

cipitation test and biologically on kittens. The number of cellular elements in milk was estimated electronically. 19 out of 118 strains under study (16,1%) was determined as *Staph. aureus*, 25 (21.19%) as *Staph. epidermidis*, 74 (62.71%) as *Micrococcus*. Within the strains of *Staph. epidermidis* mainly were found of group III and VI, and within *Micrococcus* — VII and VIII. There were not possible to classify serologically

10 strains (8.47%) of *Staph. epidermidis* and 8.47% strains of *Micrococcus*. Almost all of the strains of *Staph. aureus* (94.74%) and most of *Staph. epidermidis* (72.0%) were isolated from milk with an increased number of cellular elements. *Micrococci* were isolated more often from milk with normal value of cellular elements (64.86%). The isolated strains of *Staph. aureus* were not enterotoxinogenic.

LEONARD WIDERA  
Gdynia

## Poziom tlenku trójmetyloaminy i lotnych zasad amonowych jako wskaźniki sanitarne surowców rybnych

Pośmiertne procesy biochemiczne zachodzące u ryb, głównie na tle przemian mikrobiologicznych, prowadzą do wystąpienia niepożądanych wskaźników, charakterystycznych dla niewłaściwej jakości sanitarnej artykułów rybnych. Szereg tych wskaźników wykorzystuje się, poprzez ich ilościowe oznaczanie do określenia stopnia świeżości ryb przeznaczonych do dalszego przechowywania, przetwórstwa i obrotu. W wielu krajach metody badań zmian ilościowych niektórych związków chemicznych znajdują szerokie zastosowanie (2, 4, 9, 10). W Polsce poza nielicznymi ośrodkami, metody te nie są praktycznie wykorzystywane (5, 7, 8, 12, 13). Fakt ten wynika m.in. z hedonicznego charakteru obowiązujących norm polskich jak i braku odpowiedniego zaplecza laboratoryjnego, dla potrzeb służb kontrolnych w przemyśle rybnym.

Spośród szerokiej grupy wskaźników chemicznych, duże znaczenie przypisuje się badaniom zawartości tlenku trójmetyloaminy (TMAO) i lotnych zasad amonowych (LZA) (1, 2, 3, 6, 9, 11, 12). Lotne zasady amonowe są to niebiałkowe związki azotowe występujące w mięśniach ryb jako substraty i produkty przemian biochemicznych (4, 5, 6, 8). Odgrywają one szczególną rolę w kształtowaniu się *post mortem* cech organoleptycznych tkanki mięśniowej, głównie w zakresie smaku, zapachu i tekstury (2, 4, 6, 9, 10, 11, 14). Do grupy tzw. lotnych zasad amonowych zalicza się trójmetyloaminę (TMA), dwumetyloaminę (DMA), monometyloaminę (MMA), oraz amoniak (2, 4, 7, 12, 14).

Specyficznym związkiem chemicznym jest natomiast tlenek trójmetyloaminy (TMAO) występujący głównie u ryb morskich (1, 2, 9, 11). Związek ten przyżyciowo odgrywa u tych ryb poważną rolę w utrzymywaniu stałej osmolarności krwi (9, 11). Badania Kutschery i Ackermana wykazały, że TMAO powstaje na drodze

metylowania i oksydacji rozłożonych białek (9). U niektórych gatunków ryb słodkowodnych stwierdzono także występowanie TMAO, lecz w ilościach wyraźnie niższych aniżeli u ryb morskich. Przeciętnie u ryb słodkowodnych zawartość TMAO w tkance mięśniowej, w zależności od gatunków, waha się w zakresie od 4,5 mg%N do 91,5 mg%N, wobec 150 mg%N do 330 mg%N u ryb morskich kostnoszkieletowych i 1080 mg%N do 1462 mg%N u ryb morskich spodoustych (raje, rekiny) (11). Ryby przemieszczające się z wód słodkich do morskich cechują się dużą zmiennością poziomu TMAO. U węgorzy bytujących w wodach słodkich zawartość TMAO wynosiła 4,5 mg%N a w momencie przejścia do środowiska morskiego poziom ten wzrastał do 60 mg%N w tkance mięśniowej (9, 11). Wynika więc z tego fakt, że poziom TMAO u ryb związany jest ze specyficzną budową układu moczowego poszczególnych gatunków, stopniem zasolenia wody a także procesami regulującymi osmolarność krwi.

