نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۵ شماره ۱/ سال ۱۳۹۴

تغییرات آمین‌های بیوژن و بارمیکروبی ماهی قزل آلای رنگین کمان طی نگهداری در شرایط دمایی یخ و انجماد

علی احسانی[1*]، سیده سمانه نقیبی[2]، محمد صدیق جسور[3] و زکریا وهابزاده [4]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۹ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۱۶

[1] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز– پژوهشکده آرتمیا و آبزیان دانشگاه ارومیه
[2] دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
[3] کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه
[4] استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
*مسئول مکاتبه: Email: a.ehsani@urmia.ac.ir

چکیده

آمین‌های بیوژن به عنوان مهمترین عامل مسمومیت‌های غذایی می‌باشند که از دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه توسط میکروب‌ها در مواد غذایی غنی از پروتئین تشکیل می‌گردند. در این بررسی، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به صورت کامل (شکم پر) به مدت دو روز در یخ و ۹۰ روز در فریزر نگهداری گردید. در روزهای ۰، ۱ و ۲ نگهداری در یخ و در روزهای ۳۰، ۶۰ و ۹۰ نگهداری در فریزر باکتری‌های مزوفیلیک، سرماگرا، سودوموناس و همچنین مقادیر آمین‌های بیوژن (پوترسین، کاداورین، هیستامین و تیرامین) شمارش و اندازه‌گیری شدند. بر اساس نتایج این مطالعه، باکتری‌های مزوفیلیک فراوان‌ترین باکتری‌های موجود در سطح ماهیچه قزل‌آلای تازه صید شده بودند. در طی مدت نگهداری در یخ و فریزر باکتری‌های سرماگرا، در سطح ماهیچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان غالب بودند ($P < ۰/۰۵$). در مدت نگهداری در یخ تغییرات قابل ملاحظه‌ای در مقادیر آمین‌های بیوژن مشاهده نگردید ($P > ۰/۰۵$). اما در پایان دوره نگهداری در فریزر کلیه آمین‌های بیوژن در مقایسه با نمونه‌های تازه به صورت معنی‌داری افزایش مقدار نشان دادند ($P < ۰/۰۵$). با توجه به نتایج حاصل از آزمون‌های میکروبی و شیمیایی، اگرچه ماندگاری ماهی قزل آلای رنگین کمان در شرایط مطالعه حاضر تا روز ۹۰ نگهداری در فریزر ایمن ارزیابی شد، اما به نظر می‌رسد که نگهداری تا روز ۶۰، دارای شرایط مطلوب‌تری برای مصرف‌کنندگان باشد. یک ارتباط قوی میان رشد باکتری‌ها و غلظت آمین‌های بیوژن مشاهده شد. بنابراین پیشگیری از وقوع یا افزایش آلودگی میکروبی در محصولات دریایی، بهترین راهکار جهت کنترل آمین‌های بیوژن است.

واژگان کلیدی: آمین‌های بیوژن، بار میکروبی، ماهی قزل‌آلا، دماهای نگهداری

مقدمه

آلودگی میکروبی و فساد شیمیایی مواد غذایی از جدی‌ترین مشکلات سلامت عمومی به شمار آمده و هر ساله خسارت هنگفتی به اقتصاد جامعه وارد می‌کند. حضور آمین‌های بیوژن و پلی‌آمین‌ها در مواد غذایی یکی از مهم‌ترین مخاطرات سلامتی در جهان است که در غذاهای مختلفی مانند ماهی، گوشت، پنیر و سبزیجات گزارش شده است (لورنزو و همکاران ۲۰۰۷).

غذاهای دریایی به عنوان یک منبع حیاتی در تامین مواد غذایی محسوب می‌گردند که به دلیل نقش مثبت این دسته از مواد غذایی بر سلامت انسان، توجه بسیاری از مصرف‌کنندگان را به خود جلب کرده‌اند (الینگورث و المن ۱۹۹۰؛ سیموپلوس ۱۹۹۷). با این حال، در سال‌های اخیر، به دلیل افزایش چشمگیر و رو به رشد تقاضا از سوی مصرف‌کنندگان، صنعت ماهی‌گیری و آبزی‌پروری به تنهایی قادر به پاسخگویی به نیاز جامعه نمی‌باشد. از طرف دیگر، ماهی به شدت مستعد فساد می‌باشد، زیرا می‌تواند به آسانی با باکتری‌های محیطی آلوده گردد. این امر موجب توجه هر چه بیشتر تولیدکنندگان به شناسایی تکنیک‌های کنترل بهداشتی و ارزیابی فاکتورهای ایجادکننده فساد جهت جلوگیری از ضایعات این محصولات در سرتاسر جهان شده است (فائو ۲۰۰۰؛ هو و فلتچر ۲۰۰۱).

آمین‌های بیوژن از طریق دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه توسط سویه‌های خاصی از باکتری‌ها در مواد غذایی دریایی تولید می‌شوند. باکتری‌های مولد فساد معمولا بر روی پوست، آبشش و دستگاه گوارش ماهی حضور دارند. میزان تولید این ماده به عواملی چون حضور سویه‌های خاص باکتریایی، سطح فعالیت آنزیم دکربوکسیلاز و همچنین میزان دسترسی باکتری به اسیدهای آمینه وابسته است. معمول‌ترین آمین‌های بیوژن یافت شده در مواد غذایی عبارتند از: هیستامین، تیرامین، کاداورین، ۲- فنیل اتیل آمین، اسپرمین، اسپرمیدین، پوترسین، تریپتامین و آگماتین (سوزی و گاردینی ۲۰۰۳؛ ریواس و همکاران ۲۰۰۸).

ماهی به عنوان یک ماده غذایی سرشار از اسیدآمینه، به شدت در معرض خطر آلودگی با آمین‌های بیوژن می‌باشد. در اکثر مطالعات به نقش کلیدی ماهیان خانواده تون ماهیان در حوادث مسمومیت با هیستامین اشاره شده است (تیلور ۱۹۸٦). بر اساس مطالعات انجام شده، ردیابی آمین‌های بیوژن یکی از مهمترین روش‌های ارزیابی کیفیت ماهی می‌باشد (کونل ۲۰۰۲).

بر اساس پیشنهاد معاونت غذا و دارو، مسمومیت با هیستامین معمولا پس از مصرف غذاهای دریایی حاوی هیستامین بویژه در غلظت‌های بالای ۵۰۰۰μg/100g رخ می‌دهد (اف. د. ا. ۱۹۸٦). علایم بالینی مسمومیت با هیستامین مشابه واکنش‌های آلرژی با سختی در تنفس، خارش، بثورات جلدی، استفراغ، تب و تغیرات فشارخون همراه است (هرناندز-جوور و همکاران، ۱۹۹۷؛ یانگمی ۲۰۰۹). همچنین این آمین‌ها در حضور نیترات به نیتروزآمین تبدیل می‌شوند که به طور بالقوه سرطان-زاست (کیم ۲۰۰۹).

