller, R.; Orr, J. & Wallis, W. 1980. Histamine formation in fish: Microbiological and biochemical conditions. From *Chemistry and biochemistry of Marine Food Products* edited by R. Martin, Publisher-AVI, Connecticut, USA.
- Fernandez-Salguero, J. & Mackie, I.M. 1987. Comparative rates of spoilage of filets and whole fish during storage of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and herring (*Clupea herengus*) as determined by the formation of non-volatile amines. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 22: 385-390.
- Fleischer, H.R. 1979. Diamines and polyamines, Densitometry in thin layer chromatography: practice and applications John Wiley. New York, USA.
- Gram, L. & Huss, H.H. 2000. Fresh and processed fish and shellfish. In *The Microbiological Safety and Quality of Foods*. (Edited by Lund BM, Baird-Parker AC, Gould GW) Chapman & Hall. London, UK.
- Ingram, M. 1951. The effect of cold on microorganisms in relation to food. *Proc. Soc. Appl. Bacteriol.*, 14, 243-249.
- Koutsoumanis, K.; Lampropoulou, K. & George-John, E.N. 1999. Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) stored aerobically at 0, 8 and 150C. *J. Food Prot.*, 62: 398-402.
- Lopez-Sabater, E.I.; Rodriguez-Jerez, J.J.; Roig-Sagueus, A.X. & Mora-Ventura, M.A.T. 1996. Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning: effect of handling on the presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. *J. Food Prot.*, 57: 318-323.
- Middlebrooks, B.L.; Toom, P.M.; Douglas, W.L.; Harrison, R.E. & McDowell, S. 1988. Effects of storage time and temperature on the microflora and amine development in Spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*). *Journal of Food Science*, 53: 1024-1029.
- Mietz, J.L. & Karmas, E. 1978. Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster, and shrimp as an indicator of decomposition. *JAOAC*, 61(1): 139-145.



- Mietz, J.L. & Karmas, E. 1977. Chemical quality index of canned tuna as determined by high pressure liquid chromatography. *Journal of Food Science*, 42, 155-158.
- Moori, H.; Cann, D.C.; Taylor, L.Y. & Murray, C.K. 1986. Formation of histamine by luminous bacteria isolated from scombroid fish. *Bull. Jpn. Soc. Sci Fish.*, 52: 2135-2141.
- Okuzumi, M.; Fukumoto, I. & Fujii, T. 1990. Changes in bacterial flora and polyamine contents during storage of horse mackerel meat. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56: 1307-1312.
- Rodriguez, C.J.; Besteiro, I. & Pascual, C. 1999 Biochemical changes in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chilled storage. *J. Sci. Food Agric*, 79: 1473-1480.
- Shalaby, A.R. 1996. Significance of biogenic amines in food safety and human health, *Food Res. Int.* 29: 675-690.
- Silla-Santos, M.H. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *International J.Food Microbiology*, 29(2-3): 79-88.
- Staruszkiewicz Jr.; W.F. & Bond, J.F. 1981. Gas chromatographic determination of cadaverine, putrescine and histamine in food. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64: 584-591.
- Taylor, S.L., & Sumner, S.S. 1987. Determination of histamine, putrescine and cadaverine. In: *Seafood quality determination Elsevier Science Publishers Netherlands*.
- Taylor, S.L. 1986. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *Toxicol.*, 17: 91-117.
- Taylor, S.L. & Sumner, S.S. 1989. Determination of histamine, cadaverine and putrescine. In *Seafood Quality Determination* (Eds D.E. Kramer and J. Liston). Elsevier Science Publishers New York.
- Veciana-Nogues, 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 Agriculture and Food Chemistry*, 45: 2036-2041.
- Yamanaka, H. 1989. Changes in polyamines and amino acids in scallop adductor muscle during storage. *J. Food Sci.*, 54: 1113-1115.
- Yen, G., & Hsieh, C. 1991. Simultaneous analysis of biogenic amines in canned fish by HPLC. *Journal of Food Science*, 58: 158-180.
- Yoshinaga, D.H. & Frank, H.A. 1982. Histamineproducing bacteria in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 44: 447-452.