

FISKERIDIREKTORATETS SKRIFTER

Serie Undersøkelser ved Statens Fiskeriforsøksstasjon
(Fortsettelse av Serie Teknologiske Undersøkelser)

Reports from the Norwegian Fisheries Research Laboratory
Vol. I, No. 4

Published by the Director of Fisheries

Studier over den døde fiskemuskulatur og dens forandringer under lagring

II. Fysikalsk-kjemiske undersøkelser

Studies of the post mortem fishmuscle
and its alterations during storage

Av

Sverre Hjorth-Hansen
(Fra Avdeling for Mikrobiologi)

1 9 4 3

A.s John Griegs Boktrykkeri, Bergen

INNHALDSFORTEGNELSE.

	Side
Innledning	5
Tidligere undersøkelser	7
Acidimetrisk viktige stoffer i fiskemuskulaturen	11
Generelt om trintitrering og molær bindingsevne	13
Titreringskurver, trintitrering og syrebindingsevne av fiskekjøtt	14
Definisjon av spesifikk, partiell og total syrebindingsevne	16
Det sannsynlige forløp for S og R verdiers forandringer under lagring av fisk	19
Kritisk gjennomgåelse av Stansby og Lemons metodikk.....	22
Egne undersøkelser	24
Generelt om prøvetagning, analysemetoder og beregning	24
Preliminære undersøkelser	26
pH-forandringer i den døde muskulatur	34
Bestemmelser av spesifikk syrebindingsevne i farse, pres-safter etc.....	36
Tillegg: Torskerogn og dens aciditetsforhold	40
Torskerogn og dens oppløselighet ved forskjel- lige pH	41
Syrebindingsevnen av serum av silderogn og sildemelke	41
Sammenfatning	42
Summary and conclusion	44
Litteratur.....	47

INNLEDNING.

I fysikalsk-kjemisk henseende inneholder muskulatur to slags stoffer, elektrolyter og ikke-elektrolyter. Elektrolyter er anorganiske og organiske syrer og baser som foreligger delvis i fri delvis i bunden form som salter og dessuten amfolyter som aminosyrer, dipeptider samt enklere og mer komplisert sammensatte polypeptider hvortil eggehvitestoffene hører. Ikke-elektrolyter er stoffer som fettarter og kullhydrater.

Karakteristisk for alle elektrolyter er at de er i stand til å binde enten syrer eller baser og det avhenger av miljøets syretrinn, elektrolytenes konsentrasjon og deres spesielle dissosiasjonsforhold i hvilke kvantiteter syrer eller baser bindes innen visse områder på pH-skalaen.

Fiskemuskulaturen selv, pressafter, vannekstrakter og sera av den er utpregete puffermiljø, hvis pufferkapasitet forandrer seg når den døde fisk lagres. Dersom disse forandringer er store, vil målinger av fiskens pufferegenskaper kunne gi opplysninger om dens tilstand til en hver tid under lagringen og herav skulde der kunne trekkes slutninger om fiskens friskhetstilstand og eventuelt om dens holdbarhet. Takket være de seinere års forskning rundt om i verden vet en no en del om de forandringer som finner sted i muskulatur under lagring og en er derfor i stand til, på grunnlag herav, å gjøre seg opp en viss mening om de kvantitative forandringer av pufferevnen.

Mens fisken er i live, opprettholdes der et noenlunde konstant syretrinn, pH, i både muskelplasma og cellevæske. Disse syretrinn er ikke identiske (FENN 1935, BATE SMITH 1938), men forskjellen er ikke stor og utjevnes når fisken dør og begge faser antar da samme pH. Man måler pH-verdier omkring 7,2 i nettopp drept fisk. Verdien avtar raskt under glykogenolysen (omtrent samtidig med denne finner også fosfagenolysen sted) og når ned i en verdi som syns å være karakteristisk for de enkelte fiskearter, således ca. 6,3 for sei, 6,4 for torsk, 5,5 for kveite og 5,7 for håbrand. Fra no av stiger pH langsomt under videre lagring av fisken. Omtrent samtidig hermed vet vi at trimetylaminoxsydspaltende bakterier begynner sin virksomhet som fører til total spaltning av oksydet idet dette overføres til trimetylamin.

Alle disse og andre mindre kjente prosesser må ha stor innflytelse på miljøets pufferegenskaper innen forskjellige områder på pH-skalaen. For å kunne nytte disse forandringer for vårt formål, må vi derfor søke ut et bestemt område på pH-skalaen hvor forandringene gjør seg mest gjeldende.

En skal i dette arbeidet så langt det lar seg gjøre i dag, redegjøre for de acidimetriske forhold i fiskemuskulaturen og vise hvordan dens forskjellige komponenter bidrar til dens *syrebindingsevne* innen visse områder på pH-skalaen, såvel i »levende« fisk som i lagret fisk som er gjenstand for virksomhet av bakterieenzymmer. Videre gjennomgås kritisk STANSBY og LEMONS metode for påvisning av autolyse og bakterievirksomhet i fisk og endelig angis nye metoder av elektrometrisk art for samme øyemed ved opptagelse av titreringskurver av fiskefarse, pressaft, vannekstrakter og sera.

TIDLIGERE UNDERSØKELSER.

pH og titreringskurver i sin alminnelighet.

Angående elektrometriske og kolorimetriske pH-målinger og interpretasjon av slike målinger henvises til følgende bøker:

HOLGER JØRGENSEN: Wasserstoffionenkonzentration (pH), Steinkopff 1935.

FRANTZ FUHRMANN: Elektrometrische pH-Messung mit kleinen Lösungsmengen, Springer, 1941 og til følgende avhandlinger:

VAN SLYKE (1922), som angir den teoretiske basis for matematisk behandling av titrasjonskurver og beregning av pufferevne ved forskjellige pH,

HARRIS (1923), som benytter korreksjon av titreringsdata for aminosyrer og derved får et nøyaktigere innblikk i deres fysikalsk-kjemiske forhold og

HIRSCH (1924), som innfører begrepet molær bindingsevne og angir hvorledes vanlige titreringskurver blir ganske anderledes karakteristiske ved overføring til molære bindingsevnekurver.

pH og titreringskurver av fersk og lagret fisk.

FURUSAWA og KERRIDGE (1927) undersøkte ved hjelp av glasselektroden forskjellige marine dyrs syretrinn umiddelbart etter slaktning og seinere etter 20—24 timers lagring ved værelsestemperatur. Forsøksmaterialet bestod av forskjellige fiskesorter, hvoriblant *havål* og *marulk* og krepsdyr som *hummer*, *krabbe* og *eremittkreps* samt en del andre grupper. Umiddelbart etter slaktning målte de verdier mellom pH = 6,98 og pH = 7,13, etter lagring verdier mellom pH = 6,1—6,52 med en unntagelse, nemlig pH = 6,84 for hjertemuskel av *Maia squinado*.

BENSON (1928) brukte kinhydronelektroden ved pH-målinger i nydrept fisk som hadde fått forskjellig behandling før den ble drept. Fisk som var godt uthvilt etter i lengre tid å ha gått i fiskebrønn, hadde alltid alkalisk reaksjon, og der ble målt verdier helt opp til 7,3. Reaksjonen gikk straks i sur retning. Lysing hadde merkelig nok alltid alkalisk reaksjon selv under rigor. Dette må antas å skyldes en eller annen komponent karakteristisk for denne fisk. Torsk forble nøytral. Fisk som hyse, der var tatt opp med trawl, reagerte alltid surt og viste pH-verdier som dem der forekommer under rigor. Denne fisk var lite holdbar, mens uthvilt fisk med høyt glykogeninnhold langsomt gikk over i rigor og hadde større holdbarhet.

REED, RICE og SINCLAIR (1929) målte pH i hyseinuskulatur. Syretrippet økte fra pH = 6,3 til pH = 7,0 ved 24 timers lagring ved værelsestemperatur. Dette skyldtes bakterievirksomhet.

HINTERSATZ (1931) målte kolorimetrisk pH-forandringene i lagret fisk.

