

MONIKA FONBERG-BROCZEK, DOROTA SAWILSKA-RAUTENSTRAUCH, BOŻENA WINDYGA, HALINA ŚCIEŻYŃSKA, MAŁGORZATA JĘDRA, PAWEŁ BADOWSKI, BOGUMIŁA URBANEK-KARŁOWSKA

## ZAWARTOŚĆ HISTAMINY I TYRAMINY W ZALEŻNOŚCI OD JAKOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ ŚLEDZI SOLONYCH, PRZECHOWYWANYCH W RÓŻNYCH TEMPERATURACH

HISTAMINE AND TYRAMINE CONTENT DEPENDING ON MICROBIOLOGICAL QUALITY OF SALTED HERRINGS STORED AT DIFFERENT TEMPERATURES

Zakład Badania Żywności i Przedmiotów Użytku  
Państwowy Zakład Higieny  
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24  
Kierownik: doc. dr hab. K. Karłowski

*Zbadano 26 próbek śledzi solonych, pochodzących z rynku warszawskiego. Śledzie w zalewie o wysokiej zawartości soli przechowywano przez 21 dni, a płaty śledziowe nisko-solone przez 42 dni, w temperaturze 4°C i 22°C. Oznaczano zawartość amin biogennych – histaminy i tyraminy oraz poziom zanieczyszczeń mikrobiologicznych.*

*W próbkach śledzi nisko-solonych poziom histaminy wzrastał do 35 mg/kg a poziom tyraminy aż do 318 mg/kg. Wzrost zawartości amin był proporcjonalny do okresu przechowywania. W czasie przechowywania tych próbek nastąpił wzrost mikroflory tlenowej do 10<sup>6</sup>/g. W próbkach śledzi wysoko-solonych nie zaobserwowano zwiększenia zawartości amin ani zmian jakości mikrobiologicznej w czasie ich przechowywania.*

### WSTĘP

Spośród amin biogennych występujących w środkach spożywczych histamina najczęściej jest wymieniana jako ta, która może powodować zachorowania lub zatrucia pokarmowe. Może ona powstawać w rybach w wyniku aktywności enzymatycznej bakterii produkujących oksydazę diaminową [2], głównie takich, jak *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Clostridium*, enterokoki i bakterie kwasu mlekowego. Obok histaminy w rybach występują inne aminy biogenne takie jak tyramina, putrescyna, kadaweryna, spermina i spermidyna [15]. Uważa się, że aminy te zwiększają toksyczność histaminy [12], albo też mogą same być czynnikami etiologicznymi zatruć pokarmowych. Z danych piśmiennictwa wynika, że zawartość amin biogennych zależy od aktywności enzymów bakteryjnych [3, 4, 9, 16, 25, 28] oraz od warunków przechowywania ryb, głównie temperatury [1, 14, 18]. Wyższa temperatura przechowywania sprzyja rozwojowi drobnoustrojów oraz przyspiesza procesy autolizy tkanki mięśniowej ryb, a w związku z tym może być przyczyną wzrostu zawartości amin biogennych.

W Unii Europejskiej zawartość histaminy przyjęto jako wskaźnik świeżości i jakości surowca rybnego. Zgodnie z Dyrektywą Unii Europejskiej Nr 91/493/EEC [5] średni poziom histaminy w 9 próbkach pobranych z partii ryb surowych lub konserw rybnych nie może przekraczać 100 mg/kg produktu a zawartość histaminy w zakresie od 100 do 200 mg/kg może występować w dwóch próbkach, natomiast w żadnej próbce poziom ten nie może przekraczać 200 mg/kg produktu. W przypadku produktów rybnych fermentowanych przyjęto graniczną wartość dwukrotnie wyższą (200–400 mg/kg). Podobne wymagania dla śledzi solonych zostały zaproponowane przez Komisję Kodeksu Żywnościowego na 24 sesji Komitetu ds. Ryb i Przetworów Rybnych w Genewie w roku 2000. Wyżej wymienione dokumenty nie uwzględniają zawartości tyraminy i innych amin biogennych [13].