هر چند، آمین‌های بیوژن بعنوان ترکیبات پایدار در برابر حرارت می‌باشند و قرار گرفتن در معرض پخت و پز و گرمای طولانی مدت سبب کاهش سمیت آنها نمی‌شود (گونزاگا و همکاران ۲۰۰۹؛ نایلا و همکاران ۲۰۱۰؛ تاپینگکاء و همکاران ۲۰۱۰). اما تولید آمین‌های بیوژن، یک فرآیند وابسته به دماست. به طوری‌که با کاهش درجه حرارت، رشد باکتری و همچنین فعالیت آنزیم دکربوکسیلاز مهار می‌گردد (دو و همکاران ۲۰۰۲؛ پرستر و همکاران ۲۰۰۹؛ ماه و هوانگ ۲۰۰۹). به همین ترتیب فرآیند انجماد نسبت به سردکردن جهت جلوگیری از تولید آمین‌های بیوژن موثرتر است (آرنولد و براون ۱۹۷۸).

علاوه بر این شرایط نگهداری، کیفیت مواد خام، روش-های عمل‌آوری محصول، میزان آلودگی با باکتری‌های دارای آنزیم دکربوکسیلاز فعال از عوامل موثر بر میزان

تولید آمین‌های بیوژن در مواد غذایی می‌باشند. بنابراین کیفیت ماهی به طور عمده به مدیریت شرایط حمل و نقل پس از صید وابسته است (کومپردا و همکاران ۲۰۰۱؛ ریواس و همکاران ۲۰۰۸).

همچنین می‌توان از روش‌هایی مانند استفاده از آنزیم یا باکتری‌های تجزیه‌کننده آمین‌های بیوژن و اعمال حرارت به منظور حذف باکتری‌های تولیدکننده آمین‌های بیوژن، غیرفعال‌سازی آنزیم دکربوکسیلاز، بسته‌بندی محصولات در اتمسفر اصلاح شده، اشعه دهی، فشار هیدرواستاتیک بالا و افزودن مواد نگهدارنده جهت کنترل یا حذف آمین‌های بیوژن در مواد غذایی استفاده نمود (ونداکون و ساکاگوچی ۱۹۹۵؛ برمر و همکاران ۱۹۹۸).

در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در زمینه شناسایی تکنیک‌های محدودکننده تولید و یا افزایش تخریب آمین-های بیوژن صورت گرفته است. با این حال این طور به نظر می‌رسد که تحقیقات گسترده‌تری جهت بهینه‌سازی چنین رویکردی موردنیاز است. در همین راستا، این مطالعه به منظور مشخص نمودن چگونگی بروز تغییرات بار میکروبی و شیمیایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نگهداری شده در دو دمای صفر و ۲٤ ^{o}C- و فاکتورهای تأثیرگذار بر ارزیابی کیفی آن انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

در این مطالعه، ۳٦ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به طور تصادفی از ماهیان تازه، سالم و هم‌اندازه صید شده از یکی از مزارع پرورشی حومه شهر ارومیه (آذربایجان غربی) انتخاب شدند. سپس نمونه‌ها در ظروف عایق پلی‌استیرنی حاوی یخ قرار داده شدند و در فاصله زمانی کمتر از ٦ ساعت به آزمایشگاه پژوهشکده آرتمیا و آبزیان (دانشگاه ارومیه)، منتقل گردیدند. نمونه‌ها به مدت ۲ روز در داخل ظروف عایق حاوی یخ (به نسبت ۱ به ۳، ماهی به یخ) نگهداری شدند. پس از طی این مدت بلافاصله شستشو شده و به طور جداگانه در کیسه‌های نایلونی مخصوص قرار داده شد و به مدت ۹۰ روز در فریزر (دمای ۲٤^{o}C-) نگهداری شدند.

اندازه‌گیری آمین‌های بیوژن

مواد شیمیایی مورد نیاز

تیرامین هیدروکلراید، پوترسین دی هیدروکلراید و کاداورین دی هیدروکلراید از شرکت سیگما (St. Louis, MO, USA) و استو نیتریل، آب HPLC، استون، اسیدکلریدریک، ۱و۷- دی آمینو هپتان، هیستامین دی هیدروکلراید و دانسیل کلراید از شرکت مرک (Darmstadt, Germany) خریداری شد.

آماده‌سازی نمونه برای تزریق در HPLC

آماده سازی نمونه با اندکی تغییرات در روش مورتل و کونته (۱۹۹٦) از طریق استخراج اسیدی و مشتق‌سازی صورت گرفت. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه بلافاصله به کمک تیغ اسکالپل پوست ماهیان از بافت‌های زیرین جداسازی و به مقدار ۱۰ گرم از قسمت های مختلف عضله پشتی ماهی مستقیماً در یک لوله سانتریفوژ وزن گردید و ۲۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۰/۱ مولار حاوی مقدار مشخص استاندارد داخلی (۱و۷- دی آمینو هپتان)، به آن اضافه شد. سپس به مدت ۲ دقیقه با استفاده از هموژنایزر (پلیترون) هموژن گردید. سوسپانسیون حاصل در دور rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در ٤^{o} C، سانتریفوژ گردید. مایع‌رویی جمع‌آوری گردیده و رسوب باقی مانده مجدداً با همان شرایط فوق سانتریفوژ شد و مایع رویی حاصل با قبلی مخلوط شده و با اسید کلریدریک ۰/۱ مولار به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

سپس استخراج با حلال آلی (بوتانول) هم انجام گردید. به این صورت که در یک لوله آزمایش ۵۰ میلی‌لیتری، استخراج اسیدی با ۵ میلی‌لیتر بوتانول مخلوط و به مدت ۲ دقیقه هموژن شد. این کار ۳ بار تکرار گردید. عصاره

حاصل با استفاده از Nacl اشباع شد و سپس با افزودن سود pH آن به ۱۱/۵ رسانده شد.

