Potential risk of biogenic amine formation in carp muscle (*Cyprinus carpio*)

Kordiovská, P., Vorlová, L., Karpíšková, R.[1]*, Lukášová, J.*[†]
Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
[1]Centrum hygieny potravinových řetězců Brno, Státní zdravotní ústav Praha
[†] deceased on June 2004

Abstract

Biogenic amines are organic, basic nitrogenous compounds of low molecular weight, usually formed by the enzymatic decarboxylation of specific amino acids due to microbial enzymes or tissue activity. In stored meat, amines are generated by the action of spoilage bacteria decarboxylases. Biogenic amines at low concentrations are essential for many physiological functions, while ingestion of large amounts may result in health problems. The reasons for the determination of amines in food are primarily their potencial toxicity and the second the possibility of using them as food quality markers. Biogenic amines in fish can serve as indicators of decomposition. In contrast with the number of laboratories examining changes in biogenic amine content in sea fish, freshwater fish have not been studied yet. The objective of present work was to learn how the different storage temperatures (3 ± 2°C; 24 °C and –18 ± 1°C) can affect the quality of carp muscle (*Cyprinus carpio*) as determined by microbiological assessment, and development of some biogenic amines. Total viable counts, coliform bacteria count and psychrotrophic viable count were investigated. A high-performance liquid chromatography method involving pre-column derivatisation with dansylchloride was optimized for the identification and determination of selected biogenic amines.
The changes of fish quality were determined by increasing of bacteria counts as well as by biogenic amines production in carp muscle. Putrescine, cadaverine, spermidine, spermine and tyramine were detected in different concentrations, depending on the storage temperatures. When fish became unsuitable for human consumption, toxicological levels of histamine were detected.
Biogenic amines production can be used in conjunction with microbial counts and sensory panels to evaluate the spoilage degree in carp muscle during the storage. Cadaverine and putrescine are the amines most significantly correlated with total counts. These amines could be used as freshness indicators.

Úvod

Biogenní aminy jsou v nízkých koncentracích přirozenou součástí řady potravin. Vznikají v procesu výroby a skladování enzymovými reakcemi tkáňového nebo mikrobiálního původu (Suhaj a Kováč, 1996). Ve vyšším množství se nachází ve fermentovaných výrobcích jako jsou sýry, trvanlivé salámy, pivo, víno, kysané zelí aj., kde vznikají mikrobiální činností. Působením kontaminující mikroflóry vznikají hlavně v rybách a v mase během skladování. Vysoké koncentrace se vyskytují u potravin v pokročilém stupni kažení (Velíšek, 2002). Biogenní aminy se tak stávají jedním z ukazatelů kvality potravin. Sledování těchto látek je významné jednak z hlediska

ovlivnění zdravotní nezávadnosti potravin a jednak z hlediska možnosti posoudit kvalitu potravin (Kalač a Křížek, 2002)
Velká pozornost je v souvislosti s biogenními aminy věnována rybímu masu. Zastoupení jednotlivých biogenních aminů u ryb je různé. Z toxikologického hlediska největší riziko představuje histamin, jehož výskyt ve svalovině ryb je podmíněn koncentrací volného histidinu (Kalač a Křížek, 2002). Pro rybí maso je ve Vyhlášce č. 305/2004 Sb. v platném znění určeno přípustné množství pouze pro histamin, a to hodnotou 100 $mg.kg^{-1}$ (u 2 vzorků z 9 možné překročit tuto hodnotu max. o 100%). Zvýšené množství biogenních aminů v potravě může po konzumaci vyvolávat prudké fyziologické odezvy, u vnímavějších osob může dojít až k těžkým migrénovým stavům
Monitoring obsahu histaminu však nemůže nahradit v kontrole senzorické a bakteriologické zkoušky (Suhaj a Kováč, 1996).
V předkládané studii byl ověřován vliv různých skladovacích teplot na dynamiku tvorby vybraných biogenních aminů u svaloviny kapra obecného ve vztahu k mikrobiální kontaminaci. Byly sledovány celkové počty mikroorganismů, koliformní a psychrotrofní bakterie.

Materiál a metodika

Vzorky (n = 240) a (n = 150) získány ze 40, resp. 25 čerstvě zabitých kaprů (*Cyprinus carpio*) pocházejících z výlovů v Rybníkářství Pohořelice, resp. z tržní sítě. Kapři byli vykucháni a a rozděleni na 6 dílů, které byly následně skladovány při třech teplotách (chladírenské [3 ± 2°C], pokojové [24°C] a mrazírenské [-18 ± 1°C]). Doba skladování byla 0, 2, 4 a 7 dní při chladírenské teplotě, 2 dny při pokojové teplotě a 3 měsíce při mrazírenské teplotě. K analýzám byly vzorky odebírány z dané teplotní skupiny v jednotlivých intervalech (0., 2., 4. a 7. den nebo po 3 měsících). V každé skupině bylo vyšetřeno 40 vzorků.