Celem pracy było zbadanie jakości mikrobiologicznej śledzi solonych, pobranych z rynku warszawskiego, przechowywanych w solankach o różnej zawartości soli, z jednoczesnym oznaczeniem w tych próbkach zawartości histaminy i tyraminy.

#### MATERIAŁ I METODY

Próbki śledzi wysoko-solonych (12 próbek całych śledzi w zalewie) – o zawartości soli w mięsie powyżej 14% – pobrano z rynku, patroszono a następnie przechowywano w solance o zawartości soli 26% przez 1, 2 i 3 tygodnie, w temperaturze 4°C lub temperaturze pokojowej wahającej się w zakresie 20–25°C, średnio 22°C.

Próbki śledzi nisko-solonych (14 próbek płatów śledziowych bez skóry, w zalewie) – zawartości soli w mięsie 6%, przetrzymywano w solance o zawartości soli 16%, przez 1, 4 i 6 tygodni.

Poziom zanieczyszczeń mikrobiologicznych oznaczano metodami obowiązującymi w badaniu produktów rybnych, zgodnie z odpowiednimi normami metodycznymi ISO i POLONAIIS [10, 11, 19, 20, 21, 22]. Ogólną liczbę drobnoustrojów tlenowych mezofilnych oznaczono na agarze wzbogaconym, liczbę bakterii z grupy coli na pożywce VRBL, enterokoki na pożywce *Slanetza* i *Bartley'a* oraz bakterie kwaszące na pożywce MRS o pH 5,7.

Oznaczanie zawartości amin wykonywano metodami spektrofotometrycznymi: histaminy po oczyszczeniu ekstraktu i reakcji sprzęgania z aldehydem ortoftalowym (OPT) wg metody AOAC [23], zgodnej z PN 90-A-86786 [6, 7] i tyraminy wg metody *Vidal Carou*, z własną modyfikacją, po oczyszczeniu na kolumnie i przeprowadzeniu reakcji z 2-nitrozo-beta-naftolem [8, 27].

Biegłość laboratorium w zakresie metody spektrofotometrycznej AOAC została sprawdzona w 2002 r. w badaniach międzynarodowych w systemie FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme, Sand Hutton, UK).

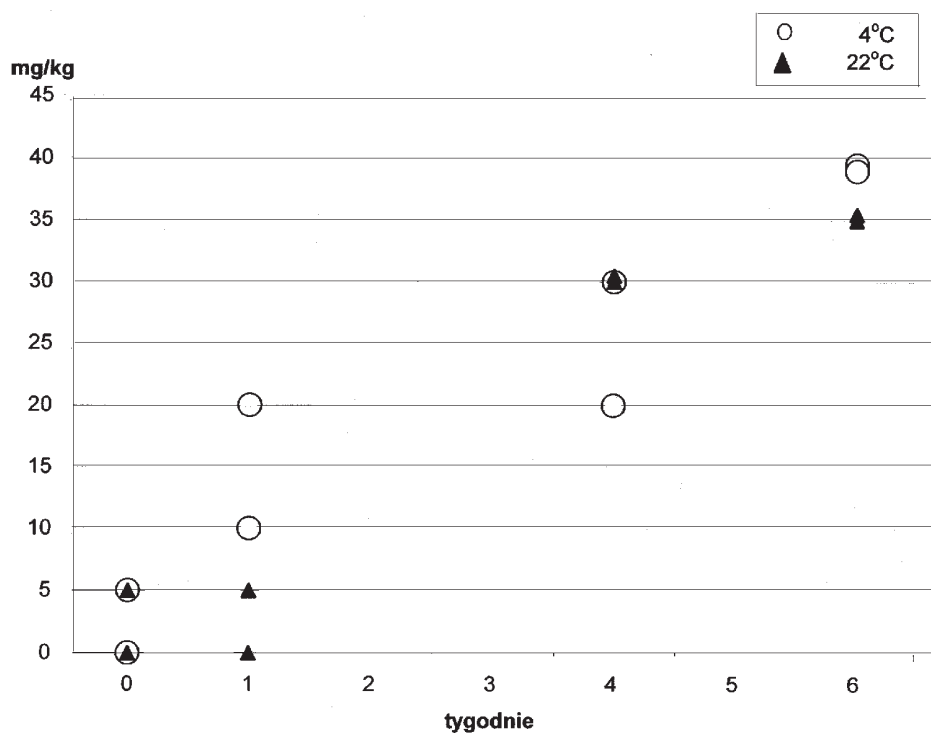
#### WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wyniki oznaczeń w próbkach śledzi wysoko-solonych zebrano w tabeli I. W próbkach pobranych z rynku stwierdzono obecność mikroflory mezofilnej na poziomie  $5,3 \times 10^2$  i  $7,6 \times 10^3$ /g. W próbkach przechowywanych do 3 tygodni w temperaturze 4°C i 22°C, ogólna liczba drobnoustrojów była zbliżona do tych wartości, nieznaczny wzrost – do  $2,8 \times 10^4$ /g zaobserwowano po 3 tygodniach. Podobne tendencje stwierdzono w przypadku zanieczyszczenia mikroflorą psychrofilną, utrzymującą się w granicach  $1,3 \times 10^2$  –  $8,4 \times 10^3$ /g. W żadnej próbce nie wykryto bakterii z grupy *coli*, enterokoków i bakterii kwaszących.