به منظور مشتق‌سازی نمونه‌ها، یک میلی‌لیتر استخراج آلی با ۲ قطره اسیدکلریدریک ۱ مولار مخلوط شده و تحت شرایط خلاء خشک گردید (LABORATA 4003, Heidolph). سپس ۱ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ مولار، ۵۰۰ میکرولیتر محلول اشباع بیکربنات سدیم و ۱ میلی‌لیتر از محلول دانسیل کلراید (۵ mg/mL) به آن اضافه شده و به انکوباتور منتقل گردید و مدت یک ساعت در دمای ۴۰°C نگهداری شد. در نهایت پس از خشک‌کردن تحت شرایط خلاء ۲ میلی‌لیتر استونیتریل به آن اضافه گردید، محلول حاصل فیلتر شده (VARIAN, bond Elut C18) و به ستون کروماتوگرافی تزریق گردید. این آزمون برای هر نمونه سه بار تکرار گردید.

شرایط کروماتوگرافی

جهت اندازه‌گیری آمین‌های بیوژن با HPLC از ستون ۵EC 150×4.6 NUCLEODUR C18 Gravity µm (ساخت کشور آلمان) استفاده شد. فاز متحرک ترکیبی از آب و استونیتریل بوده و پیک‌ها در ۲۵۴ نانومتر با استفاده از جذب کننده UV-VIS شناسایی شدند. برنامه شیب غلظت مورد استفاده با سرعت جریان ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه در جدول ۳-۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- برنامه شیب غلظت مورد استفاده برای آنالیز آمین‌های بیوژن

زمان (دقیقه)	استونیتریل (٪)	آب (٪)
۰	۵۰	۵۰
۱	۵۰	۵۰
۵	٦۵	۳۵
٦	۷۵	۲۵
۱۰	۸۰	۲۰
۱۵	۹۰	۱۰

بررسی‌های میکروبی

پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه بلافاصله سطح پوست ماهیان با الکل ۷۰ درجه و بتادین استریل شد. سپس به کمک تیغ اسکالپل پوست ماهیان از بافت‌های زیرین جداسازی و و پس از برداشت نمونه لازم جهت آزمون های شیمیایی، اقدام به جمع‌آوری کل بافت عضلانی ماهیان گردید.

در مرحله بعد به کمک دستگاه هموژن‌کننده (پولیترون، آلمان) بافت عضله یکنواخت شده به مقدار ۰/۵ گرم توزین و رقت سریال تهیه شد و پس از رقت‌سازی از هر کدام از رقت‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و داخل پلیت ریخته و همزمان محیط کشت مناسب (در دمای ۴۵ °C) را در شرایط استریل به پلیت اضافه نموده و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در شرایط هوازی انکوبه شدند.

برای شمارش کلی مزوفیل‌ها از محیط کشت آگار مغذی[1] (مرک، آلمان) در دمای ۳۷°C و برای شمارش کلی سرماگراها از محیط کشت کینگ براث[2] (مرک، آلمان) در دمای ۲۰°C و برای شمارش کلی سودوموناس‌ها و یا باکتری‌هایی که در این محیط کشت رشد می‌کنند از محیط کشت سیتریماد آگار[3] (مرک، آلمان) در دمای ۳۷ °C استفاده گردید. این آزمون برای هر نمونه سه بار تکرار گردید. بعد از رشد کلنی باکتری‌ها، شمارش کلنی‌ها به صورت دقیق انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ به طور توصیفی و تحلیلی انجام پذیرفت. به منظور تحلیل داده‌ها از آزمون کولموگراف- اسمیرنوف، آزمون آزمون تحلیل واریانس یکطرفه در قالب طرح آماری فاکتوریل کاملاً تصادفی استفاده گردید. همچنین برای تعیین تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در تیمارهای مختلف از آزمون

1-Nutrient-agar
2-King-agar B
3-Cetrimid-agar

دانکن استفاده گردید. α=0.05 به عنوان سطح معنی‌دار آماری، مد نظر قرار گرفت. برای ترسیم جداول و نمودارها به ترتیب از نرم‌افزارهای Word و Excel (نسخه ۲۰۱۰) استفاده شد.

نتایج و بحث

تغییرات آمین‌های بیوژن در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

نتایج حاصل از ارزیابی مقادیر آمین‌های بیوژن در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی دوره نگهداری در جدول ۲ نشان داده شده است. بر طبق نتایج مقادیر تیرامین، هیستامین، کاداورین و پوترسین در نمونه های تازه صید شده به ترتیب برابر ۱/۶۹، ۰/۶۱، ۶/۳۲ و ۱۰/۹۵ میکروگرم به ازای هر گرم گوشت بود. در طی دوره نگهداری در یخ تغییرات قابل ملاحظه‌ای در مقادیر آمین-های بیوژن مشاهده نگردید (P>0.05) اما در پایان دوره نگهداری در فریزر کلیه آمین‌های بیوژن در مقایسه با نمونه‌های تازه به صورت معنی‌داری افزایش مقدار را نشان دادند (P<0.05) به طوری که در پایان دوره مقادیر تیرامین، هیستامین، کاداورین و پوترسین به ترتیب به سطوح ۱۸/۸۳، ۲۵/۹۸، ۴۱/۰۲ و ۵۳/۸۰ میکروگرم در هر گرم گوشت رسید.

بر اساس مطالعات انجام شده، افزایش مقدار پوترسین به بیش از ۵ µg در هر گرم عضله ماهی قزل‌آلا به عنوان نقطه آغاز واکنش‌های تخریب بافتی در نظر گرفته شده است (رودریگوئز و همکاران ۱۹۹۹). کیترینی و همکاران (۲۰۰۴) بر اساس اطلاعات میکروبیولوژی و حسی، سطوح آمین‌های بیوژن تولید شده در ماهی قزل‌آلا را در طی مدت نگهداری در یخ مورد بررسی قرار دادند و غلظت پوترسین در محدوده کمتر از ۱۴ µg در هر گرم عضله را به منظور اطمینان از سلامت فرآورده، تائید نموده‌اند. در این مطالعه اگر چه پوترسین شناسایی شده در طی روزهای نگهداری در یخ به سرعت افزایش یافت اما در حد مجاز ارزیابی شد. در ادامه نگهداری در فریزر غلظت پوترسین علی‌رغم مدت طولانی‌تر نسبت به زمان نگهداری در یخ، تا روز ۶۰ تغییرات چشمگیری نداشت. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که دمای انجماد تا حدودی بر روند تولید آن تاثیر گذاشته است. در مجموع با توجه به افزایش قابل توجه پوترسین در هر مرحله در مقایسه با سایر آمین‌های بیوژن، ردیابی آن به عنوان یک شاخص تغییرات کیفی در ماهی قزل‌آلا پیشنهاد شده است (رضایی و همکاران ۲۰۰۷).