YAMAMURA (1933) anga å ha målt pH = 6,5 i fisk som lukter råttent.

STANSBY og LEMON (1933) ga en oversikt over de prosesser som finner sted i muskulaturen etter at fisken er død. De deler dem i 1. primære, rent autolytiske prosesser og 2. sekundære forandringer som skyldes bakterievirksomhet. Holdbarheten av fisken avhenger av to faktorer, nemlig fangstmetoden (som influerer på glykogeninnholdet) og lagringstemperaturen. De primære og de sekundære forandringer lar seg måle ved hjelp av en titreringskurve. Da hysen alltid har en pH høyere enn pH 6, vil en viss mengde hysefarse forbruke en viss mengde HCl før den antar pH 6. Dette forbruk uttrykt i ml n/60 HCl pr. 5 g farse kalles B og skal være et uttrykk for bakterievirksomheten. De titrerer så videre til pH = 4,3 og får et tilsvarende forbruk A, som skal være et uttrykk for de autolytiske omsetninger som de definerer som nedbrytning av proteinmolekylene. Altså forbruk fra opprinnelig pH til pH = 6 er et tall som må øke da der jo dannes ammoniakk (og aminer), mens forbruket fra pH = 6 til pH = 4,3 må avta, da pufferkapasiteten av muskelen avtar. Dog må A ha sin høyeste verdi under rigor da der jo dannes melkesyre og fosfater under denne tilstand. I praksis vil en som regel ikke kunne måle den noe lavere verdi i »levende« fisk. da rigor gjerne er inntrått før fisken kan analyseres. Forfatterne har utført størstedelen av sine undersøkelser med hyse, men angir at metoden også gjelder torsk og lyr. De forsøker også å måle autolysegraden ved hjelp av ledningsevnebestemmelser og angir en verdi R som skal ekvivalere A. Imidlertid er der visse vanskeligheter ved denne bestemmelse, da ledningsevnen ikke som potensialbestemmelsen bare indikerer vannstoffjonene, men alle joner, hvorfor behandlingsmåten av fisken før den kommer til analyse i laboratoriet, er av avgjørende betydning. Det er jo skikk og bruk at man ofte bestrør fisken med litt salt for å gjøre den mer holdbar for eksempel under forlenget transport i varmt vær. Ledningsevne-metoden kan derfor bare brukes hvor man er sikker på at dette ikke har funnet sted.

STANSBY og LEMON angir følgende gjennomsnittsverdier for lagret hyse:

Lagringsdager på is	Organoleptiske utsagn	A	Maksimal feil
0,25	Fersk, stiv	26	0,3
1		31	0,3
2	Fersk, ikke fullt så stiv	27,5	0,3
3		26	0,3
4		24	0,4
6	Fersk, litt fiskelukt	22,5	0,4
8	Mer fiskelukt, litt bløt	20	0,5
12	Typisk lukt, litt bløtere	19	0,6
18	Sterk lukt, bløt	17	0,8
21	Intens lukt, meget bløt	15	1,0

STANSBY og LEMON angir at metoden er empirisk. De mener å ha oppnådd så gode resultater med den at den er fullt tjenlig til å bestemme fiskens relative ferskhetsgrad. Imidlertid har ingen annen kunnet reproducere den jevne synkning i A-tallene som forfatterne har funnet, av grunner som vi seinere skal komme inn på i dette arbeid.

POLOEKTOFF (1933) målte pH = 6,6—6,8 i frisk fisk, pH = 6,9 i fisk som

så vidt er begynt å ødelegges og pH = 6,9—7,2 i fisk som tydelig er gått i forråtnelse.

NOTEVARP og HJORTH-HANSEN (1933) målte pH og opptok titreringskurver av press-saft av frisk og lagret småsei. Den friske fisk viste pH = 6,9—6,94 6 timer etter slaktingen. Denne pH-verdi sank under lagring ved 0° C i løpet av de første døgn for atter å stige etter det 5. (den laveste verdi vi seinere har funnet er pH = 6,3 for denne fisk) og når verdien er kommet opp igjen til ca. 6,7, er sikkert grensen nådd for småseis brukbarhet. Da analysene er utført på enkeltfisk og det ikke ble bestemt tørrstoff i pressaften, er det ikke mulig sikkert å interpretare titreringskurvene.

NICKERSON og PROCTOR (1935) undersøkte sterile og infiserte hysemuskler ved forskjellige lagringstemperaturer. Deres materiale var ikke «levende» fisk, men fisk som innen en time etter fangsten var frosset ved $-17,8^{\circ}$ C og oppbevart ved denne temperatur inntil forsøkene kom i gang. Blant de mange undersøkelser ble også bestemt A og B verdier etter STANSBY og LEMON, men det var ikke mulig å kunne reproducere deres kurveforløp for disse verdier hverken i sterile eller infiserte muskler. De finner ingen annen forklaring herfor enn at fisken hadde vært frosset på forhånd og at eggehvitestoffene derfor er denaturert. De målte også pH i sterile og infiserte muskler. I sterile prøver syntes der å finne sted en svak tilbakegang i pH, mens der var tydelig økning å spore i de infiserte.

BOURY og SCHWINTE (1935) utførte kolorimetrisk pH-bestemmelser ved hjelp av para-dinitrofenol i fiskeekstrakter, men fant bare for skate en viss overensstemmelse mellom pH og tilbakegang i friskhet.

BEATTY og GIBBONS (1937) kritiserer STANSBY og LEMONS metode som de finner er basert på feilaktige premisser. De såkalte «sekundære» produkter dannes ikke av proteinstoffer, men av kvelstoffholdige ikke-proteinstoffer i muskelen. Når A-verdiene synker, så er dette stikk imot forventning da spaltningen av proteinmolekylene må medføre dannelse av fri amino- og karboksylgrupper. Herved skulde pufferkapasiteten stige.

CUTTING (1937) kunde i likhet med NICKERSON og PROCTOR ikke reproducere STANSBY og LEMONS kurveforløp, men oppnådde et forløp som er mer sannsynlig. Han sier: «the method, however, is an empirical one, and the explanation of the change in the A and B values during stowage, must be far from simple». CUTTING påpeker at muskelen inneholder trimetylaminoksyd som er en god puffer over halve A-området i pH. Dette oksyd reduseres til trimetylamin som ikke har noen som helst puffervirkning innen dette område. Derimot puffer trimetylaminet innen det område som B-verdien representerer. Derfor må der være en viss forbindelse mellom A og B verdier.

VAN DEURS og HOFF-JØRGENSEN (1935) benytter pH-bestemmelser som kontroll for brukbarheten av fileter. pH synker fra 7,2 i «levende» fisk til ca. 6,9 under rigor. Deretter øker pH igjen og når verdien 7,5 nåes, overskrides grensen for brukbarheten av filetene.

Stoffer som innvirker på syretrinnnet og syrebindingsevnen av fiskemuskulaturen.

SUWA (1909) påviste trimetylaminoksyd i marine dyr og fant at visse bakterier spaltet stoffet til trimetylamin.

SHARP (1935) viste at der dannes variable mengder melkesyre i fiskemuskulaturen når fisken blir drept.

HUNTER (1928) fant at kreatin og fosforsyre i levende muskulatur var bundet som fosfagen, en forbindelse som spaltes så snart dyret dør.

MACPHERSON (1932) fant at hysemuskulatur fra fisk som ble drept i uthvilt tilstand, inneholdt fra 0,4—0,06 g glykogen/100 g og ca. 30—90 mg melkesyre/100 g. pH går ned fra ca. 7,0 til 6,45. Da er glykogenet omtrent forsvunnet og muskulaturen inneholder meget melkesyre i stedet.

ACKERMANN og HOPPE-SEYLER (1929) påviste anserin og karnosin i en rekke fisk.

Fiskesort	Anserin	Karnosin
Håbrand	+	—
Torsk	+	—
Sild	—	—
Havål	+	—
Ål	—	+
Abbor	—	—

Analysemetoder.

