مطالعه تغییرات بار میکروبی، پوترسین و هیستامین در عضله ماهی شوریده (*Otolithes ruber*) در شرایط نگهداری در یخ

علی قربانی رنجبری[1*]، نازنین قربانی رنجبری[2]، علیرضا گلچین منشادی[3]، فاطمه قربانی رنجبری[4]

۱. باشگاه پژوهشگران جوان، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

۲. دانشکده شیلات و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی خرمشهر، خرمشهر، ایران.

۳. گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

۴. دانشگاه پیام نور بندرعباس، بندرعباس، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *dr_alighorbani87@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۲۸

چکیده

آمین‌های بیوژن مولکول‌های کوچک آلی می‌باشند که توسط آنزیم‌های دکربوکسیلاسیون ناشی از باکتری‌ها در مواد غذایی تشکیل می‌شوند. در این مطالعه غلظت آمین بیوژن هیستامین و پوترسین در ماهیان نگهداری شده در یخ برای دوره ۱۸ روزه در فواصل زمانی ۳ روزه به‌وسیله روش کروماتوگرافی مورد بررسی قرار گرفت (روزهای صفر، ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵ و ۱۸). در این بررسی آمین هیستامین در اولین و سومین روز نگهداری تشخیص داده نشد، لیکن پوترسین در روز سوم به میزان ۰/۰۳±۱/۳۰ میکروگرم برگرم رسید. غلظت اولیه هیستامین و پوترسین به ترتیب ۱/۵۱ و ۱/۳۰ میکروگرم بر گرم و در انتهای دوره به ترتیب به‌میزان ۱۴/۵ و ۱۹ میکروگرم بر گرم رسید. آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که در میانگین غلظت این آمین‌ها بین اولین روز نگهداری (روز صفر) و آخرین روز نگهداری (روز هجده) افزایش معنی‌داری ($P<0/05$) داشته است. همچنین بین بار باکتریایی مزوفیلی و افزایش هیستامین و بار باکتریایی سرمادوست با آمین بیوژن پوترسین رابطه معنی‌داری وجود داشت ($P<0/05$).

واژگان کلیدی: هیستامین، پوترسین، بار میکروبی، ماهی شوریده.

مقدمه

آمین‌های بیوژن مولکول‌های کوچک آلی و آروماتیک می‌باشند و به واسطه آنزیم‌های دکربوکسیلاسیون باکتریایی از اسیدهای آمینه آزاد موجود در مواد غذایی شکل می‌گیرند (Taylor and Summer, 1987). این پدیده به‌خصوص در گوشت ماهی و دیگر آبزیان در طول مراحل صید، جابجایی، آماده سازی و فرآوری و غالباً در نتیجه رشد باکتری‌ها رخ می‌دهد که در کیفیت محصول نهایی تأثیر قابل توجهی دارد (رضوی شیرازی، ۱۳۷۳). باکتری‌هائی که قادر به دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه می‌باشند شامل باکتری‌های مزوفیلیک و سرما دوست بوده و بیشتر آن‌ها دارای آنزیم دکربوکسیلازی می‌باشند (Yoshinaga and Frank, 1982) هیستامین از مهم‌ترین آمین‌های بیوژن است که از نتیجه دکربوکسیلاسیون باکتریایی به‌وجود می‌آید. از طرفی هیستامین به‌صورت غالب در ایجاد سم در مواد غذایی نقش دارد و آمین‌های مشابه آمین‌هایی مانند پوترسین و کادورین در تشدید و ازدیاد حالت منفی هیستامین مؤثرند (Bjeldanes et al., 1978; Love, 1980). پوترسین در نتیجه دکربوسیکلاسیون اورنتین به‌وجود آمده و به‌عنوان یک شاخص تازگی ماهی مطرح می‌باشد و در مراحل اولیه فساد آن، ظاهر می‌شود (Dawood et al., 1988; Fernandez-Salguero and Mackie, 1987; Yamanaka, 1989). از طرفی هیستدین توسط آنزیم دکربوکسیلاز که به‌وسیله باکتری‌هایی که به باکتری‌های فساد معروف هستند به هیستامین تبدیل می‌شود (Love, 1980). ذخیره سازی 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 شکل گیری آمین‌ها در ماهی را نشان می‌دهند (Behling and Taylor, 1982; Lopez-sabater et al., 1996; Koutsoumanis et al., 1999). فعالیت‌های روده‌ای ناشی از آنزیم‌های دی آمین اکسید (DAO) و هیستامین-N-متیل ترانسفراز (HMT) است که هیستامین را به محصولات بی‌ضرر تبدیل می‌کند. اما در غلظت‌های بیشتر هیستامین ظرفیت آنزیم‌های دی‌آمین اسید و هیستامین-N-متیل ترانسفراز برای سم زدایی هیستامین محدود شده و به‌محض ورود هیستامین به جریان خون، سبب بروز اثرات سمی می‌گردد (Taylor, 1986). پوترسین و کاداورین می‌توانند این واکنش آنزیمی را متوقف ساخته و بنابراین سمیت هیستامین را تقویت نمایند (Eitenmilfer et al., 1980) ماهیان تازه معمولاً دارای میزان کمی هیستامین (کمتر از ۰/۱ گرم در ۱۰۰ کیلوگرم وزن بدن) می‌باشند (Frank et al., 1981)، به‌همین دلیل در سال های اخیر آمین‌های بیوژن به‌عنوان یکی از فاکتورهای بسیار مهم و با ارزش در سنجش فساد ماهی قلمداد می‌شوند (Krizek et al., 2004). با توجه به ارزش اقتصادی ماهی شوریده و شیوه رایج و متداول استفاده از یخ در سرد سازی، نگهداری و عرضه این ماهیان، مطالعه حاضر به‌منظور مقایسه تعیین پوترسین و هیستامین در عضله ماهی شوریده (*Otolithes rubber*) نگهداری شده در یخ صورت پذیرفت.