جدول ۲- میانگین مقادیرآمین‌های بیوژن ماهی قزل آلا (SD±)

تیمار	تیرامین	هیستامین	کاداورین	پوترسین
نمونه تازه	۱/۶۹ [a] (۰/۰۶)	۰/۶۱ [a] (۰/۱۹)	۶/۳۲ [a] (۰/۲۸)	۱۰/۲۹ [a] (۱/۷۹)
روز اول نگهداری در یخ	۲/۴۱ [ab] (۰/۲۷)	۰/۶۷ [a] (۰/۵۷)	۶/۸۴ [a] (۰/۴۱)	۱۰/۴۹ [a] (۱/۰۲)
روز دوم نگهداری در یخ	۲/۴۵ [ab] (۰/۱۵)	۰/۷۳ [a] (۰/۴۱)	۹/۴۱ [a] (۲/۸۱)	۱۰/۷۱ [a] (۰/۸۹)
روز ۳۰ نگهداری در فریزر	۳/۱۸ [abc] (۰/۷۸)	۰/۷۹ [a] (۰/۳۰)	۱۰/۲۴ [a] (۱/۵۷)	۲۰/۷۷ [b] (۲/۲۱)
روز ۶۰ نگهداری در فریزر	۴/۰۶ [ac] (۰/۵۱)	۰/۹۶ [a] (۰/۲۲)	۲۶/۷۶ [b] (۲/۳۳)	۲۹/۹۷ [c] (۳/۳۴)
روز ۹۰ نگهداری در فریزر	۱۸/۸۳ [d] (۱/۲۵)	۲۵/۹۸ [b] (۳/۹۶)	۴۱/۰۲ [c] (۵/۲۹)	۵۳/۸۰ [d] (۳/۸۰)

- داده های فوق بر حسب µg/g می‌باشند. اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P < 0.05).

در مطالعه حاضر، میانگین غلظت کاداورین در پایان دوره یخ‌گذاری ۹/۴۱ µg در هر گرم عضله ماهی بود. در مطالعه انجام شده بر روی ماهیان کپور غلظت کاداورین در طی مدت نگهداری در شرایط خلا اندازه‌گیری شد. بر این اساس میزان کاداورین موجود در عضلات بسیار زیاد و در حدود ۹۲/۵ µg.g بود (کریزک و همکاران ۲۰۰۳). کمترین غلظت کاداورین (در حدود ۰.۵ µg در هر گرم عضله) در ماهیان قزل‌آلای یخ زده گزارش شده است (داوود و همکاران ۱۹۸۸). تولید کاداورین همزمان با شروع فساد آغاز می‌گردد و به طور پیوسته و مرتبط با میزان تولید هیستامین، تغییرات بافت عضلانی، فعالیت

میکروبی و بوهای نامطلوب افزایش می‌یابد. بنابراین حضور کاداورین می‌تواند به عنوان بهترین شاخص برای تشخیص مراحل ابتدایی و تاخیری فساد در نظر گرفته شود (رودریگوئز و همکاران ۱۹۹۹؛ آنتونی ۲۰۰۱).

بر اساس نظریات محققین، آلودگی محصولات دریایی با تعداد اندکی از باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه به همراه مقادیر جزئی از اسیدآمینه هیستیدین به عنوان پیش‌ساز، جهت تولید هیستامین کافی می‌باشد. البته به دلیل فعالیت پروتئازهای اندوژن، غلظت هیستیدین آزاد در عضلات ماهی پس از مرگ به شدت افزایش می‌یابد (بودمر و همکاران ۱۹۹۹). در یک مطالعه انجام شده بر روی ماهیان قزل‌آلا، غلظت هیستامین در روز ۱۸ نگهداری در یخ حدود ۱/٦μg در هر گرم ماهی ارزیابی شد (رضایی و همکاران ۲۰۰۷). بر اساس نتایج این مطالعه علیرغم حضور هیستامین در نمونه‌های تازه، غلظت آن در طی دوره نگهداری در یخ و حتی تا روز ٦۰ نگهداری در فریزر تفاوت چندانی در مقایسه با نمونه‌های تازه نداشت که این خود دلیل دیگری بر تاثیر مثبت انجماد بر میزان تولید آمین‌های بیوژن می‌باشد. اتحادیه اروپا بیشترین حد قابل قبول هیستامین را ۱۰ میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم عضله ماهی تعیین نموده است (لهانه ۲۰۰۰). بنابراین با توجه به این معیار غلظت هیستامین نمونه‌های مورد بررسی حتی در روز ۹۰ نیز قابل قبول است. بر اساس مطالعات انجام شده از آنجایی که هیستامین تنها در مراحل انتهایی نگهداری تولید می‌شوند، بنابراین هیستامین نمی‌تواند به عنوان یک شاخص مناسب در ارزیابی تازگی ماهی قزل‌آلا مطرح باشد (کیترینی و همکاران ۲۰۰٤).

بررسی مطالعات نشان می‌دهد که اگرچه هیستامین اغلب در ماهیان تون یافت می‌گردد، اما سایر آمین‌های بیوژن در همه انواع ماهی قابل شناسایی است. دلیل این امر شاید به این خاطر باشد که یا شانس آلودگی با باکتری‌های تولیدکننده هیستامین نسبت به سایر باکتری‌های مولد فساد کمتر است و یا شرایط نگهداری جهت رشد و بقای باکتری‌های تولیدکننده هیستامین، نامطلوب است (کیترینی و همکاران ۲۰۰٤).

در این مطالعه علیرغم تفاوت ظاهری در غلظت تیرامین شناسایی شده در نمونه‌های نگهداری شده در یخ نسبت به نمونه‌های تازه، این تفاوت معنی‌دار نبود و قابل اغماض بود. در مطالعه انجام شده توسط رضایی و همکاران غلظت تیرامین در نمونه‌های قزل‌الای نگهداری شده در یخ در طی یک دوره ۱۸ روزه صفر بود (رضایی و همکاران ۲۰۰۷).

در مجموع، مطالعات انجام شده نشان دادند که غلظت هر کدام از آمین‌های بیوژن وابسته به جمعیت باکتریایی غالب در آن نمونه می‌باشد (هوانگ و همکاران ۱۹۹۹). بر اساس مطالعات صورت گرفته غلظت پوترسین و کاداورین در طی مدت نگهداری ماهی قزل‌آلا به طور معنی‌داری بیشتر از سطوح هیستامین و تیرامین افزایش می‌یابد (روئیز-کاپیلاس و مورال ۲۰۰۱؛ ازوگل و همکاران ۲۰۰۲). این نتایج با نتایج حاصل از مطالعه حاضر هم‌خوانی داشت.