STANSBY og LEMON (1933) uttar 20 g muskelstykker som gjennomsnitt av 5—6 fisk og maler denne mengde på kjøttkvern. Av farsen veier de inn 5 g som has over i en 150 ml flaske og tilsettes 70 ml vann. Flasken tilproppes og festes i en rystemaskin hvor den går i 10 minutter. Innholdet bringes over i en 200 ml Erlenmeyerkolbe og tilsettes 0,3 g kinhydron. Flasken etterskylles med 30 ml vann og skyllevannet forenes med hovedprøven. Denne rystes i 2 minutter, hvorefter innholdet holdes over i et 250 ml begerglass som tjener som elektrodekar. De anbringer en platinaelektrode i suspensjonen og forbinder elektrodekaret med sammenlikningselektroden (en kalomelektrode). pH måles, hvorefter der titreres langsomt med 0,0165 normal HCl under røring. Avlesningene skjer når potensialene er »konstante« (hvilket som regel tar minst 2 minutter hver gang, i et anført tilfelle oppnår de ikke konstans på 8 minutter). Mellom potensialene 140—170 millivolt må der titreres bare i dråpevis da man i motsatt fall seinere er utsatt for »drifting« potensialer i nærheten av 200 millivolt. Hele titreringen tar ca. 15—30 minutter.

NOTEVARP og HJORTH-HANSEN (1933) framstillet en pressaft av fiskemuskulaturen. Pressafta i porsjoner på 2 ml tilsettes 0,1 normal HCl og 0,1 normal NaOH og der fylles opp til 5 ml i alle prøver før pH-bestemmelsen. Prøvene får en viss henstand (1 time) før denne. Målingene gjøres med kinhydronelektroden. Som sammenlikningselektrode ble brukt en acetatelektrode etter MICHAELIS.

CUTTING (1937) forenkler STANSBY og LEMONS metode ved framstillingen av prøvene idet han innveier 5 g farse direkte i målekarret og der fordeler den i vann med en kontinuerlig drevet rører. Farsen er framstillet som gjennomsnitt av 10 fisk. Forfatteren bruker glasselektroden som han finner er å foretrekke for kinhydronelektroden.

ACIDIMETRISK VIKTIGE STOFFER I FISKEMUSKULATUREN.

Som nevnt inneholder muskulaturen mange stoffer av elektrolytisk natur. En del av dem er syrer, men vel de fleste er baser, og der forekommer både middels sterke og svake av begge grupper. Mange forekommer i så små kvantiteter at de ikke er av noen særlig betydning for de acidimetriske forhold i muskulaturen. Men der finnes også slike som dannes under lagringen ved omsetninger av andre stoffer som allerede forekommer i den levende muskel og derfor kommer til å spille en større eller mindre rolle for den lagrete fisks acidimetri. I omstående tabell er anført de stoffer som må formodes å ha størst innvirken på pufferevnen innen et noe videre pH-område enn bare det fysiologiske. I tabellen finner en dissosiasjonsekspONENTENE som viser oss hvor stoffet har sitt optimale pufferområde. Videre er angitt de omtrentlige mengdeforhold stoffene forekommer i. Men disse mengdeforhold er sikkert underkastet store variasjoner. Det analysemateriale en finner i litteraturen er ufullstendig, som regel ikke innbyrdes sammenlignbart, og no for det meste så gammelt at det ikke lenger tilfredsstiller vår tids krav. Meget av det danner en stadig ballast i litteraturen. Der trenges derfor undersøkelser hvor analysen ikke utføres for sin egen skyld, men for å bidra til å løse bestemte problemer. De angitte dissosiasjonsekspONENTER er av temmelig ny dato og bestemt ved hjelp av potensialmålinger. Man kan selvsagt ikke angi noen dissosiasjonsekspONENTER for eggehvitestoffene, men man kjenner ganske godt mengden av dem for torsk og hyse.

Acidimetrisk viktige stoffer i fiskemuskulaturen.

Navn	DissosiasjonsekspONENTER				Konsentrasjon g/100 g		
	Syrer		Baser pk ₁	Optimalt puffertrin	»Le- vende«	Rigor	Be- dervet
	pk ₁	pk ₂					
<i>Syrer:</i>							
Kullsyre	6,45	6,81		6,5			
Fosforsyre				6,8	0,02	0,16	
Melkesyre	3,8			3,8	0,01	0,5	spor
Eddiksyre	4,63			4,6	0	0	0,2
<i>Aminosyrer:</i>							
Histidin	6,15 (imidazolgruppen)		9,3	6,2 4,7 (im.gr.) (base)	0,03		
<i>Dipeptider:</i>							
Anserin	7,04 (im.gr.)		9,5	7,0 4,5 (im.gr.) (base)	0,2		
Karnosin	6,83 (im.gr.)		9,5	6,8 4,5 (im.gr.)	0,2		
<i>Ammoniaakk- derivater:</i>							
Ammoniaakk			4,69	9,4	0,008	0,006	0,1
Monometylammin			3,3	10,8	0		0,001
Dimetylammin . . .			3,13	11,0	0		0,003
Trimetylammin . . .			4,13	10,0	0,001		0,1
Trimetylammin- oksyd			9,4	4,7	0,2—1,4		spor
<i>Guanidinderivater:</i>							
Kreatin (total)			10,7	3,4	0,35		
Kreatinin			10,3	3,8			
<i>Eggehvitestoffer</i>							
Stromaprotein					2,5		
Myosin					9,5		
Globulin X					1,5		
Myogen					1,5		
Myoalbumin					0,2		

GENERELT OM TRINTITRERING OG MOLÆR BINDINGSEVNE.

Trintitrering er titrering med syre eller lut i en oppløsning eller en oppslemning mellom to valgte syretrin, pH_1 og pH_2 . Titreringen kan foretåes kolorimetrisk eller elektrometrisk, alt etter den nøyaktighet som kreves. Titrering i sur eller basisk retning betraktes som likeverdige idet man under beregningen bruker fortegn.

HIRSCH (1924) inndeler den syremengde en titrerer med i to deler, nemlig s som kalles den *fri* syremengde, det vil si den syremengde som meddeler systemet dets vannstoffionekonsentrasjon og r , som kalles den *bundne* syremengde, det vil si den syremengde som lægges beslag på ved saltdannelsen, nøytralisasjonen, ved absorpsjon og på grunn av komponentenes pufferevne. Den hele tilsatte syremengde, $t = s + r$, kalles den *totale* titermengde. Jo surere systemet er, desto høyere verdi antar s . Da r tilsvarer den ved en viss pH omsatte mengde av et stoff, får vi vite hvor meget et grammolekyl av samme stoff binder ved denne pH ved å dividere r med G som er det antall millimol av stoffet som forekommer i samme volum. Forholdet $\frac{r}{G}$ er den molære bindingsevne og betegnes ϑ . Den molære bindingsevne ϑ er uavhengig av arbeidsvolumet og er et forholdstall av samme art som dissosiasjonsgraden. For dem begge gjelder uttrykket

$$\vartheta, \text{ resp. } \alpha = \frac{1}{1 + \frac{C_H}{k}} \text{ (en-verdig syre).}$$

Molære bindingsevnekurver får vi om vi anbringer ϑ -verdiene som ordinat mot pH som abscisse og disse kurver illustrerer i enklest mulig form de partielle pufferes virkningsområde innen pH-skalaen. Molære bindingsevnekurver kalles også *korrigerte* titreringskurver.

TITRERINGSKURVER, TRINTITRERING OG SYREBINDINGSEVNE AV FISKEKJØTT.

Når en opptar titreringskurver av en blanding av forskjellige stoffer, hvorav flere kanskje er av ukjent art, er det skikk og bruk å nytte et vidt område på pH-skalaen, for eksempel fra $\text{pH} = 9$ til $\text{pH} = 3$. Kjenner en stoffblandingens sammensetning godt og også dens karakteristiske pufferegenskaper, kan en nytte et mer begrenset pH-område for øyemedet. Uten nærmere å angi alle hysens acidimetrisk viktige bestanddeler, valgte STANSBY og LEMON områdene $\text{pH} = 6$ til $\text{pH} = 4,3$ og fiskens aktuelle pH til $\text{pH} = 6$ som karakteristiske områder. Vi har bibeholdt disse trin ved den metodikk som seinere omtales i dette arbeid og videre undersøkelser vil vise om det er formålstjenlig å forandre herpå, hva en på det nuværende tidspunkt ikke holder for helt urimelig.