Oznaczone w tych próbkach poziomy amin były niskie i wynosiły od 7,0 do 22,0 mg/kg histaminy i od 0 do 20,0 mg/kg tyraminy.

Tabela I.

Wyniki badania śledzi nisko-solonych przedstawiono w tabeli II. W płatach śledziowych przechowywanych w zalewie o mniejszej, w porównaniu z grupą poprzednią, zawartości soli, niezależnie od temperatury przechowywania, już po 1 tygodniu stwierdzono wzrost mikroflory tlenowej do poziomu od  $10^5$  do  $10^6$ /g. Poziom ten z nieznacznymi wahaniami utrzymał się we wszystkich dłużej przechowywanych próbkach. Niższa temperatura w niewielkim stopniu hamowała wzrost bakterii. Po 4 i 6 tygodniach przechowywania w temp.  $4^{\circ}\text{C}$  zaobserwowano w próbkach wzrost mikroflory psychrofilnej do poziomu  $10^5$ – $10^6$ /g, a po upływie 6 tygodnia przechowywania w temp.  $22^{\circ}\text{C}$  – nieznaczny wzrost liczby bakterii z grupy *coli*. Bakterii tych nie wykryto w żadnej próbce przechowywanej w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ . W pobranych próbkach śledzi nisko-solonych, w przeciwieństwie do wysoko-solonych, stwierdzono obecność bakterii kwaszących, w ilości  $1,4 \times 10^3$  i  $9,0 \times 10^3$ /g. W próbkach przechowywanych w temperaturze  $22^{\circ}\text{C}$  obserwowano tendencję do zwiększenia liczby tych bakterii nawet do  $3,5 \times 10^5$ .