W czasie przechowywania złowionych ryb, wskutek działalności enzymów tkankowych i przemian mikrobiologicznych TMAO ulega redukcji do trójmetyloaminy (TMA) (1, 2, 5, 8, 9, 10). Intensywność postępowania procesów degradacji TMAO do TMA uwarunkowana jest długością czasokresu przechowywania, temperaturą otoczenia i wielkością stopnia bakteryjnego zakażenia (4, 5, 6). Proces ten przebiega znacznie wyraźniej u ryb świeżych lodowanych aniżeli u ryb mrożonych tuż po złowieniu (9, 10, 11). U ryb mrożonych długość okresu wyczekiwania przed zamrożeniem rzutuje wyraźnie na poziom TMA (16). Toteż badania zmian ilościowych TMAO i TMA w surowcach rybnych mogą być pomocne w celu określenia przydatności konsumpcyjnej i technologicznej (8, 9, 10, 11, 13). Propozycje takie wysuwane są przez Międzynarodową Komisję Kodeksu

Zywnościowego FAO/WHO do spraw Ryb i Produktów Rybnych i sugerują wprowadzenie tych oznaczeń w obrocie międzynarodowym (12).

Badania Castella i wsp. (3, 4, 10) w zależności od poziomu TMA pozwalają uszeregować surowce rybne w trzech kategoriach. Do I Kategorii zalicza się surowce zawierające w tkance mięśniowej 1 mg%N TMA, do II od 1,1 do 5,0 mg%N TMA, a do III Kategorii surowce zawierające powyżej 5,0 mg%N TMA (3, 4, 7, 10). Zdecydowana większość ryb świeżych lodowanych, nie wykazujących odchyżeń od wymogów organoleptycznych cechuje się zawartością TMA w granicach ok. 1 mg%N. Wg licznych badań (3, 4, 7, 10, 11) zawartość TMA powyżej 1 mg%N w rybach świeżych lodowanych występuje ok. 4—5 dnia przechowywania w lodzie, wraz z występowaniem niepożądanych cech organoleptycznych (7, 9, 10). U ryb mrożonych okres zmian zawartości TMA jest zmienny i uzależniony jest od czasokresu składowania i parametrów klimatycznych pomieszczeń składowych (1, 5, 6, 7, 8, 9, 10). Dla mrożonych filetów z dorsza czas składowania, w czasie którego stwierdzono wzrost zawartości TMA ok. 1 mg%, w temperaturze  $-25^{\circ}\text{C}$  — wynosił około 14 tygodni. Powyżej tego czasokresu zawartość TMA systematycznie wolno wzrastała. Po 33 tygodniach składowania w temperaturze  $-25^{\circ}\text{C}$ , poziom TMA wynosił 2,31 mg%N, a więc mieścił się w wymogach przewidzianych dla Kategorii II surowców rybnych wg Castella (7).

Zawartość TMA w mrożonych płastugach atlantyckich (szkarłacia, halibut, niegładzica) po 14 tygodniach składowania w temperaturze  $-25^{\circ}\text{C}$  kształtowała się w zakresie 0,73 mg%N do 0,91 mg%N, a więc była zbliżona do poziomu stwierdzonego u dorszy (7).

W dostępnym piśmiennictwie nie wykazano w przypadku ryb mrożonych, zawartości TMA powyżej 5 mg%N (10, 11). Taka zawartość TMA występować może jedynie w zaawansowanych procesach psucia się surowców rybnych przed mrożeniem, a następnie pogłębiających się w trakcie niewłaściwych procesów zamrażania i chłodniczego składowania.

U ryb świeżych lodowanych zawartość TMA powyżej 5 mg% (III Kategoria wg Castella) występuje około 10 dnia przechowywania w przypadku dorszy i około 15 dnia przechowywania w przypadku płastug (7). Zmianom ilościowym TMA towarzyszą w tym przypadku wyraźnie obniżone wskaźniki organoleptyczne.

Obok wzrastającej ilości TMA, wzrasta również poziom dwumetyloaminy (DMA), jednak jest on mniej wyraźny i trudniej uchwytany. Zdania na temat źródła powstania DMA są podzielone. Przypuszcza się, że DMA powstaje na skutek redukcji TMA, lub stanowi przekształconą formę TMAO (1, 8, 9, 10).