For alle fisk hvis minimale pH under rigor ligger over $\text{pH} = 6$, utfører man titreringskurven kun ved tilsetning av saltsyre. En del fiskesorter har imidlertid en lavere minimal pH når den er dødsstiv og man kan måle pH-verdier mellom 5—6. Ved målinger av disse fiskearter må man derfor også titrere med natronlut opp til $\text{pH} = 6$ og syrebindings-
evnen innen området: fiskens aktuelle pH til $\text{pH} = 6$, blir da negativ.

Syrebindingsevnen av fiskemuskulaturen innen et slikt valgt område avhenger, som en vil forstå, av hvilke stoffer i fisken som har sin optimale pufferevne innen dette område. Vi vil se litt nærmere på angjeldende stoffer innen området $\text{pH} = 8$ til $\text{pH} = 4$ idet vi erindrer at lagret fisk i bedervet tilstand når opp i en så høy pH-verdi som ca. 8. Det viser sig da at følgende stoffer har pufferevne her: kullsyre, fosforsyre, eddiksyre, histidin, anserin, karnosin og trimetylaminoksyd. Som bekjent har pufrende stoffer også pufferkapasitet som stadig avtar i begge retninger fra optimum. Eksempelvis er virkningen bare 25 % i en avstand av 1,1 enheter i pH. Stoffer med optimum over 8 og under 4 vil derfor også komme til å gjøre seg gjeldende og vi må derfor ta hensyn til stoffer som melkesyre, kreatin og kreatinin om vi skal forstå kurvens forløp ned mot $\text{pH} 4,3$. I den annen ende av kurven synes forholdene å være noe enklere. Her er det bare ammoniakken som kan tenkes å ha en viss innflytelse, men man vil forstå at den ikke kan

DEFINISJON AV SPESIFIKK, PARTIELL OG TOTAL SYREBINDINGSEVNE.

Før no å kunne utlede hvordan syrebindingsevnen av fiskemusku-
laturen vil måtte forandre seg når fisken er død og gjennomgår visse
forandringer av biokjemisk og bakteriell art, må vi foruten å kjenne
konsentrasjonen av de forskjellige stoffer i fisken og deres dissosiasjons-
forhold i »levende« fisk, også ha et visst kvantitativt kjennskap til disse
stoffers konsentrasjonsforandringer som er resultatet av disse kjemiske
og bakterielle omsetninger. I store drag har vi dette, vi vet for eksempel
hva som skjer under rigor mortis og vi vet også at trimetylaminoksyd
spaltes og forsvinner fra fisken idet stoffet reduseres av fakultativt
anaerobe bakterier. Hvilken skjebne karnosin, resp. anserin er under-
kastet, kjenner vi dessverre ingenting til, heller ikke foreligger der under-
søkelser over dannelse av kullsyre i lagret fisk. Om kullsyren og eddik-
syren vet man (WATSON 1939) at de dannes når bakteriene omsetter
trimetylaminoksyd og om melkesyren at den forsvinner under samme
prosess.

Før vi foretar en approksimativ beregning av syrebindingsevnen
forandringer under de forskjellige faser under lagringen av fisken, opp-
stiller vi følgende definisjoner:

Den *spesifikke* syrebindingsevne er det antall mg HCl ($M = 36,5$)
som bindes av 1 g *tørstoff* av farse, pressaft, vannekstrakt, serum,
dialysat eller en kjemisk veldefinert enkeltkomponent innen et visst
område på pH-skalaen. Vi bibeholder foreløbig de samme områder
som STANSBY og LEMON og kaller syrebindingsevnen S innen området
 $\text{pH} = 6$ til $\text{pH} = 4,3$ og R innen området prøvens aktuelle pH til $\text{pH} = 6$.

Den spesifikke syrebindingsevne av veldefinerte kjemiske kompo-
nenter beregnes etter følgende formler:

$$S = 1000 \cdot 36,5 \frac{\partial_6 \div \partial_{4,3}}{M} \text{ og } R = 1000 \cdot 36,5 \frac{\partial_m \div \partial_6}{M}$$

hvor m er en pH verdi > 6 og M er molekylvekten av det spesielle stoff eller dets natronsalt.

Den *partielle* syrebindingsevne er produktet av en enkeltkomponents spesifikke syrebindingsevne og dens tørrstoffmengde i 100 g farse, 100 ml pressaft, vannekstrakt etc. og betegnes p_s og p_R . Mens den partielle syrebindingsevne lett kan beregnes for veldefinerte enkeltkomponenter når man kjenner deres molære syrebindingsevner, må eggehvitestoffenes partielle syrebindingsevne bestemmes eksperimentelt. No er dette ikke så enkelt, da eggehvitestoffene denatureres helt eller delvis under framstillingen. Vi har derfor i dette arbeid funnet det formålstjenlig å gå en omveg. I stedet for å framstille hvert enkelt eggehvitestoff i ren tilstand (hvilket er et møysommelig arbeid) har vi delt fiskemuskulaturens bestanddeler i analytisk praktiske grupper, nemlig vannoppløslige og ikke vannoppløslige fraksjoner. Den vannoppløslige fraksjon består foruten av bindeveg også av myosin og noe globulin X, mens den vannoppløslige fraksjon består av alle ikke-proteinstoffer samt av myogen, myoalbumin og resten av globulin X. Syrebindingsevnen av de vannoppløslige ikke-proteinstoffer bestemmes i et serum hvorved vi oppnår midler til å bestemme syrebindingsevnen av de i vann oppløste eggehvitestoffer indirekte. Den kan også bestemmes direkte i en dialyserest. Syrebindingsevnen av den uoppløslige fraksjon bestemmes direkte.

Den *totale* syrebindingsevne er det antall mg HCl som bindes av 100 g farse, 100 ml pressaft osv. innen de nevnte områder og betegnes T_s og T_R . Den totale syrebindingsevne kan beregnes ved summering av de *partielle* syrebindingsevner.

$$T_s = \sum P_{s_n} = S_1 \cdot c_1 + S_2 \cdot c_2 + \dots + S_n \cdot c_n$$

$$T_R = \sum P_{R_n} = R_1 \cdot c_1 + R_2 \cdot c_2 + \dots + R_n \cdot c_n$$

Den er ennvidere produktet av den spesifikke syrebindingsevne og tørrstoffinnholdet (g/100 g, g/100 ml) av farsen, pressaften osv.

$$T_s = S \cdot c_t$$

$$T_R = R \cdot c_t, \text{ hvor } c_t \text{ er tørrstoffinnholdet.}$$

I omstående tabell finner man de spesifikke syrebindingsevner for kjemisk veldefinerte stoffer i fiskemuskulaturen av betydning for dens acidimetri. For å muliggjøre en beregning av muskulaturens spesifikke syrebindingsevne også under optimal rigortilstand, er tatt med den spesifikke syrebindingsevne innen området pH = 6,3 til pH = 6 idet pH = 6,3 synes å være det laveste syretrinn som nåes ved fisk som hyse, sei, lyr og torsk. Beregningsgrunnlaget må forandres for fisk hvis rigor mortis-pH er en annen.

Spesifikk syrebindingsevne av stoffer i fiskemuskulaturen.