مواد و روش کار

در این بررسی حضور آمین‌های بیوژن هیستامین و پوترسین و تغییرات بار میکروبی در ماهی شوریده در طول ۱۸ روز ذخیره در یخ (روزهای صفر، ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵و ۱۸) بررسی شد. ماهی تازه شوریده از بندر هندیجان در اسفند سال ۱۳۸۹ تهیه و در اسرع وقت به آزمایشگاه منتقل گردید. میانگین طول و وزن ماهی‌ها به ترتیب برابر با ۳۴ سانتی‌متر و ۴۵۰ گرم بود. ماهی‌ها تحت شرایط یخ‌گذاری در جعبه‌های عایق‌بندی شده که مجهز به خروجی هایی برای خارج ساختن آب حاصل از ذوب یخ بود ذخیره شدند. در طول شرایط نگهداری دما به‌صورت یکنواخت حفظ شد، و نسبت یخ به ماهی (۳ به ۱) در طول آزمایش ثابت نگه داشته شد. برای اندازه گیری میزان هیستامین و پوترسین در طول دوره به‌طور تصادفی در بازه‌های زمانی ذکر شده، مقداری از عضله دو نمونه ماهی برداشت می‌شد و جهت اندازه گیری بار میکروبی کل، هیستامین و پوترسین مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز میکروبی

در این بررسی نمونه‌های ۲۵ گرمی از عضله پشتی هر ماهی گرفته شد و با ۲۲۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل همگن گردید. از نمونه‌های ۱/۵ میلی‌لیتری از رقت‌های (۱/۰٪)، ماهی در سطح محیط کشت جامد پخش شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۲۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شدند تا به ترتیب باکتری‌های ساکروفیل و مزوفیل جداسازی شوند. پس از ۴۸ ساعت دوره گرم‌خانه گذاری، داده‌های میکروبیولوژیکی جمع‌آوری شد و بر اساس لگاریتم تعداد واحدهای شکل کلونی (CFU/g) محاسبه شدند.