Monometyloamina pojawia się w mięśniach ryb, w trakcie postępującego procesu rozkładu, a jej obecność dyskwalifikuje produkt do spożycia (9). U ryb o białym mięsie nie stwierdzono występowania monometyloaminy, gdyż u ryb tych brak obecności histaminy jako produktu dekarboksylacji histydyny. Prawdopodobnie histamina jest substancją wyjściową dla monoetyloaminy (9). Ryby o czerwonej barwie mięśni zawierają duże ilości histydyny, a tym samym wskutek jej przemiany histaminy. Stąd też obecność monometyloaminy, stwierdzana w mięśniach śledzi i makreli w trakcie postępujących procesów rozkładu (8, 11).

Do lotnych zasad amonowych zalicza się również amoniak. W mięśniach ryb kostnoszkieletowych fizjologiczna zawartość amoniaku wynosi ok. 0,05%. Ryby spodousto (raje, rekin) cechuje niezwykle wysoka zawartość mocznika, ok. 2%, który po śnięciu ulega rozkładowi do amoniaku pod wpływem amidohydrolazy mocznika i enzymów bakteryjnych. Toteż ich mięso w stanie zupełnie świeżym zawiera znaczne ilości amoniaku. U pozostałych ryb większe ilości amoniaku uwalniane są w trakcie postępującego rozkładu równoległe ze wzrostem poziomu TMA i DMA (2, 9, 10, 11). Dlatego też dla celów praktycznych przeprowadza się łączne oznaczanie  $\text{NH}_3$ , DMA i TMA i określa jako sumę lotnych zasad amonowych (1, 3, 7, 8, 10).

W analizie ilościowej lotnych zasad amonowych wskazane jest przeprowadzenie oddzielnego oznaczania TMA i LZA, wyrażonych w mg/100 g badanej tkanki (7, 8). Z różnicy LZA—TMA wylicza się ilości amoniaku. Wynik ten jest nieco zaniżony, gdyż obok amoniaku występują jeszcze dodatkowo śladowe ilości DMA i MMA (8).

Śród różnych metod oznaczania TMA i LZA, zaleca się wykorzystywanie mikrodyfuzyjnej metody Conwaya, kolorymetrycznej metody Dyera, względnie metody Dyera w modyfikacji Tozawa i Amiano (3, 7, 8, 9, 10).

W trakcie badania poziomu tych związków w czasie przechowywania lub chłodniczego składowania należy równocześnie określić poziom TMAO (4, 7, 8, 9, 10). Systematyczny spadek zawartości TMAO przy równoczesnym wzroście TMA i LZA jest sygnałem do przedsięwzięcia zamierzeń zapobiegających dalszemu obniżeniu się cech sanitarno-jakościowych surowców. Zawartość TMAO określa się metodą Antonocopoulosa (9). Powyższe metody badań są nieskomplikowane i mogą być stosowane w badaniach rutynowych.

Oceniając przydatność badań zawartości TMAO, TMA i LZA w morskich surowcach rybnych pod kątem oceny ich jakości sanitarnej należy podkreślić, że są one szczególnie pomocne w określaniu przydatności do dalszego składowania, przetwórstwa lub obrotu po minio-

nym okresie gwarancyjnym. Ponadto mogą być wykorzystane w ocenie surowców przyjmowanych do chłodni w celu tzw. zabezpieczenia gospodarczego, a więc wykazujących już postępujące zmiany organoleptyczne. Ww. testy mogą znaleźć szczególnie szerokie zastosowanie dla oceny ryb płastugowatych. Zastosowanie tych badań umożliwi bardziej wnikliwą ocenę szczególnie w opisanych przypadkach, uzupełniając badania sensoryczne o dodatkowe parametry (2, 7, 9, 10, 12).

Fakt, że zmiany ilościowe TMAO i LZA następują w efekcie przemian mikrobiologicznych wskazuje, że ta grupa wskaźników chemicznych jest ważnym aspektem w ocenie jakości sanitarnej artykułów rybnych.