Stoff	Optimalt puffertrin	Molekylvekt	Spesifikk syrebindingsevne		
			pH = 6- pH = 4,3	pH = 6,3- pH = 6	pH = 7,2- pH = 6
Kreatin	3,3	131,1	24,8		0,5
Kreatinin	3,6	113,1	52,9		0,5
Melkesyre	3,8	* 112,0	58,7	0,9	2,0
Eddiksyre	4,6	* 82,0	285,0	13,9	17,2
Trimetylamino- oksyd	4,7	75,1	324,0	10,1	17,5
Histidin	6,2	155,1	165,0	6,8	13,6
Kullsyre	6,4	84,0	111,0	66,5	256,0
Fosforsyre	6,8	142,1	33,6	26,2	148,8
Anserin	4,8 og 7,1	240,1	110,0	24,5	83,6
Ammoniakk . .	9,4	17,0	1,6	0,7	23,0
Trimetylamin .	9,9	59,0			1,1

* Natronsaltet.

DET SANNSYNLIGE FORLØP FOR S OG R VERDIERS FORANDRINGER UNDER LAGRING AV FISK.

Ved å sammenholde tallene for spesifikk syrebindingsevne og konsentrasjon av de forskjellige stoffene i fiskemuskulaturen, ser man at mange av dem ikke er av særlig stor betydning for den totale syrebindingsevne og dermed for muskulaturens spesifikke syrebindingsevne. På grunnlag av noen foreløpige målinger for eggehvitestoffene og ved hjelp av tallene i tabellene side 12 og side 18 kan vi angi nedennevnte tilnærmete partielle syrebindingsevner for de acidimetrisk viktigste stoffene i »levende« fisk, fisk i rigortilstanden, og fisk som etter noen tids lagring igjen er kommet opp til syretrinnet $\text{pH} = 7,2$.

Tilnærmete partielle syrebindingsevner av bestanddelene av sei (S).

Stoff	»Levende«	Rigor	pH igjen 7,2
Uopløselig fraksjon	140	140	140
Oppløselig eggehvite	52	52	52
Trimetylaminoksyd	160	160	0
Anserin	20	20	5
Fosforsyre	1	7	7
Kullsyre	3	3	17
Kreatin	4	9	2
Kreatinin	2	2	0
Histidin	5	5	2
Melkesyre	2	30	0
Eddiksyre	0	0	60
Ammoniakk	0	0	0
Total syrebindingsevne	389	428	285
Spesifikk syrebindingsevne, S	17,6	19,4	12,9

Av det ovenanførte framgår at de viktigste puffere i »levende« fisk ved siden av eggehvitestoffene er trimetylamin og anserin, som tilsammen bidrar med ca. 96 % til den samlede syrebindingsevne mellom $\text{pH} = 6$ til $\text{pH} = 4,3$. S søker til et maksimum under rigor. Når trimetylaminoksydet tilslutt forsvinner, forårsaker dette stor forandring i syrebindingsevnen, en forandring som dog delvis kompenseres ved dannelsen av kullsyre og eddiksyre som samlet utøver halvparten så stor puffervirkning som trimetylaminoksydet.

Det skjer også karakteristiske forandringer av syrebindingsevnen innen området fra muskulaturens aktuelle pH til pH = 6.

Tilnærmete partielle syrebindingsevner av bestanddelene av sei (R).

Stoff	»Levende«	Rigor	pH igjen 7,2
Uopløselig fraksjon	30	6	30
Oppløselig eggehvite	25	4	25
Trimetylaminoxid	9	5	0
Anserin	17	5	7
Fosforsyre	5	5	30
Kullsyre	8	2	36
Kreatin	0	0	0
Kreatinin	0	0	0
Histidin	1	0	1
Melkesyre	0	0	0
Eddiksyre	0	0	4
Ammoniakk	0	0	2
Total syrebindingsevne	93	27	133
Spesifikk syrebindingsevne, R	4,3	1,2	6,0

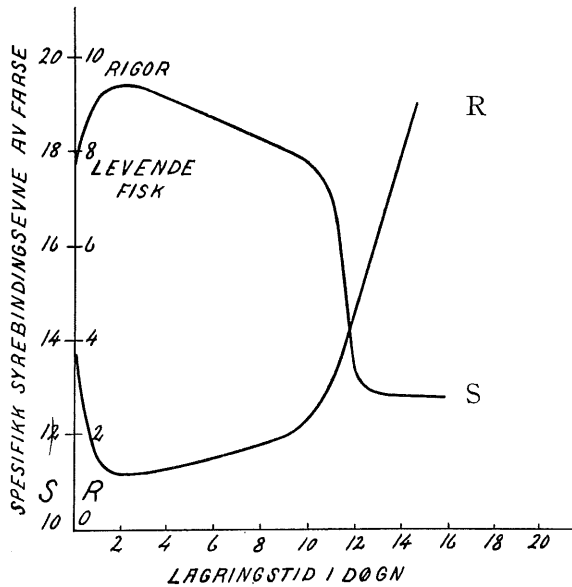


Fig. 2.

Sannsynlig forløp for S og R-forandringer under lagring av småsei ved 0° C.

R avtar til et minimum under maksimal rigor hva STANSBY og LEMON også fant for B. Seinere vil tallet stadig stige, idet der jo dannes ammoniakk, hvorved syretrinet øker og medfører større spesifikk syrebindingsevne av de forskjellige stoffer. Som man ser er det fremdeles den uopløselige fraksjon, den oppløselige eggehvite, trimetylaminoxidet og anserinet som er de viktigste pufferne og hertil kommer så kullsyren i den »levende« fisk og både kullsyren og fosforsyren i den gamle fisk.

Hvordan S-verdien vil forandres under forråtnelsen, er det ikke lett å uttale seg om, en mangler kjennskap såvel til eggehvitestoffenes som til anserinets (karnosinets) syrebindingsevner under forskjellige stadier av denne.

På grunnlag av disse orienterende beregninger har vi tegnet et sannsynlig forløp for forandringene av S og R som framgår av fig. 2.

Kurven for det sannsynlige forløp av syrebindingsevnen av lagret mager fisk støttes godt av det kurveforløp som CUTTING og også vi (side 31) har funnet eksperimentelt og forløpet for R støttes helt både av CUTTINGS og STANSBY og LEMONS resultater for B.

Da man i praksis ikke alltid får fisken til undersøkelse i tilstanden »levende«, men mer eller mindre tilnærmet i rigor, vil man for slik fisk måle S og R verdier som seinere under lagringen for S vedkommende alltid avtar, mens R alltid tiltar.

KRITISK GJENNOMGÅELSE AV STANSBY OG LEMONS METODIKK.

Under tidligere undersøkelser er beskrevet hva STANSBY og LEMONS metode går ut på og hvordan den utføres i praksis. Etter en tid å ha beskjefteget oss med titreringskurver av fiskemuskulatur hovedsakelig av frisk, nydrept torsk og sei, gikk vi over til å prøve denne nye metode. Av forskjellige grunner fant vi den ikke så lett å oppnå resultater med som det syntes å framgå av STANSBY og LEMONS arbeid. Det var blant annet vanskelig å få konstante potensialer og derfor ikke så lett å få reproduerbare tall. Vi gjennomgikk den derfor kritisk i alle sømmer og vil framlegge resultatene herav i det følgende.

STANSBY og LEMONS påstand er: »The only substance whose decomposition is of any importance during the spoilage of the flesh of these fishes is the protein. A measure of the protein hydrolysis or decomposition will give an indication of the freshness of the flesh«, og »In developing the present method, it was thought more advisable to follow the disappearance of the protein molecule than to observe the formation of any one end product. It was found that the buffer capacity of a haddock solution decreased as primary changes occurred in the flesh. By choosing a pH range over which the buffer capacity of the *inorganic* constituents of the flesh (mostly phosphate) was at a minimum, a sensitive index of the primary changes was obtained. Such a range is between pH 6,0 and 4,2«.

Forfatterne ser altså helt bort fra andre organiske, eventuelt anorganiske stoffer som dog måtte kunne tenkes å ha en viss innflytelse på pufferevnen. Blant annet var jo trimetylaminoksyd forlengst funnet i fisk da denne metode ble utarbeidet. Av våre beregninger framgår det at trimetylaminoksydet bidrar til S verdien med omkring 40 % og til R verdien med omkring 10 % i den »levende« fisk. Når de søker etter et område hvor andre stoffer enn nettopp dem de vil finne forandringene av, nemlig eggehvitestoffene, er i pufferminimum, kan det ikke være nok at bare de anorganiske puffere (fosforsyre) er det. Skal forandringene av eggehvitestoffene tre tydelig fram, må selvsagt *alle* andre stoffer befinne seg i pufferminimum. Men å finne et slikt område av en viss

størrelse, lar seg ikke gjøre. Derfor må man ta hensyn til alle de stoffer som forekommer innen det tilstrekkelig vide området en velger seg.