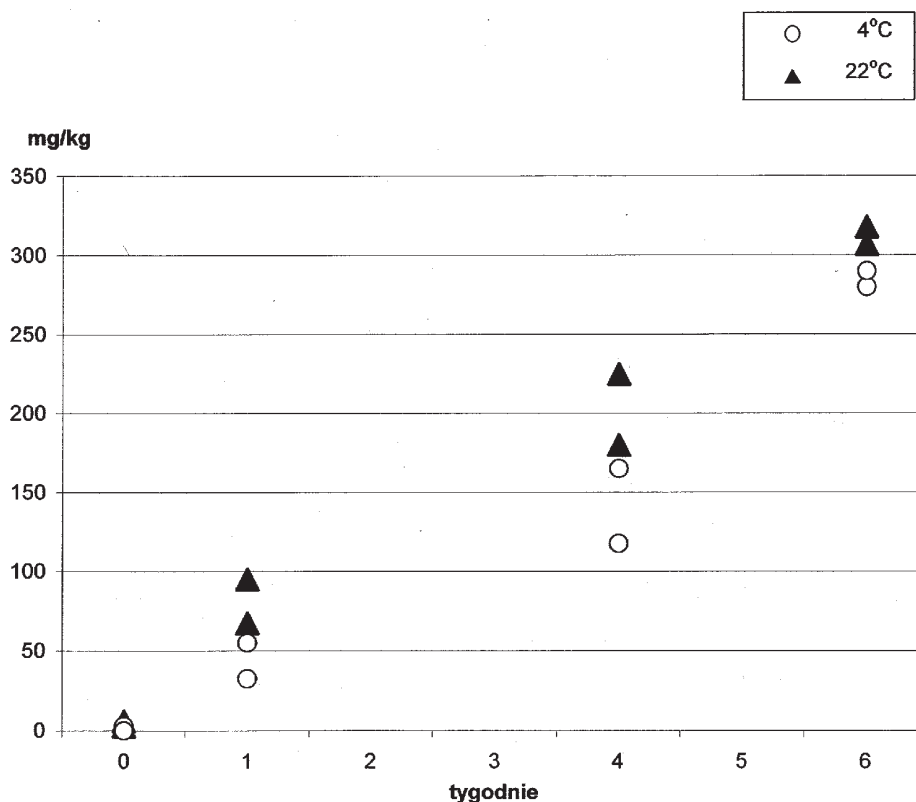


Ryc. 1. Wzrost zawartości histaminy w śledziach nisko-solonych w zależności od czasu i temperatury przechowywania.

Low-salted herrings – histamine content dependent on period and temperature of storage.

Zawartość amin w śledziach nisko-solonych przechowywanych w solance zwiększyła się, osiągając maksymalne poziomy: histaminy – 39 mg/kg, tyraminy – 318 mg/kg. Różnice w zawartości amin w próbkach przechowywanych 1, 4 i 6 tygodni w tempera-

Tabela II.



Ryc. 2. Wzrost zawartości tyraminy w śledziach nisko-solonych w zależności od czasu i temperatury przechowywania.

Low-salted herrings – tyramine content dependent on period and temperature of storage.

turze pokojowej lub 4°C przedstawiono na rycinach 1 i 2. Zarówno w przypadku histaminy (ryc. 1) jak i tyraminy (ryc. 2) poziom amin w próbce był proporcjonalny do czasu jej przechowywania. Znaczna różnica temperatury przechowywania nie spowodowała wyraźnych różnic w narastaniu zawartości amin.

Jednocześnie, w miarę upływu czasu przechowywania wzrastała też ogólna liczba drobnoustrojów, przy czym w śledziach nisko-solonych był to wzrost bardzo szybki, już po tygodniu liczebność mezofili była taka jak w śledziach wysoko-solonych po upływie 3 tygodni. Wyniki badań wskazują, że poziom amin może mieć związek ze stopniem zanieczyszczenia mikrobiologicznego, zależność taka była wyraźna szczególnie w przypadku tyraminy. Uzyskane wyniki nie pozwoliły jednak łączyć wzrostu zawartości amin z żadną z badanych grup bakterii.

Podobną korelację między wzrostem liczby bakterii a poziomem tyraminy w płatach śledziowych nisko-solonych zaobserwowali *Nieper* i *Stockemer* [17]. Autorzy ci stwierdzili, że zawartość tyraminy w śledziach nisko-solonych, gotowych do spożycia typu

matias i typu skandynawskiego przekraczała pod koniec okresu przydatności spożycia 700 mg/kg.

Wysoka zawartość histaminy w spożywanych rybach była wielokrotnie odnotowana jako przyczyna zatruc pokarmowych, toteż ustawodawstwo wielu krajów określa jej maksymalną, dopuszczalną zawartość w produktach rybnych. W żadnej z badanych próbek zawartość histaminy nie przekraczała dopuszczalnego w kraju poziomu 200 mg/kg [24].

Zawartość tyraminy wynosząca 200 mg/kg środka spożywczego może także, jak wynika z piśmiennictwa [26], wywołać niekorzystne objawy: bóle głowy, migreny, niebezpieczny wzrost ciśnienia krwi, szczególnie u osób wrażliwych lub przyjmujących leki z grupy inhibitorów MAO.