تغییرات بار میکروبی در ماهیچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

تغییرات بار میکروبی ماهیچه قزل‌آلای رنگین‌کمان نگهداری شده در یخ و فریزر در جدول ۳ نشان داده شده است. همانطور که مشخص است باکتری‌های مزوفیلیک فراوان‌ترین باکتری‌های موجود در ماهیچه قزل‌آلای تازه صید شده می‌باشند. نگهداری ماهی قزل‌آلا در یخ نشان داد که بار میکروبی افزایش یافت و در طول نگهداری در فریزر ابتدا کاهش ($P<0.05$) و سپس افزایش بار میکروبی مشاهده گردید ($P<0.05$). در پایان دوره نگهداری در فریزر باکتری‌های سرماگرا فراوان‌ترین باکتری‌های مشاهده شده در ماهیچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بودند.

جدول ۳- میانگین فلور باکتری در ماهیچه ماهی قزل‌آلا (SD±)

نوع باکتری	زمان (روز)					
	نمونه تازه	۱ یخ	۲ یخ	۳۰فریزر	۶۰ فریزر	۹۰ فریزر
مزوفیلیک	۳/۱۰ ab (۰/۴۶)	۴/۲۵ bc (۰/۴۰)	۴/۳۲ c (۰/۲۶)	۲/۴۲ a (۰/۱۱)	۳/۶۳ bc (۰/۷۶)	۵/۶۶ d (۰/۱۷)
سرماگرا	۲/۰۲ a (۰/۱۳)	۳/۹۴ b (۰/۳۱)	۴/۷۴ c (۰/۰۴)	۴/۴۵ c (۰/۱۸)	۴/۷۴ c (۰/۱۷)	۶/۶۵ d (۰/۱۱)
سودوموناس	۰/۰۰ a (۰/۰۰)	۲/۳۰ b (۰/۶۲)	۲/۴۵ bc (۰/۲۷)	۰/۰۰ a (۰/۰۰)	۲/۴۵ bc (۰/۲۳)	۳/۲۰ c (۰/۱۴)

داده‌های فوق برحسب log CFU/g می‌باشند. اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($P < 0.05$).

در مطالعه صورت گرفته توسط کیترینی و همکاران در سال ۲۰۰۴، شمارش باکتری‌های مزوفیل ابتدایی در ماهیان قزل‌آلای کامل (بدون خروج احشا) و فیله شده به ترتیب ۲/۵ log cfu. Cm^2 و ۳/۸ log $cfu.cm^2$ بود. بر اساس حد مجاز پیشنهاد شده توسط ICSMF[1] در سال ۱۹۹۸، شمارش کلی باکتری‌های مزوفیل هوازی در درجه حرارت ۳۰ درجه $cfu.cm^2$ log ۷ تعیین شده است (ازوگل و همکاران ۲۰۰۲). در مطالعه دیگری تعداد باکتری‌های مزوفیل در فیله‌های ماهی قزل‌آلا نگهداری شده در درجه حرارت ۳ ^oC، ۵/۳ log $cfu.cm^2$ گزارش شد (گونزالز- رودریگوئز و همکاران ۲۰۰۱).

در این مطالعه، باکتری‌های مزوفیل در نمونه‌های تازه و روز اول نگهداری در یخ باکتری غالب بود. این روند احتمالا به دلیل این بوده که در طی این مدت درجه حرارت کلی عضله ماهی مناسب رشد باکتری‌های ساکروفیل نبوده است. چنانچه در ادامه نگهداری در یخ و سپس دمای ۲۴- ^oC تعداد باکتری‌های سرماگرا افزایش یافت. از نتایج ارائه شده در این تحقیق می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که مرحله نگهداری در یخ تاثیری بر روند رشد باکتری‌های مزوفیل ندارد. به دلیل اینکه سرما بصورت سطحی اعمال می‌شود و به بخش‌های عمقی عضلات ماهی نفوذ نمی‌کند.

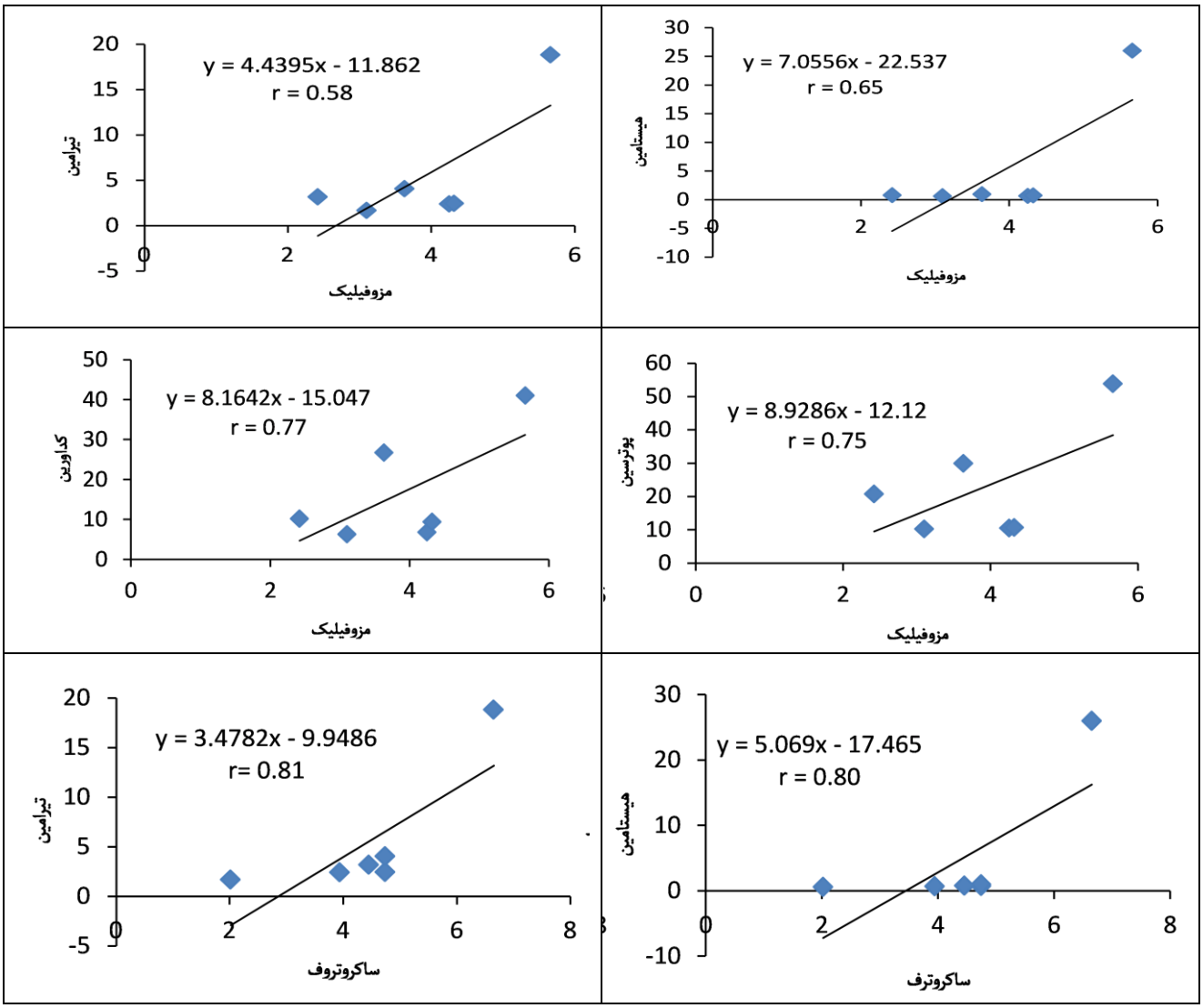
کوتسومانیس و همکاران (۱۹۹۹) و دروسینوس و نیکاس (۱۹۹۶)، گزارش کردند که جمعیت میکروبی ماهی‌های نگهداری شده در شرایط هوازی ترکیبی از باکتری‌های سرماگرا گرم منفی و اکسیداز مثبت و سودوموناس می‌باشد. باکتری سودوموناس یکی از باکتری‌های مولد فساد می‌باشد که به عنوان باکتری غالب در ماهیان آب‌های مناطق معتدل و استوایی، ماهی‌های مدیترانه‌ای نگهداری شده در شرایط انجماد و یا یخ صفر درجه، شناخته شده است (گرم و هاس ۱۹۹۶؛ لیما دوس سانتوس ۱۹۸۱؛ گیلسپی ۱۹۸۱). بر اساس نظریه محققین میکروارگانیسم‌های سرماگرا یک رقیب قوی برای رشد باکتری سودوموناس محسوب می‌گردد (کوتسومانیس و همکاران ۱۹۹۹). در مطالعه حاضر تعداد باکتری‌های سودوموناس شمارش شده در نمونه‌های تازه و روز ۳۰ انجماد در محیط عضله برابر صفر بود که احتمالا این فاز تاخیری، نتیجه مهار رقابتی توسط باکتری‌های سرماگرا می‌باشد. ضمن اینکه نباید احتمال حضور باکتری‌های مولد فساد دیگری را که در این تحقیق بررسی نشده اند و اثر مهاری بر روند رشد سودوموناس دارند، نادیده گرفت.