STANSBY og LEMON tar hensyn til fosfatene, men de nevner intet om hydrokarbonater som det dog må dannes mer og mer av når de trimetylaminoksyd-spaltende bakterier omsetter oksydet. Forfatterne er oppmerksomme på den rolle melkesyren vil komme til å spille for A-verdien.

Endelig tar de ikke hensyn til variasjonene i fiskekjøttets vanninnhold. Som nevnt før, ligger tørrstoffinnholdet i torsk mellom 17—22 g/100 g. Hvis vi vilde gå ut fra at sammensetningen ellers var lik i muskulaturen, vilde denne forskjell i vanninnhold allerede forårsake en ikke ubetydelig forandring i A-verdien. No kompenseres muligens denne forandring noe derved at vannfattig fisk og vannrik fisk har forskjellig kjemisk sammensetning, slik at vannfattig fisk inneholder relativt mindre mengde av ekstraktstoffer enn vannrik fisk. Dette vil vi komme tilbake til ved en seinere anledning.

Av rent måletekniske grunner kan der også være noe å utsette på metoden. Kinhydronelektroden er mindre nøyaktig for fisk som er lagret selv i forholdsvis kort tid, da den i så fall inneholder ammoniakk og svovelvannstoff.

Forfatterne gjør oppmerksom på at man aldri oppnår konstante potensialer. Derfor anbefaler de at man skal måle så snart potensialene er noenlunde konstante. Dette medfører dog en viss usikkerhet ved beregningen av A- og B-verdiene. Når det ikke er mulig å oppnå konstante potensialer når man titrerer en suspensjon, skyldes jo dette at man ikke venter lenge nok til at der er dannet likevekt mellom eggehvitestoffene og vannstoffjonene. Skal man alltid vente den fornødne tid mellom hver tilsetning av syre for å få likevektstilstand, blir titreringen vanskelig å gjennomføre med et større antall prøver på en gang.

STANSBY og LEMON synes først og framst å ha til hensikt å skaffe en metode av rent praktisk art som hurtig og sikkert skal kunne avgjøre om et fiskeparti er ferskt eller har vært lagret så og så lenge. En viss A-verdi sammenholdt med en viss B-verdi er avgjørende for hvordan fisken skal bedømmes. Når de diskuterer årsaken til A-verdiens tilbakegang under lagring, henviser de til den mulighet at de dekomposisjonsstoffer som dannes, kan ha en mindre pufferevne innen A-området enn de opprinnelig tilstedeværende stoffer. Dette er meget riktig, konferer trimetylaminoksydet. De kommer ikke nærmere inn på saken.

Det synes som om STANSBYS og LEMONS begge verdier, både A og B, registrerer bakterievirksomhet. Selv om A nok påvirkes av preautolysen, er det dog først når de trimetylaminoksyd-spaltende bakterier har maksimal vekst og virkning at A virkelig forandres i nevneverdig grad.

EGNE UNDERSØKELSER.

Undersøkelsene er foretatt over forskjellige spørsmål av metodisk art og over farsens, vannekstraktenes, pressaftens, dialysatets og serums spesifikke syrebindingsevne særlig hos frisk fisk.

Prøvetagning.

Prøvetagningen er omtalt i dette arbeids første del, hvorfor henvises til side 48 i dette.

Analysemetoder.

1. *pH-bestemmelser.*

Man kan foreta pH-bestemmelser i fisk både kolorimetrisk og elektrometrisk. Da den kolorimetriske metode mer sjelden er blitt anvendt av oss, vil vi her bare gi opplysning om hvordan den elektrometriske utføres. For det rent generelle ved den henvises til spesiallitteraturen.

25 g farse tilsettes 75 ml utkøkt destillert vann og rystes på Jena-glassflasker nr. 4170 b til farsen er jevnt fordelt og klumpefri. Etter 30 minutters henstand helder man suspensjonen enten direkte ned i det elektrometriske målekar eller gjennom et filter idet man slår vekk de første 20 ml, hvorefter målingen skjer i filtratet. Vi bruker enten kinhydron- eller glasselektroden men foretrekker å bruke glasselektroden.

2. *Titreringskurver.*

Denne metode avviker en del fra STANSBY og LEMONS og har den fordel at en oppnår riktige potensialer som er konstante under målingene.

a. Farsesuspensjon.

I minst 9 Jenaflasker nr. 4170 b innveies 25 g farse i hver. Der tilsettes 25 ml utkøkt destillert vann og blandes til suspensjonene blir klumpefri. Flaskene nummereres og der tilsettes stigende mengder 0,2 normal saltsyre til dem, for eksempel 0—2—4—7—12—15—18—

21 og 25 ml og den mengde vann som må til for å bringe volumet i samtlige opp til 100 ml. I den siste flaske bør tilsettes så meget saltsyre at pH blir ca. 4. Flaskene rystes av og til i løpet av 45 minutter og målingene foregår som nevnt under pH-bestemmelser.

Målingene kan skje i suspensjon, avhelt, noenlunde fiberfri væske eller i filtrater. Man måler litt høyere tall i suspensjon enn i avhelt væske, likesom denne igjen gir litt høyere tall enn filtrater. Forskjellen mellom suspensjon og filtrat er dog uten større betydning for den spesifikke syrebindingsevnes tallmessige verdi.

Samtidig med innveiningen av farsen til titreringskurven, innveies også to prøver til tørrstoffbestemmelse.

b. *Vannekstrakter, pressafter, sera og dialysater.*

100 ml vannekstrakt, serum eller dialysat eller 25 ml pressaft pipetteres over i et begerglass som anbringes i et Lautenschlägers stativ »für Handtitrationen«. Røreren settes igang og hvis målingen skal foregå med kinhydronelektrode, tilsettes no kinhydron. Fra en byrette tilsettes 0,1 normal saltsyre og potensialet som i disse væsker øyeblikkelig innstiller seg på konstant verdi, avleses etter hver tilsetning. Det må derfor være den i vann uoppløslige eggehvite som volder vanskeligheter i farsen når titreringen skjer som angitt av STANSBY og LEMON.

Ved sera må man også titrere med natronlut for eksempel til $\text{pH} = 7,5$, da disse oppløsninger som regel blir surere enn den vannstoffjonekonsentrasjon som svarer til $\text{pH} = 6$. For å bestemme R-verdien av sera, må man også bestemme pH i farsen.

Tørrstoffbestemmelser utføres samtidig.

c. *Uoppløslig rest.*

Et vannekstrakt framstilles av 250 g farse og 750 ml vann. Der filtreres eller centrifugeres og residuet vaskes ut flere ganger med vann. Residuet homogeniseres og der innveies porsjoner á 25 g som behandles videre som ved farse.

Tørrstoffbestemmelser utføres samtidig.

Overføring av titreringskurvene til korrigerte syrebindingskurver.

∫ utregnes for de forskjellige syretrinn og kurvene tegnes på rute-papir med ∫-verdiene som ordinator mot pH som abscisser. Av kurvene utledes S- og R- verdiene grafisk. Hvis man har målinger som ligger nær inntil $\text{pH} = 6$ og $\text{pH} = 4,3$ på begge sider, kan man også interpolere ∫ for disse pH.

Preliminære undersøkelser.

Framstilling av jernsera.