Mikrobiologické analýzy: Celkové počty mikroorganismů (CPM) byly stanoveny dle ČSN ISO 4833 (1995), počty koliformních bakterií dle ČSN ISO 4832 (1995) a počty psychrotrofních bakterií dle ČSN ISO 6730 (1996).

Stanovení biogenních aminů (dle Paulsen et al., 1997): HPLC na reverzní fázi s fluorescenční detekcí (*EX=330 nm, *EM=500 nm) v gradientovém režimu; mobilní fáze, gradient (viz tabulka 1); průtok 1 ml/min; nástřik 10 μl; T_K=35°C

Tabulka 1. Gradient mobilní fáze

mobilní fáze:		gradient:		
A	B	čas (min.)	A (%)	B (%)
900 ml 0,02 M CH_3COOH 100 ml acetonitrilu	900 ml 0,02 M CH_3COOH 450 ml acetonitrilu 450 ml methanolu	0-3	40	60
		3-6	30	70
		6-9	20	80
		9-13	10	90
		13-18	0	100
		18-20	10	90
		20-22	20	80
		22-24	30	70
		24-26	40	60

Výsledky a diskuse

Výsledky měření vzorků:

- průměrné počty CPM, koliformních a psychrotrofních bakterií u kaprů pocházejících z výlovů skladovaných při různých podmínkách jsou uvedeny v tabulce 2, u kaprů pocházejících z tržní sítě v tabulce 3
- množství biogenních aminů v $mg.kg^{-1}$ u ryb pocházejících z výlovů v jednotlivých dnech skladování je uvedeno v tabulce 4, u ryb z tržní sítě v tabulce 5

⇒ byly zjištěny výrazné rozdíly v počtu mikroorganismů mezi rybami pocházejícími z výlovů a rybami z tržní sítě

⇒ celkové počty mikroorganismů i počty koliformních bakterií u čerstvých ryb z tržní sítě byly o 2 řády vyšší než u ryb pocházejících z výlovů; počty psychrotrofních bakterií u kaprů z výlovů byly nulové, kdežto u ryb z tržní sítě dosahovaly hodnot řádově 10^4

⇒ průměrné počty mikroorganismů se během skladování zvyšovaly (v závislosti na teplotě)

⇒ hodnoty biogenních aminů byly v souladu se zvyšujícím se počtem mikroorganismů

⇒ obsah se během skladování zvyšoval, zejména putrescin, kadaverin, spermidin, spermin a tyramin

⇒ zdravotně závažný obsah histaminu se objevil teprve při výrazném kažení masa doprovázeném smyslovými změnami

1. mikrobiologické vyšetření:

Tabulka 2. Průměrné počty CPM, koliformních a psychrotrofních bakterií u kaprů pocházejících z výlovů skladovaných při různých podmínkách

PRŮMĚRNÉ POČTY MIKROORGANISMŮ ($KTJ.g^{-1}$)						
skladování	čerstvá ryba	2 dny (3±2 °C)	4 dny (3±2 °C)	7 dní (3±2 °C)	3 měsíce (-18±1 °C)	2 dny (24 °C)
CPM	$7,7 \cdot 10^2$	$3,3 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^4$	$7,8 \cdot 10^6$	$5,9 \cdot 10^2$	$5,8 \cdot 10^6$
kolif.bakt.	$3,4 \cdot 10^0$	$4,6 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^2$	$7,9 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^1$	$5,9 \cdot 10^4$
psychr.bakt.	0	$2,9 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^7$	$2,7 \cdot 10^2$	$1,8 \cdot 10^5$

Tabulka 3. Průměrné počty CPM, koliformních a psychrotrofních bakterií u kaprů pocházejících z tržní sítě skladovaných při různých podmínkách

PRŮMĚRNÉ POČTY MIKROORGANISMŮ ($KTJ.g^{-1}$)						
skladování	čerstvá ryba	2 dny (3±2 °C)	4 dny (3±2 °C)	7 dní (3±2 °C)	3 měsíce (-18±1 °C)	2 dny (24 °C)
CPM	$6,2 \cdot 10^4$	$3,4 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^5$	$6,1 \cdot 10^5$	-	$8,5 \cdot 10^7$
kolif.bakt.	$7,6 \cdot 10^2$	$5,7 \cdot 10^2$	$2,2 \cdot 10^3$	$3,9 \cdot 10^4$	-	$1,6 \cdot 10^6$
psychr.bakt.	$1,6 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^4$	$4,0 \cdot 10^5$	$8,2 \cdot 10^5$	-	$4,7 \cdot 10^7$