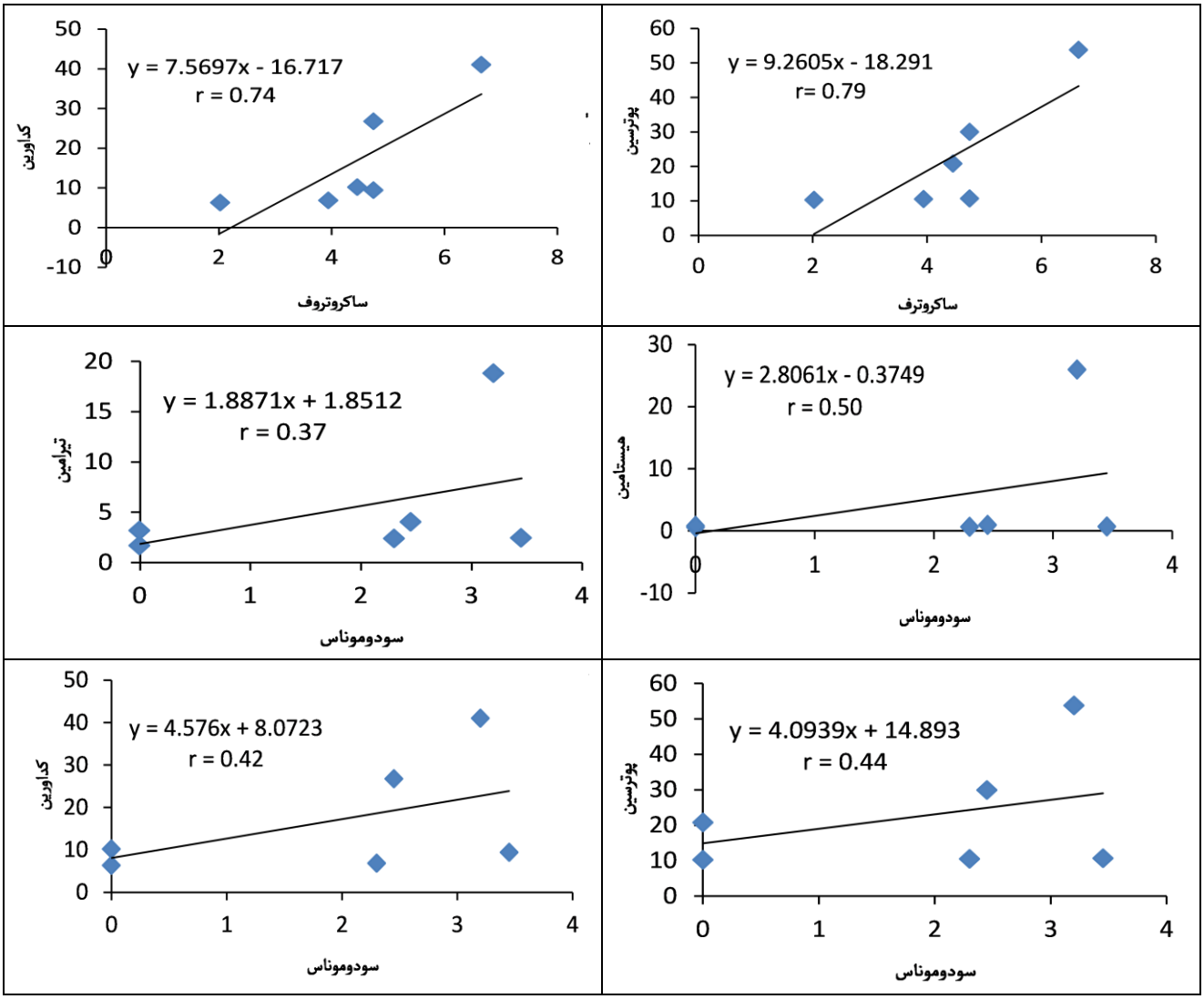
رضایی و همکاران (۲۰۰۷)، در یک تحقیق نشان دادند که اگرچه باکتری‌های مزوفیل و سودوموناس در مدت ۲ روز نگهداری در یخ رشد نکردند، اما تعداد باکتری‌های سرماگرا افزایش یافت (رضایی و همکاران ۲۰۰۷). در این مطالعه، بررسی چگونگی رشد باکتری‌های سرماگرا نشان داد که با استثنای یک کاهش جزئی در روند رشد در زمان ورود به فریزر، در هر دو مرحله نگهداری در یخ و انجماد رشد این دسته از باکتری‌های با یک روند صعودی همراه بوده است. کاهش جزئی رشد، احتمالا به دلیل وقوع شوک سرمایی در اثر تغییرات دمایی ناشی از ورود به شرایط انجماد می‌باشد. ضمن اینکه این دسته از