Framstilling av serum har til hensikt å befri fiskefarsen for eggehvitestoffene så man blir istand til å undersøke ekstraktstoffenes egenskaper isolert. Framstillingen av et jernserum er særlig formålstjenlig, da det kolloide jernhydroksyd koagulerer totalt ved 70° C, hvorved serumet blir jernfritt. Det etterlater litt saltsyre i serumet og øker derved dets vannstoffjonekonsentrasjon noe, men dette spiller ingen rolle for bestemmelsen av syrebindingsevnen. Det er av betydning at koagulasjonen av eggehvitestoffene skjer nær ved de isoelektriske punkter, for nettopp ved den pH som tilsvare disse, binder eggehvitestoffene minst mulig salter. Organiske vannoppløslige stoffer bindes neppe til eggehvitestoffene. Hvis koagulasjonen med kolloidalt jernhydroksyd skjer i en viss avstand fra området pH = 4,8—5,8 blir serumet gjerne blakket. Myosin og globulin X felles best ved pH = 5,5, resp. 5,2.

Der ble framstillet vannekstrakter og tilsvarende sera av seiefarse i tre innveininger, nemlig 25, 100 og 300 g farse/1000 ml. Ved samtlige sera ble tilsatt samme mengde kolloidalt jernhydroksyd, 40 ml/100 g farse. I disse ekstrakter og sera ble målt pH ved hjelp av fire glass-elektroder og kinhydronelektroder med en nøyaktighet av ± 0,01 i pH. Da kinhydronelektroder har eggehvitefeil, vilde derfor en differanse mellom pH-verdiene målt med de to elektroder vise nærvær av eggehvite. Gjennomsnittsverdiene av pH er angitt i tabellen.

Tabell 1. *pH i sera av sei.*

Innveining g/1000 ml	pH		Differanse
	Glass- elektrode	Kinhydrone- elektrode	
25	4,28	4,34	0,06
100	4,58	4,61	0,03
300	5,79	5,80	0,01

Tabellen viser da også at det serum som er framstillet av 25 g farse er i sureste laget, og kinhydronelektroden har her en eggehvitefeil på 0,06. Serumet inneholder derfor små mengder eggehvite. I mindre grad gjelder dette også serumet som er framstillet av 100 g farse, mens serumet fra 300 g farse har en pH som ligger ubetydelig på den annen side av den isoelektriske sone. Hvis vi derfor framstiller serumet av

ekstraktet ved en innveining av 200—250 g til 1000 ml og tilsetter ca. 40 ml kolloidalt jernhydroksyd til den mengde ekstrakt som tilsvarende svarer 100 g farse, skulde vi være sikre på at serumet antar en $\text{pH} = 5,0$ — $5,5$, hvilket skulde være tilfredsstillende.

Fortynningsgradens innflytelse på syretrinnet av farsen.

Det er påvist for en rekke produkter som jord og melk at fortynningen spiller en stor rolle for vannstoffjonekonsentrasjonen. Denne må derfor angis sammen med fortynningsgraden om man skal kunne bedømme den og kunne sammenlikne den med andre målinger som er utført. DØVLE (1938) finner således en forandring i pH på opptil 0,26 enheter ved 5 gangers fortynning av melk og utleder at denne forandrings størrelse ved konstant fortynning avhenger av melkens puffersystems sammensetning. Jo mer sitronsyre melken inneholder, dess større blir pH -forandringen (omvendt for hydrokarbonatjoner).

Mens man både for jord og melk har funnet at fortynningen innen et visst område ikke influerer på pH , nemlig ved meget høye konsentrasjoner (således kan melk tilsettes inntil 15—20 % vann før der skjer noen forandring i pH), er dette antakelig ikke tilfelle for fiske-muskelmasse, hvilket framgår av tabell 2. Ved grafisk framstilling av de vunne resultater vil man kunne utlede at en innveining av minst 100 g farse til 1000 ml er nødvendig for at man skal kunne arbeide innen et område som, om det ikke overalt gir samme pH , så dog i hvert fall gir pH -verdier som ligger på en svakt hellende *rett* linje. Fiskekjøttet selv kan ikke alltid måles med hensyn på pH , da vi ikke er istand til å forandre dets aciditet under opptakelse av titreringskurver uten tilførsel også av vann. Vi er derfor nødt til å utføre målingen i en eller annen fortynning som dog er så liten som det av praktiske grunner lar seg gjennomføre. Vi er blitt stående ved 250 g i 1000 ml som en brukbar konsentrasjon. Forandringene i pH ved fortynning av fiskefarse er omtrent like store som forandringene ved fortynninger av melk.

Ved forskjellige fortynninger av kokte reker er forandringene langt større enn ved fortynninger av farse. Dette skyldes rekenes innhold av koksalt som medfører stor jonestyrke i oppløsningene ved små fortynninger. Man får her en resultantvirkning av koksaltets og farsemengdens jonestyrker.

STANSBY og LEMON arbeider med en fortynningsgrad på 21, det vil si at de veier inn 5 g farse som fortynnes til 105 ml og heri foretas pH -bestemmelsen. De befinner seg derfor på den steileste del av kurven hvor en liten feilinnveining medfører et ikke så lite sprang i pH .

Tabell 2.

Konsentrasjons innflytelse på vannstoffjonekonsentrasjonen av fiskefarse.

Fiskesort	g farse / 1000 ml												Anmerkning	
	20	25	30	50	100	150	200	250	300	400	500	1000 press- saft		
Torsk	7,00			6,93		6,86		6,82			6,78			Oppslemning: glasselektrode
	6,81		6,78	6,75		6,71	6,52		6,49			6,28		Oppslemning: glasselektrode
	6,84		6,85	6,77		6,72			6,64		6,56	6,45		Oppslemning: glasselektrode
						6,54			6,66		6,57			Filtrat: glasselektrode
						6,52			6,48					Oppslemning: glasselektrode
								7,05	6,46					Oppslemning: vannstoffelektrode
			6,68		6,58		6,50		6,48			6,86		Oppslemning: glasselektrode
		6,70	6,70		6,59		6,51		6,49					Filtrat: vannstoffelektrode
Sei		6,62		6,62	6,56		6,53		6,50					Filtrat: glasselektrode
				6,62	6,59		6,50		6,47					Oppslemning: glasselektrode
Reker				8,55		8,36		8,20		8,04		7,72		Oppslemning: glasselektrode
kokte				8,45		8,34		8,18		8,08				Filtrat: glasselektrode

Vanlige og korrigerede titreringskurver av farse, vannekstrakt og serum fra samme fisk.

Figur 3 og figur 4 viser vanlige og korrigerede titreringskurver for en seiefarse og vannekstrakt og serum av samme. Av disse korrigerede kurver kan utledes at 1 g farsetørrstoff binder 17,7 mg HCl, 1 g ekstraktørrstoff binder 28,6 mg HCl og 1 g serumtørrstoff binder 50,8 mg HCl mellom pH = 6 og pH = 4,3.

Korrigerede titreringskurver av lagret fisk.

Hvis fiskens friskhetstilstand skal kunne bestemmes ved hjelp av titreringskurver, må disse ha et forløp som forandrer seg på en karakteristisk måte med lagringstiden. På fig. 5 er angitt en rekke kurver i korrigert form for småtorsk som ble lagret ved $-1/2^{\circ}$ C i 19 døgn. Som man ser avviker kurvene ganske meget fra hinannen. Kurvene gjelder vannekstraktene av torsken. Den ble lagret i $1/2$, 5, 7, 13, 15 og 19 døgn.

Den spesifikke syrebindingsevne for vannekstraktene er utledet av dette kurvemateriale og forløpet for forandringen av den spesifikke syrebindingsevne er vist på figur 6.

Kurven er i god overensstemmelse med det for syrebindingsevnen tidligere deduserte forløp og med CUTTINGS målinger. Det synes å framgå at syrebindingsevnen må kunne brukes som kriterium på fiskens friskhetstilstand.

Fortynningens innflytelse på den spesifikke syrebindingsevne av vann-ekstrakter.