استخراج پوترسین و هیستامین

استخراج پوترسین و هیستامین بر اساس روش (Mitz and Karmas, 1978) صورت گرفت. بدین صورت که ۵۰ گرم از عضله کناری نیمه پشتی هر ماهی در ۷۵ میلی‌لیتر از محلول ۵ درصد اسید تری کلرواستیک به‌مدت ۲ دقیقه به‌صورت همگن مخلوط شد و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس محلول رویی به‌دست آمده با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۱ فیلتر شد و به‌داخل بالن ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل گردید. ماده باقیمانده در لوله آزمایش به دستگاه همگن کننده بازگردانده شده. در مرحله بعد ۱۰ میلی‌لیتر از محلول استخراج شده با ۴ گرم سدیم کلرید، ۱ میلی‌لیتر

سدیم هیدروکسید (۵۰ درصد) و ۵ میلی‌لیتر ترکیب کلروفرم-بوتانول به نسبت ۱ به ۱ مخلوط شد و به‌مدت ۲ دقیقه بر روی دستگاه لرزاننده قرار گرفت. سپس به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گشت و لایه آلی رویی به‌دست آمد. میزان ۱۵ میلی‌متر ان-هپتان و ۱ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال به آن اضافه شد و مجدداً بر روی دستگاه لرزاننده قرار گرفت. کلیه مراحل در این آزمایش در سه تکرار صورت گرفت.

مشتق سازی

به‌منظور عمل مشتق سازی، یک میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۲ مولار، به ماده خشک استخراج شده اضافه شد. سپس ۵ میکرولیتر بنزول کلراید به آن اضافه و مخلوط گردید. این ترکیب در یک مخلوط کننده گردابی به‌مدت ۲۰ دقیقه به شدت تکان داده شد، ضمن اینکه ۲ میلی‌لیتر محلول سدیم کلرید اشباع برای جلوگیری از بنزوئیلاسیون افزوده شد. در نهایت ۲ میلی‌لیتر اتیل اتر اضافه گردید و سپس به‌مدت ۵ دقیقه در ۲۵۰۰ دور سانتریفیوژ شد و در نهایت فاز بالایی (اتر) به لوله تمیز منتقل گردید تا خشک شود (Dawood et al., 1988).

تزریق و آنالیز دستگاهی با کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا[1]

در این آزمایش از دستگاه کروماتوگرافی مایع استفاده گردید. جمع آوری داده ها و انجام تغییرات بر روی آن‌ها با استفاده از نرم افزار اتوماتیک شیما دوز-CLSS VP انجام شد. ماده خشک استخراج شده در ۲۰۰ میکرولیتر متانول با درجه HPLC حل و از صافی میلی پور (۰/۴۵ میکرومتر) عبور داده شد و ۲۰ میکرولیتر از ماده فیلتر شده با استفاده از سرنگ همیلتون به دستگاه تزریق گردید (Dawood et al., 1988). هیستامین و پوترسین بر اساس تطابق زمان ماندگاری پیک‌های نمونه‌های مجهول با نمونه‌های استاندارد، شناسایی و غظت آن‌ها با توجه به سطح زیر منحنی تعیین شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل از بررسی نمونه‌ها در زمان‌های مختلف با نرم افزار SPSS 17 مورد تجزیه وتحلیل آماری قرار گرفتند. روش تحلیل واریانس یک طرفه جهت بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بین مقادیر حاصل به‌کار رفت.

نتایج

تغییرات بار میکروبی در ماهی شوریده در طول دوره ذخیره در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که مجموع باکتری‌های مزوفیلی در ماهی تازه نگهداری شده در یخ، به اندازه یک واحد لگاریتمی در دوره اولیه سه روز کاهش یافته و سپس به‌طور ثابت تا 10^4 CFU/g در ۶ روز ذخیره سازی افزایش یافت. مجموع باکتری‌های سایکروفیلی که در ابتدا کم‌تر از باکتری‌های مزوفیلی بودند به‌طور ثابت افزایش یافتند و به سطحی معادل 10^9 CFU/g در روز هجدهم رسیدند. نتایج نشان داد، مجموع بار باکتریایی مزوفیلی و ساکروفیلی در روز پانزدهم و هجدهم تفاوت معنی‌داری نداشت، اگرچه تجزیه و تحلیل آماری تفاوت معنی‌داری را بین بار باکتریایی اولیه و نهایی (روز هجده) نشان داد ($P<0/05$). همچنین مشخص گردید همبستگی زیادی ($R^2=0/98$) بین جمعیت باکتری‌های سرمادوست و آمین بیوژنی پوترسین وجود دارد. در مورد هیستامین، این همبستگی با باکتری‌های مزوفیل با هیستامین مشاهده گردید.