[1]- International Commission on Microbiological Specifications for Foods

باکتری‌ها اگرچه می‌توانند در دماهای پایین رشد کنند، اما سرعت رشدشان نسبت به باکتری‌های سرماگرا کمتر بوده و معمولا تحت شرایط انجماد با یک کاهش فراوانی روبرو می‌گردند. با توجه به اطلاعات حاصل از آزمون‌های میکروبی و شیمیایی، اگرچه ماندگاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در شرایط مطالعه حاضر تا روز ۹۰ نگهداری در فریزر ایمن ارزیابی شد. با توجه به نتایج حاصل از آمین‌های بیوژن به نظر می‌رسد که مصرف آن تا روز ٦٠ نگهداری دارای شرایط مطلوب تری برای مصرف‌کنندگان باشد.

همانطور که در شکل ۱ قابل ملاحظه است، تولید هیستامین (r=0.80)، تیرامین (r=0.81) و پوترسین (r=0.79) به طور قابل توجهی با میزان حضور باکتری‌های سرماگرا در فیله‌های ماهی مورد مطالعه در ارتباط می‌باشد. همبستگی معنی‌داری میان محتوی کاداورین (r=0.77) فیله‌ها و تعداد باکتری‌های مزوفیلیک مشاهده شد. از نتایج حاصل از این مطالعه چنین بر می‌آید که تازگی و ماندگاری ماهی بر اساس مشخصات میکروبی، شیمیایی و حسی آن ارزیابی می‌گردد. پوترسین و کاداورین مهمترین شاخص جهت ارزیابی کیفی ماهی بودند. یک ارتباط قوی میان رشد باکتری‌ها و غلظت آمین‌های بیوژن وجود دارد. بنابراین پیشگیری از وقوع یا افزایش آلودگی میکروبی در محصولات دریایی، بهترین راهکار جهت کنترل آمین‌های بیوژن است.





شکل ۱- میزان تولید آمین‌های بیوژن در ارتباط با بار میکروبی ماهی

منابع مورد استفاده

Antoine FR, 2000. Development of biogenic amines in mahi-mahi (*Coryphaena hippum*) and their correlation with sensory evaluation, total volatile base-nitrogen, and precursor free amino acids. Ph.D. Dissertation. University of Florida Gainesville pp: 1-159.

Arnold SH, and Brown WD, 1978. Histamine toxicity from fish products. Advances in food research. New York: Academic Press Inc 24:113-154.

Bodmer S, Imark C, and Kneubühl M, 1999. Biogenic amines in foods: histamine and food processing. Jornal of Inflammation Research 48(6): 296-300.

Bremer PJ, Osborne CM, Kemp RA, van Veghel P, and Fletcher GC, 1998. Thermal death times of Hafnia alvei cells in a model suspension and in artificially contaminated hot-smoked kahawai (Arripis trutta). Jornal of Food Protect 61(8): 1047-1051.

Chytiri S, Chouliara I, Savvaidis IN, and Kontominas MG, 2004. Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. Jornal of Food Microbiology 21(2): 157-165.

Connell JJ, 2002. Quality Control In Fish Industry. Torry Advisory Note. 1st Edition. London, 58p.

Dawood AA, Karkalas J, Roy RN, and Williams CS, 1988. The occurrence of non-volatile amines in chilled-stored rainbow trout (*Salmo irideus*). Jornal of Food Chemistry 27(1): 33-45.

De Las Rivas B, Gonzalez R, Landete J M, and Munoz R, 2008. Characterization of a second ornithine decarboxylase isolated from Morganella morganii. Jornal of Food Protection 71(3): 657-661.

Drosinos EH, and Nychas GJE. 1996. Brochothrix thermosphacta, a dominant organism in Mediterranean fresh fish (*Sparus aurata*) stored under modified atmosphere. Italian Jornal of Food Science 4: 323–329.

Du WX, Lin CM, Phu AT, Cornell JA, Marshall MR, and Wei CI, 2002. Development of biogenic amines in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*): effect of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. Jornal of Food Science 67(1):292–301.

Ehsani A, and Jasour MS, 2012. Microbiological properties and biogenic amines of whole pike-perch (Sander lucioperca, Linnaeus 1758): a perspective on fish safety during postharvest handling practices and frozen storage. Jornal of Food Science 77 (12): M664-M668.

FAO, 2000. The state of word fisheries and aquaculture. Rome, Italy: FAO 2000. Informhttp://www.fao.org/DOCREP/003/X8002E/X8002E00.htm.

Food and Drug Administration (FDA), 1996. Decomposition and histamine in raw, frozen tuna and mahi mahi, canned tuna and related species. Compliance Policy Guides 7108(240): 504-535.

Gillespie NC, 1981. A Numerical Taxonomic Study of Pseudomonas-like Bacteria Isolated from Fish in Southeastern Queensland and their Association with Spoilage. Jornal of Applied Microbiology 50(1): 29-44.

Gonzaga VE, Lescano AG, Huaman AA, Salmon-Mulanovich G, and Blazes DL, 2009. Histamine levels in fish from markets in Lima, Peru. Jornal of Food Protection 72(5): 1112-1115.

Gonzalez-Rodriguez, MN, Sanz JJ, Santos JA, Otero A, and Garcia-Lopez ML, 2001. Bacteriological quality of aquacultured freshwater fish portions in prepackaged trays stored at 3C. Jornal of Food Protection 64(9): 1399-1404.

Gram L, and Huss HH, 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. International Jornal of Food Microbiology 33(1): 121-137.

Hernández-Jover T, Izquierdo-Pulido M, Veciana-Nogués MT, Mariné-Font A, and Vidal-Carou M C, 1997. Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. Jornal of Agriculture and Food Chemistry 45(6): 2098-2102.

Hew CL, and Fletcher, GL, 2001. The role of aquatic biotechnology in aquaculture. Jornal of Aquaculture 197(1): 191-204.