2. stanovení biogenních aminů:

Tabulka 4. Množství biogenních aminů v $mg.kg^{-1}$ u kaprů pocházejících z výlovů skladovaných při různých podmínkách

Množství biogenních aminů (mg/kg) v jednotlivých dnech skladování							
skladování	TRY	PUT	CAD	HIS	TYR	SPD	SPN
čerstvá	0	0,31	0	0	0	1,32	3,69
2 dny (3±2 °C)	0	0,33	0	0	0	1,97	6,06
4 dny (3±2 °C)	0,17	1,77	2,56	0	6,77	4,01	13,60
7 dní (3±2 °C)	2,27	9,70	3,38	0	10,07	6,32	26,23
3 měsíce (-18±1 °C)	0	0,40	0	0	0	3,70	6,81
2 dny (24 °C)	0,42	91,32	213,46	333,16	137,81	9,70	31,49

Tabulka 5. Množství biogenních aminů v $mg.kg^{-1}$ u kaprů pocházejících z tržní sítě skladovaných při různých podmínkách

Množství biogenních aminů (mg/kg) v jednotlivých dnech skladování							
skladování	TRY	PUT	CAD	HIS	TYR	SPD	SPN
čerstvá	0	2,68	0	0	0	2,06	3,53
2 dny (3±2 °C)	0	4,37	0,08	0	0	2,70	3,64
4 dny (3±2 °C)	0	5,65	1,12	0,82	0,03	3,20	4,66
7 dní (3±2 °C)	0,11	6,41	1,17	1,54	0,12	4,11	6,99
3 měsíce (-18±1 °C)	-	-	-	-	-	-	-
2 dny (24 °C)	0,79	70,31	165,05	135,71	25,38	3,18	5,88

Závěr

- počty mikroorganismů u skladovaných ryb závisí na počáteční kontaminaci suroviny a na teplotě a době skladování
- zvýšené hodnoty biogenních aminů jsou v souladu se zvyšujícím se počtem mikroorganismů
- při vyšetřování svaloviny kaprů uchovaných za různých podmínek skladování byla významně vysoká hodnota histaminu zjištěna pouze u kaprů skladovaných 2 dny při 24 °C
- při nižších skladovacích teplotách byl obsah biogenních aminů nižší a při mrazírenské teplotě se nelišil od hodnot zjištěných v čerstvé svalovině
- za nejlepší indikátor jakosti můžeme považovat úhrnnou výši hladiny putrescinu a kadaverinu, jejichž obsahy nejlépe korelovaly se zvyšujícím se počtem mikroorganismů
  - tyto biogenní aminy se tak stávají indikátorem mikrobiální kontaminace

Literatura

ISO 6730: 1996, Mléko–Stanovení počtu jednotek tvořících kolonie psychrotrofních mikroorganismů–Technika počítání kolonií vykultivovaných při 6,5 °C

ISO 4833: 1995, Všeobecné pokyny pro stanovení celkového počtu mikroorganismů–Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C

ISO 4832: 1995, Všeobecné pokyny pro stanovení počtu koliformních bakterií–Technika počítání kolonií

KALAČ, P., KŘÍŽEK, M. Biogenní aminy a polyaminy v potravinách. *Výživa a potraviny*, 2002, vol. 57, No. 1, p. 12–13.

PAULSEN, P., BAUER, F., VALI, S. Biogenic amines in fermented sausage. 1. Methods for the determination of biogenic amines, *Fleischwirtschaft*, 1997, vol. 77, No. 5, p. 450-452

SUHAJ, M., KOVÁČ, M. *Prírodné toxikanty a antinutričné látky v potravinách*. 1. vydání 1996

VELÍŠEK, J. Chemie potravin, 3. díl, OSSIS Pelhřimov, 2002, p. 123-130.

Vyhláška ministerstva zdravotnictví č. 53/2002 Sb. o chemických požadavcích na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínkách použití látek přídatných, pomocných a potravních doplňků. Sbírka zákonů, 2002, částka 22, p. 972

Práce vznikla za finanční podpory grantového projektu IG230004 a z prostředků výzkumného záměru MŠMT ČR č. 162700005.