W związku z obserwowanym w prezentowanych badaniach wzrostem poziomu tyraminy w śledziach nisko-solonych, który pod koniec okresu przechowywania (6 tygodni) przekraczał 300 mg/kg produktu oraz sugerowanym przez licznych autorów wzmocnieniem przez tę aminę działania histaminy, wydaje się celowe oznaczanie obu tych amin w rybach i przetworach rybnych, ze szczególnym uwzględnieniem śledzi nisko-solonych w końcowym okresie ich przydatności do spożycia.

#### WNIOSKI

1. Śledzie przechowywane w solance o zawartości soli 26% zachowały dobrą jakość mikrobiologiczną nawet w temperaturze pokojowej. Poziom amin w tych rybach nie zwiększył się.

2. Solanka o zawartości soli 16% nie zabezpieczyła śledzi przed gwałtownym zwiększeniem liczby bakterii, które nastąpiło w ciągu tygodnia przechowywania, zarówno w temperaturze 22°C jak i 4°C. Zawartość amin w tych śledziach zwiększyła się proporcjonalnie do długości okresu przechowywania.

3. Uzyskane wyniki wykazują, że poziom tyraminy w przechowywanych przez 4 tygodnie śledziach nisko-solonych przekroczył 200 mg/kg, co wskazuje na celowość badań jej obecności w rybach i przetworach rybnych.

M. Fonberg-Broczek, D. Sawilska-Rautenstrauch, B. Windyga,  
H. Ścieżyńska, M. Jędra, P. Badowski, B. Urbanek-Karłowska

#### HISTAMINE AND TYRAMINE CONTENT DEPENDING ON MICROBIOLOGICAL QUALITY OF SALTED HERRINGS STORED AT DIFFERENT TEMPERATURE

#### Summary

Twenty six samples of salted herring from Warsaw food market were analyzed. Herrings in high-salted brine (with 26% content of salt) were stored for 21 days at temperature of 4°C and 22°C; low-salted (16% content of salt in brine) herring were stored for 42 days at temperature of 4°C and 22°C. Microbiological contamination level was assessed by standard methods for fish products, and biogenic amines – histamine and tyramine content by spectrofluorometric methods.

There was no level change of both amines in high-salted herrings. Significant increase of tyramine content was observed in low-salted samples, depending on the time of storage. The highest level of tyramine up to 318 mg/kg – was observed after 6 weeks of storage. Histamine content increased in low-salted samples up to 35 mg/kg during the period of storage.