1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

جدول ۱- مجموع شمارش باکتریایی در ماهی شوریده در طول ذخیره سازی در یخ ($\log CFU\ g^{-1}$±SD)

زمان ذخیره	باکتری سایکروفیل	باکتری مزوفیل
۰	۲/۸±۰/۵	۳/۸±۰/۲۱
۳	۳/۵±۰/۱	۲/۶±۰/۱۳
۶	۴/۱±۰/۵	۳/۶±۰/۱۷
۹	۴/۷±۰/۳	۵/۹±۰/۳
۱۲	۶/۱±۰/۰۹	۶/۷۲±۰/۰۷
۱۵	۷/۸±۰/۲	۶/۸۷±۰/۰۵
۱۸	۸/۵±۰/۱۵	۷/۹۹±۰/۰۱

جدول ۲- مقادیر آمین های بیوژن پوتروسین و هیستامین در ماهی شوریده نگهداری شده در یخ (µg/g±SD)

زمان ذخیره	پوسترسین	هیستامین
۰	ND	ND
۳	۱/۳۰±۰/۰۳	ND
۶	۴/۰۳±۰/۱۵	۱/۵۱±۰/۰۴
۹	۶/۷±۰/۱۹	۷/۹۳±۰/۰۵
۱۲	۱۱/۷±۰/۵	۱۰/۵۲±۰/۰۹
۱۵	۱۷/۸±۰/۴۱	۱۰/۹۳±۰/۰۵
۱۸	۱۹±۰/۴۱	۱۴/۵±۰/۰۵

ND: عدم ردیابی (Not Detected)، آمین تشکیل نشده یا دستگاه قادر به ردیابی نبوده است.

میزان بار میکروبی در ماهی شوریده نگهداری شده در یخ در جدول ۱ و غلظت پوترسین و هیستامین در جدول ۲ نشان داده شده است. پوترسین در روز اول (روز صفر) ذخیره آشکار نگردیده و در روز سوم آشکار شد. سطح این آمین در طول ۱۸ روز آزمایش افزایش یافت به‌طوری که تفاوت معنی‌داری را بین اولین و آخرین روز نگهداری نشان داد ($P<۰/۰۵$). بر اساس نتایج به‌دست آمده، هیستامین نیز در طی هجده روز نگهداری در هر نوبت نمونه برداری، به استثناء روز پانزدهم، افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P<۰/۰۵$). بیشترین افزایش میانگین غلظت این آمین مربوط به روز نهم و هجدهم بود و بیشترین جهش مربوط به روز ششم به نهم بود. نتایج حاصل از تعیین غلظت هیستامین نشان داد که میانگین غلظت هیستامین در روز پانزدهم در مقایسه با میانگین غلظت روز دوازدهم تغییر معنی‌داری نداشته است.

بحث

در آزمایش انجام گرفته بر روی ماهی شوریده نگهداری شده در یخ، هیچ یک از آمین‌های بیوژن مورد بررسی در روز اول نگهداری مشاهده نشدند که دلیل احتمالی آن عدم فعالیت باکتری‌ها تحت شرایط خاص ذخیره در این تحقیق می‌باشد. از طرفی عدم ردیابی هیستامین در روز سوم نگهداری را می‌توان به کاهش باکتری‌های مزوفیل ناشی از شوک سرمایی در طی این سه روز دانست (Ingram, 1951). به‌عبارت دیگر با افزایش بار باکتریایی مزوفیل، مقادیر هیستامین ابتدا با شدت کمتر و سپس با شدت بیشتر افزایش می‌یابد که رابطه معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) را نشان می‌دهد. همچنین با افزایش بار باکتریایی سرمادوست نیز مقدار پوترسین در عضله افزایش معنی‌داری یافته است ($P<۰/۰۵$). در تحقیقی مشابه، ایجاد آمین‌های بیوژن و رابطه آن با تغییرات حسی و بار میکروبی کل ماهی قزل آلای رنگین کمان نگهداری شده در یخ، نشان داد که غلظت