## Piśmiennictwo

1. *Bethea S.*: J. Ass. Off. Agric. Chem. 48, 731, 1965.
2. *Borgstrom*: Fish as Food, vol. Academic Press, London 1961.
3. *Castell C.*: J. Fish. Res. Bd. Can. 25, 291, 1968.
4. *Castell C.*: J. Fish. Res. Bd. Can. 15, 4, 1958.
5. *Dąbrowski T.*: Prace MIR 15B, 159, 1970.
6. *Dyer W.*: Prace MIR 6, 359, 1945.
7. *Karnicka B.*: Prace MIR 16B, 193, 1971.
8. *Kocot J.*: Technologia zabezp. surowców rybnych, WSR Szczecin, 1973.
9. *Kreuzer R.*: The Technology of fish Utilization. Fishing News Ltd. FAO, London, 1965.
10. *Kreuzer R.*: Fish Inspection and Quality Control, Fishing News Ltd. FAO, London, 1971.
11. *Love M.*: The Chemical biology of fishes. Academic Press, London, 1970.
12. Method for the determination of TMA in fish muscle. Codex Committee on Fish and Fishing Products, Joint FAO/WHO Codex Alimentaris Commission, Codex Fish 1/7 (Bergen 1968).
13. *Widera L.*: Życie Wet. 11, 330, 1974.

Adres autora: lek. wet. Leonard Widera, ul. Czubatki 1, 81-343 Gdynia.

## PRAKTYKA LABORATORYJNA

HENRYK GOŹLIŃSKI, WŁODZIMIERZ LEWANDOWSKI

### Porównanie różnych sposobów przygotowania surowicy do oznaczania niektórych składników mineralnych metodą ASA

Z Pracowni Analizy Fizykochemicznej AR w Warszawie

Szybki rozwój metod fizykochemicznych w chemicznej analizie ilościowej, a szczególnie metody absorpcyjnej spektrofotometrii atomowej (ASA) zwiększa i przyspiesza możliwości analityczne. W związku z tym wyłania się potrzeba zmniejszania pracochłonności i wprowadzania uproszczeń na etapie przygotowania próbek do analiz. W niniejszej pracy postanowiono sprawdzić zgodność wyników oznaczeń siedmiu pierwiastków w surowicy krwi metodą absorpcyjnej spektrofotometrii atomowej bezpośrednio po jej rozcieńczeniu wodą oraz po zmineralizowaniu na sucho i w kwasach, celem wyboru sposobu dającego miarodajne wyniki, a jednocześnie najmniej pracochłonnego. Na podstawie danych z piśmiennictwa wynika, że najczęściej zalecane są następujące sposoby przygotowania surowicy krwi do analiz metodą ASA:

#### A. Metody rozcieńczania:

1. odpowiednie rozcieńczenie surowicy wodą (3) lub 0,1n HCl (2),
2. dodatek do rozcieńczonej surowicy soli lantanu lub strontu przy oznaczaniu wapnia (1, 3, 9),
3. dodatek do roztworów wzorcowych gliceryny (3) lub albuminy (7) przy analizie surowicy rozcieńczonej w niewielkim stopniu, w celu wyrównania właściwości fizycznych roztworów badanych i wzorcowych.

B. Metody oparte na mineralizacji surowicy:

1. spalanie w stężonych kwasach mineralnych (8, 11),
2. spalanie na sucho w temp. około 500°C i rozpuszczanie popiołu w kwasie solnym (8, 11).

C. Metody odbiałczania surowicy np. przy użyciu kwasu trójchlorooctowego (TCA), stosowane głównie przy oznaczaniu Fe oraz Cu i Zn (3, 6, 7).

Aparatura i odczynniki. Pomiary wykonano na jednowiązkowym spektrofotometrze absorpcyjnej atomowej Perkin-Elmer, model 300 metodą płomieniową. Używano palnika jednoszczelinowego o długości szczeliny 10 cm. Gazem palnym był acetylen o przepływie 2,1 l/min., a utleniającym powietrze o przepływie 16 l/min. Wysokość palnika względem osi optycznej ustawiano dla każdego pierwiastka na maksymalną absorpcję. Szerokość szczeliny i długości fal rezonansowych ustawiano według wskazań instrukcji.

Używano roztworów wzorcowych i azotanu lantanu firmy Merck, a kwasów produkcji krajowej cz.d.a. oraz wody redestylowanej w szkle kwarcowym. Roztwory wzorcowe przechowywano w naczyniach polietylenowych.

#### Materiał i metody

Surowicę pochodzącą z krwi od kilkudziesięciu krów z d. woj. białostockiego otrzymano z Instytutu Fizjologii Zwierząt Akademii Rolniczej w Warszawie\*). Po połączeniu wszystkich próbek i dokładnym wymieszaniu otrzymano zbiorczą próbkę służącą do

\*) Panu prof. J. Mazurczakowi i jego współpracownikom wyrażamy podziękowanie za udostępnienie materiału do badań.