Hwang DF, Chen TY, Chang SH, Chou SS, Deng JF, and Chai TJ, 1999. Biogenic amines and bacterial isolates of marlin implicated in food poisoning. Jornal of Food Science and Agriculture Chemistry 1(3): 223-228.

Illingworth D, and Ullmann D, 1990. Effects of omega-3 fatty acids on risk factors for cardiovascular disease. In: Lees R, Karel M, Editors. Omega-3 fatty acids in health and disease. New York, USA and Basel, Switzerland: Marcel Dekker, p. 39–69.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1998. Microorganisms in Foods, Microbial Ecology of Food Commodities. Baltimore: Blackie Academic and Professional.

Kim MK, Mah JH, and Hwang HJ, 2009. Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. Jornal of Food Chemistry 116(1): 87-95.

Komprda T, Neznalova J, Standara S, and Bover-Cid S, 2001. Effect of starter culture and storage temperature on the content of biogenic amines in dry fermented sausage poličan. Jornal of Meat Science 59(3): 267-276.

Koutsoumanis K, Lampropoulou K, and Nychas GJE, 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 15 °C. Jornal of Food Protection 62(4): 398-402.

Křížek M, Vácha F, Vorlová L, Lukášová J, and Cupáková Š, 2003. Biogenic amines in vacuum-packed and non-vacuum-packed flesh of carp (*Cyprinus carpio*) stored at different temperatures. Jornal of Food Chemistry 88(2): 185-191.

Lehane L, 2000. Update on histamine fish poisoning. Medical Jornal of Australia 173(3): 149-152.

Lima dos Santos CAM, 1981. The storage of tropical fish in ice - a review. Jornal of Tropical Science 23: 97–127.

Lorenzo J M, Martínez S, Franco I, Carballo J, 2007. Biogenic amine content during the manufactur of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product: Effect of some additives. Jornal of Meat Science 77(2): 287-293.

Mah JH, and Hwang HJ, 2009. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. Jornal of Food Control 20(9): 796-801.

Moret S, and Conte LS, 1996. High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods an analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. Jornal of Chromatography A 729(1): 363-369.

Naila A, Flint S, Fletcher G, Bremer P, and Meerdink G, 2010. Control of biogenic amines in food—existing and emerging approaches. Jornal of Food Science 75(7): R139-R150.

Özogul F, Taylor K D A, Quantick P, and Özogul Y, 2002. Changes in biogenic amines in herring stored under modified atmosphere and vacuum pack. Jornal of Food Science 67(7): 2497-2501.

Prester L, Macan J, Varnai V M, Orct T, Vukušić J, and Kipčić D, 2009. Endotoxin and biogenic amine levels in Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*), sardine (*Sardina pilchardus*) and Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) stored at 22 C. Food Additives & Contaminants 26(3): 355-362.

Rezaei M, Montazeri N, Langrudi H E, Mokhayer B, Parviz M, and Nazarinia A, 2007. The biogenic amines and bacterial changes of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stored in ice. Jornal of Food Chemistry 103(1): 150-154.

Rodriguez CJ, Besteiro I, and Pascual C, 1999. Biochemical changes in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chilled storage. Jornal of Science Food Agriculture 79(11): 1473-1480.

Ruiz-Capillas C, and Moral A, 2001. Production of biogenic amines and their potential use as quality control indices for hake (*Merluccius merluccius*, L.) stored in ice. Jornal of Food Science 66(7): 1030-1032.

Simopoulos A, 1997. Nutritional aspects of fish. In: Luten J, rrensen T, Oehlenschla J, Editors. Seafood from producer to consumer, integrated approach to quality. 2nd Ed. London, UK: Elsevier Science, p. 589–607

Suzzi G, and Gardini F, 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. International Jornal of Food Microbiology 88(1): 41-54.

Tapingkae W, Tanasupawat S, Parkin KL, Benjakul S, and Visessanguan W, 2010. Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from high salt-fermented fishery products. Enzyme and Microbial Technology 46(2): 92-99.

Taylor SL, and Eitenmiller RR, 1986. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. CRC Crc Critical Reviews in Toxicology 17(2): 91-128.

Wendakoon CN, and Sakaguchi M, 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of Enterobacter aerogenes by active components in spices. Jornal of Food Protection 58(3): 280-283.

Yongmei L, Xiaohong C, Mei J, Xin L, Rahman N, Mingsheng D, and Yan G, 2009. Biogenic amines in Chinese soy sauce. Jornal of Food Control 20(6): 593-597.

Changes of biogenic amines and microbial load in rainbow trout during storage at conditions of ice and Freezing

A Ehsani *[1], SS Naghibi [2], MS Jasour [3] and Z Vahabzadeh [4]

Recived: February 28, 2014 Accepted: January 06, 2015

[1]Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition, Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran- Artemia and Aquatic Animals Research Institute, University of Urmia, Urmia, Iran
[2]PhD Student. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
[3]MSc, Department of Biotechnology and Quality Control, Artemia and Aquatic Animals Research Institute, University of Urmia, Urmia, Iran
[4]Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
*Corresponding author: E mail: a.ehsani@urmia.ac.ir

Abstract

Biogenic amines as one of the most common forms of food intoxication which are produced by microbial decarboxylation of amino acids in protein-rich foods such as fish. In this survey, the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a whole (stuffed) were kept during 2-d icing and 90-d frozen storage (−24 °C). On the days 0, 1 and 2 of ice storage and on the days 30, 60 and 90th of frozen storage period, the mesofilic bacteria, psychrotrophic, and Pseudomonas spp and also the amounts of biogenic amines (tyramine, histamine, cadaverine, and puterscine) were counted and measured. Based on results of this study, most common bacteria in the muscles of freshly caught trout. During periods of ice storage and freezer, psychrophilic bacteria were dominanted in the surface of muscle from rainbow trout ($P < 0.05$). In the term of kept on ice, insignificant changes were observed in the amounts of biogenic amines ($P > 0.05$). Nevertheless, at the end of frozen storage period all biogenic amines showed a significant increase when compared with fresh samples ($P \leq 0.05$). Based on results of microbial and biochemical tests, although it could be concluded that rainbow trout can be consumed without any health risks after 2 days icing condition and 90 days frozen storage, but it seems the high quality of rainbow trout was approximately by 60th day of frozen storage. A strong relationship was observed between the growth of bacteria and concentration of biogenic amines. Thus, preventing of occurrence or enhancing microbial contamination in seafood was the best strategy to control biogenic amines.

Key words: Biogenic amines, Microbial load, Rainbow trout, Temperatures of storage