پوترسین در طول هجده روز یعنی هنگامی که باکتری‌های سایکروتروف به سطحی معادل CFU/g $۱۰^{۷}$ رسیدند افزایش یافت (Chytiri et al., 2004). گزارشاتی نیز وجود دارد که نشان می‌دهند انواع و سطوح آمین‌های بیوژن شکل گرفته به فلور میکروبی میکروفلور و جمعیت باکتری‌ها بستگی دارد (Veciana-Nogues et al., 1997). برخی مطالعات نشان می‌دهند که بین جمعیت باکتری‌های سرمادوست و ایجاد پوترسین در گوشت گاو همبستگی مستقیمی وجود دارد (Daher and Simard, 1985) که با نتایج به‌دست آمده در این آزمایش، همخوانی دارد. تحقیقات دیگری نیز نشان می‌دهند که باکتری‌های سایکروفیل و مزوفیل در تشکیل آمین‌های بیوژن نقش مهمی دارند (Taylor and Sumner, 1986). در تحقیق حاضر مشخص گردید که مقدار هیستامین به بار باکتریایی مزوفیل ارتباط دارد. دمای مناسب برای رشد این باکتری‌ها در حدود ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد است، هرچند که دمای مناسب برای بعضی از باکتری‌های تولید کننده هیستامین دمای مطلوب پایین‌تر از ۱۰ درجه سانتی‌گراد است (برخی گونه‌های ویبریو). بنابراین وجود سطح سطوح بالای هیستامین در غذاهای دریایی نشان دهنده این است که فرایند خنک سازی متوقف شده و یا در حداقل ممکن است (Lukton and Olcott, 1985). اثبات شده است که هیستامین در عضلات تیره ماهیان و از جمله گونه ماکرل، نسبت به ماهیچه سفید ماهیانی مثل کاد، به‌میزان بیشتری تولید می‌شود. در گونه‌های متعددی از ماهیان پلاژیک دریایی به‌خصوص انواعی که شنای مستمر و سرعت بالایی دارند، عضله تیره گسترش یافته و غلظت اسید آمینه هیستدین در این عضلات بیشتر است (Taylore and Sumner, 1987). گزارشات متعددی در خصوص تولید آمین بیوژن در ارتباط آن با باکتری‌های مزوفیل مبنی بر این که درجه حرارت (شرایط نگهداری) عامل اصلی تعیین کننده رشد باکتری و به‌دنبال آن تولید آمین‌های بیوژن خواهد بود. از طرفی گزارشات محققین حاکی از آن است که تولید هیستامین به‌دلیل تنوع باکتری‌های تولید کننده هیستامین در محدوده‌های دمائی مختلف صورت می‌پذیرد و حتی در شرایط نگهداری در یخ و در برخی مواقع در حالت انجماد نیز شاهد تولید هیستامین در مقادیر کم می‌باشیم (Taylor and Sumner, 1986; Taylor and Sumner, 1987). هرچند در این تحقیق گونه‌های مختلف باکتریایی شناسائی نشد ولی به نظر می‌رسد که برخی از این باکتری‌های تولید کننده هیستامین که قادر به تحمل شرایط دمایی پایین هستند می‌توانند با بقای خود، میزان اندکی هیستامین را در شرایط نگهداری ماهیان در یخ ایجاد کنند و این میزان هیستامین در انتهای دوره بسیار پایین‌تر از حد مجاز استاندارد جهانی تشخیص داده شد که این موضوع به‌دلیل کمبود آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز یا عدم فعالیت آن در شرایط نگهداری در یخ است. همچنین به‌نظر می‌رسد که اغلب باکتری‌های ایجاد کننده پوترسین عمدتاً به گروه سایکروفیل‌ها تعلق دارند. در ادامه پیشنهاد می‌گردد که بررسی حضور میزان سایر آمین‌های بیوژن در مواد غذایی صورت گیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از بخش میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون و آزمایشگاه دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر و راهنمائی‌های اساتید ارجمند سرکار خانم دکتر گیتی کریم و جناب آقای دکتر محمد حسین مرحمتی زاده مراتب قدردانی و سپاس به‌عمل می‌آید.