Aerobic microflora in the amount up to  $10^6$ /g was detected during storage of low-salted samples. Such level changes were not observed in high-salted herring samples.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Ben-Gigirey B., Vieites Baptista de Souza J.M., Villa T.G., Barris-Velasquez J.: Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *J. Food Prot.* 1998, 61, 608.
2. Beutling D., Peconek J.: Eigenschaften halophiler Bakterien, isoliert von Slazheringen. *Archiv. für Lebensmittelhygiene* 46, 25–48, 36.
3. Bouverette P., Male K.B., Loung J.H.T., Gibbs B.F.: Amperometric biosensor for diamine using diamine oxide purified from porcine kidney. *Enz. Micr. Technol.* 1996, 20, 32.
4. Draisci R., Marchiafova C.A., Palleschi L.A.R., Covalli S.: Biogenic amines in semipreserved anchovies as affected by processing. *Int. J. Food Sci.* 1999, 11, 347.
5. Dyrektywa UE Nr 91/493/EEC, Council Directive of 22 July Laying down the health condition for the production and the placing on the market of fishery products; (c) 1996 The Commission of the European Communities.
6. Fonberg-Broczek M., Windyga B., Kozłowski J., Sawilska-Rautenstrauch D., Kahl S.: Oznaczenie histaminy w konserwach rybnych metodą spektrofluorometryczną. *Roczn. PZH* 1988, 39, 226.
7. Fonberg-Broczek M., Sawilska-Rautenstrauch D., Windyga B.: Oznaczenie histaminy w konserwach rybnych metodą fluorometryczną, przy użyciu aparatu Spekol 10. *Roczn. PZH* 1991, 42, 65.
8. Fonberg-Broczek M., Sawilska-Rautenstrauch D.: Zawartość histaminy i tyraminy w serach dojrzewających. *Roczn. PZH* 1995, 46, 243.
9. Halasz A., Barath A., Simon-Sarkadi A., Holzapfel W.: Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trend Food Sci.* 1994, 5, 42.
10. ISO 6730; 1995 Microbiology. Enumeration of Colony – forming units of psychrotrophic microorganisms – colony count technique at 6.5°C.
11. ISO 4832, 1991 Microbiology. General guidance for the enumeration of coliforms – Colony count technique.
12. Jędra M.: Wpływ podawania histaminy na aktywność oksydazy dwuaminowej w nerkach i poziom histaminy w moczu. *Roczn. PZH* 1989, 43, 277.
13. Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission, Twenty-fourth Session, Geneva 2–7 July 2000, Alinorm 01/18.
14. Koutsoumanis K., Lampropoulou K., Nychas G.J.E.: Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt – head sea bream (*Sporus aurata*) stored aerobically at 0.8 and 15 degree C. *J. Food Prot.* 1999, 62, 398.
15. Lebedziński A., Lamperczyk H., Ganowiak Z., Eller K.I.: Differences in biogenic amine in fish obtained from commercial sources. *Z. Lebens. Unt. Forsch.* 1991, 192, 240.
16. Leuschner R.G.K., Hammes W.P.: Formation of biogenic amine in mayonnaise, hering and tuna fish salad by lactobacilli. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 1999, 50, 159.
17. Nieper L., Stockemer J.: Zum Verderb von Heringsfilets nach Matjesart unter besonderer Berücksichtigung der Bildung biogener Amine. *Archiv. Lebens.* 46, 3, 66–67, 3.
18. Peconek J., Szczawiński J., Fonberg-Broczek M., Sawilska-Rautenstrauch D., Windyga B.: Rola bakterii halofilnych w procesie dekarboksylacji histydyny w rybach solonych. *Roczn. PZH* 1997, 48, 139.
19. PN-89/A-86730. Ryby i przetwory rybne. Badania mikrobiologiczne.
20. PN-A-82055–17; 1997: Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne. Oznaczenie liczby bakterii kwasu mlekowego.



21. PN-A-82055-7; 1994: Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne. Wykrywanie obecności i oznaczanie liczby enterokoków.
22. PN-A-82055-6; 1994 Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie ogólnej liczby drobnoustrojów.
23. *Rogers P.L., Staruszkiewicz W.*: Gas chromatographic method for putrescine and cadaverine in canned tuna and mahimahi and fluorometric method for histamine (Minor Modification of AOAC Official Method 977.13). Collaborative Study. *J. AOAC Int.* 1997, 80, 591.
24. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dn. 27.12.2000 r. w sprawie wykazu dopuszczalnych ilości substancji dodatkowych i innych substancji obcych dodawanych do środków spożywczych lub używek, a także zanieczyszczeń, które mogą znajdować się w środkach spożywczych lub używkach (Dz.U.RP z dn. 5.02.2001 r. Nr 9, poz. 72).
25. *Shin H. Kim, Givery B., Barris-Velazquez J., Price R.J., Haejung A.*: Histamine and biogenic amine production by *Morganella morganii* isolated from temperature abused albacore. *J. Food Prot.* 2000, 63, 244.
26. *Stratton J.E., Rovert V., Taylor S.*: biogenic amines in cheese and other fermented foods. A review. *J. Food Prot.* 1991, 54, 460.
27. *Vidal-Carou M.C., Colony Salcedo R., Marine-Font A.*: Histamine and tyramine in Spanish wines: relationship with total sulfur dioxide level, volatile acidity and malo-lactic fermentation intensity. *Food Chem.* 1990, 35, 217.
28. *Yatsunami K., Echigo T.*: Studies on halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria. III. Changes in the number of halotolerant histamine forming bacteria and contents of non-volatile amines in sardine meat with addition of NaCl. *Bull. Jap. Soc. Fish* 1993, 59, 123.

Otrzymano: 2002.04.02