منابع

۱. رضوی شیرازی، حسن. (۱۳۷۳). تکنولوژی فرآورده‌های دریایی (اصول نگهداری و عمل‌آوری). انتشارات سازمان شیلات ایران، تهران. ایران.

2. Behling, A.R., and Taylor, S.L. 1982. Bacterial histamine production as a function of temperature and time of incubation. J Food Sci. 447: 1311-1317.
3. Bjeldanes, L.F., Shutz, D.E., and Morris, M.M. 1978. Etiology ofscombroid poisoning Fcadaverine potentiation of histamine toxicity in guinea pigs. Food Cosmet Toixicol. 16: 157-162.
4. Chytiri, S., paleologos, E., Savvaidis, I.N., and 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. J Food Protect. 67: 960-965.
5. Daher, N.S., and Simard, R.E. 1985. Putrefactive amine changes in relation to microbial counts of ground beef during storage. J Food Protect. 48: 54-58.
6. Dawood, A.A., Karkalas, J.R.N., and Williams C.A. 1988. The occurrence of non-volatile amines in chilled-stored Rainbow trout. Food Chem. 27: 33-45.
7. Fernandez-Salguero, J., and Mackie, I.M. 1987. Comparative rates of spoilage of fillets and whole fish during storage of haddock (*Melanogrammes aegiefinus*) and herring (*Clupea herengus*) as determined by the formation of non-volatile amines. Int J Food Sci Technol. 22: 385-390.
8. Frank, H.A., Yoshinaga, D.H., and Nip, W.K. 1981. Histamine formation and honeycombing during decomposition and honeycombing during decomposition of skipjack tuna, *Katsuwonus pelanis*, at elevated temperatures, Mar Fish Rev. 43: 9-14.
9. Ingram, M. 1951. The elect of cold of on microorganisms in relation to food Proc. Soc Appl Bacteriol. 14: 243-249.
10. Koutsoumanis, K., Lampropoulou, K., and 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 151C. J Food Prot. 62: 398-402.
11. Krizek, M., Vorlova, L., Lukasova, J., and Cupakova, S. 2004. Biogenic amines in vacuum-packed and non-vacuum-packed flesh of carp (*Cyprinus carpio*) stored at different temperatures. Food Chem. 88: 185-191.
12. Love, R.M. 1980. The chemical biology of fishes. Histidine. San Franciso, pp. 380-385.
13. Lopez-Sabater, E.I., Rodriguez-Jerez, J.J., Roig-Sagueus, A.X., and mora-Ventura, M.A.T. 1996. Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning: elect of handling on the presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. J Food Prot. 57: 318-323.
14. Lukton, A., and Olcott, H.S. 1958. Content of free imidazole compounds in the muscle tissue of aquatic animals. Food Res. 23: 518-611.
15. Mitz, J.L., and karmas, E. 1978. Chemical quality index of canned tuna as determined by high pressure liquid chromatography. J Food Sci., 42: 155-158.
16. Taylor, S.L. 1986. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. Toxicol. 17: 91-117.
17. Taylor, S.L., and Sumner, S.S. 1986. Determination of histamine, cadaverine and putrescine. In Seafood Quality Determination (D.E. Kramer and J.

Liston Eds.). Proceedings of an International Symposium. Elsevier Science Publishers, New York.
18. Taylor, S.L., and Sumner, S.S. 1987. Determination of histamine, putrescine and cadaverine. (Kramer, D.E. & Liston, J. Eds.) Seafood quality determination. Elsevier Scince Publishers, Amsterdam.
19. Veciana-Nogues, M.T., Marine-Font, A., and 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. J Agri Food Chem. 45: 2036-2041.
20. Yamanaka, H. 1989. Changes in polymines and amino aside in scallop adductor muscle during storge. J Food Sci. 54: 1113-1115.
21. Yoshinaga, D.H., and Frank, H.A. 1982. Histamineproducing bacteria in decomposing skipjack tuna (Katsuwonus pelamis). Appl Environ Microbiol. 44: 447- 452.