Et vannekstrakt inneholder farsens oppløselige stoffer og jo mer konsentrert det framstilles, desto mer inneholder det forholdsvis av eggehvitestoffer fordi deres oppløselighet stiger med jonestyrken av oppslemmingen. Da eggehvitestoffer har en lavere spesifikk syrebindingsevne enn de vannoppløselige ikke-proteinstoffer i farsen må derfor den spesifikke syrebindingsevne av vannekstraktene avta med avtagende fortynningsgrad. Det framgår av tabellen at den spesifikke syrebindingsevne, i det minste for torsk, i så fall avtar mot en tilnærmet konstant verdi.

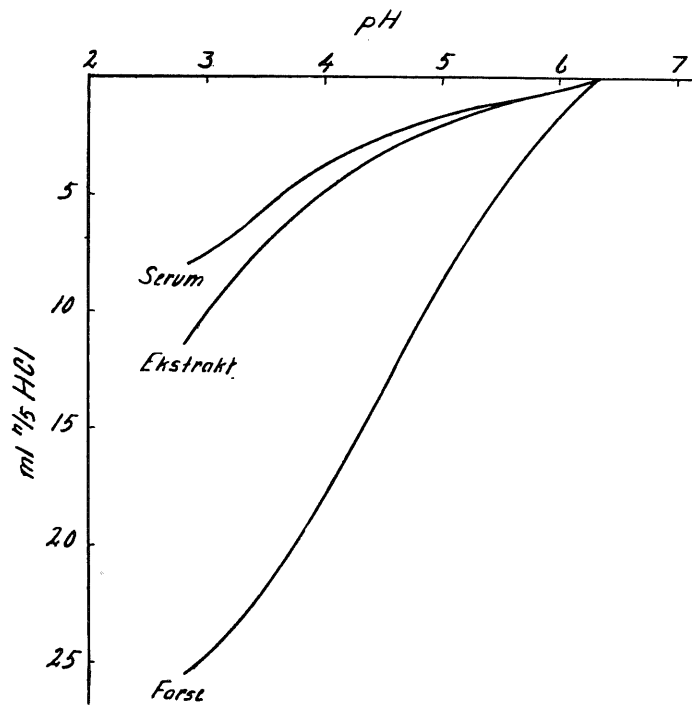


Fig. 3.

Vanlige titreringskurver av farse, ekstrakt og serum av samme fisk (småsei).

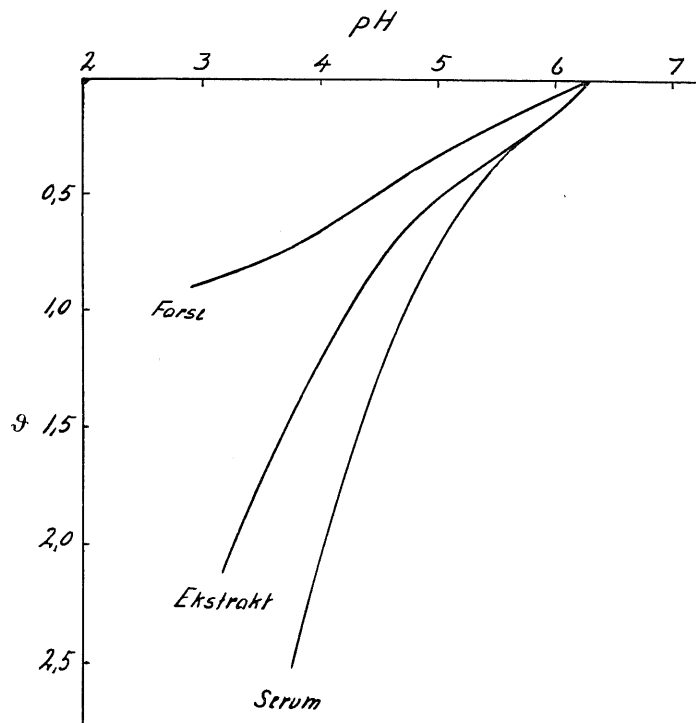


Fig. 4.

Samme kurver etter korreksjon.

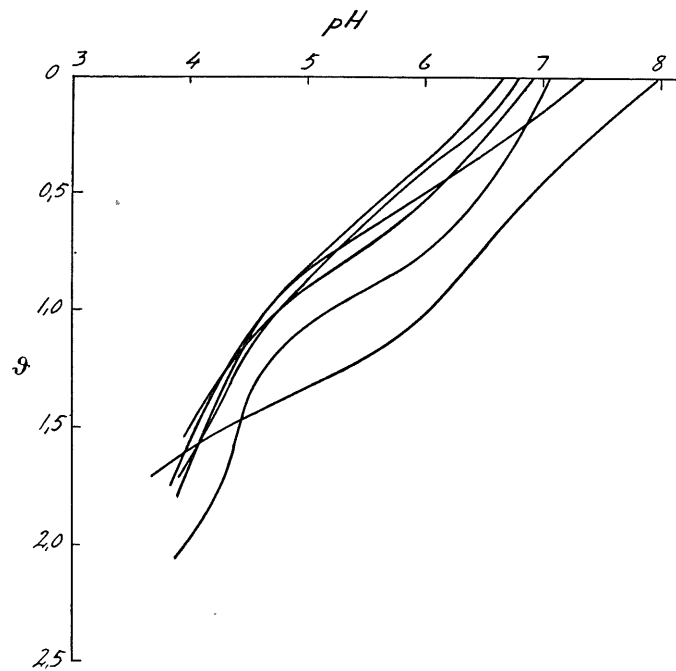


Fig. 5.
Korrigerede titreringskurver av lagret småtorsk.

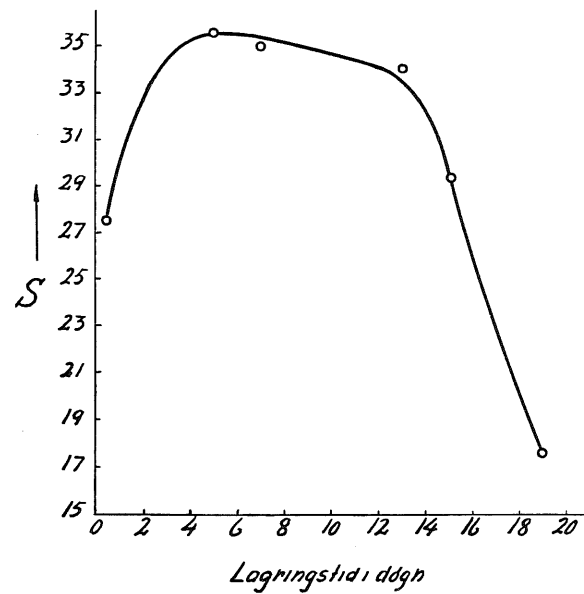


Fig. 6.
Forandringer i syrebindingsevnen av småtorsk lagret ved $\pm 0,5^{\circ}$ C.

Tabell 3. *Spesifikk syrebindingsevne av ekstrakter ved forskjellig fortynningsgrad.*

Fortynningsgrad	Spesifikk syrebindingsevne		
	Torsk I	Torsk II	Sei
20,6	39,4	—	—
10	—	39,8	—
9	34,6	—	—
5	33,3	—	28,7
4	—	38,8	—
3	33,0	—	—
2,5	—	38,6	26,6

Av tabellen framgår at man for torsk bør arbeide med en fortynningsgrad på høyst 5 for å være sikker på å holde seg innen det tilnærmet konstante område for ekstraktenes spesifikke syrebindingsevne. STANSBY og LEMON arbeider alltid ved det avsnitt av kurven hvor denne er mest steil i det de anvender en fortynningsgrad på 21. En liten variasjon i analysemetoden vil her måtte medføre en ikke liten avvikelse i tallverdi for A.

Fortynningens innflytelse på den spesifikke syrebindingsevne av sera.

Ved framstilling av sera har vi tidligere funnet at tørrstoffinnholdet i dem er proporsjonalt med farsekonsentrasjonen eller omvendt proporsjonalt med fortynningsgraden. Man skulde derfor vente at den spesifikke syrebindingsevne skulde bli den samme enten serumet ble framstillet lite eller meget konsentrert. At så er tilfelle framgår av tabellen.

Tabell 4. *Spesifikk syrebindingsevne av sera ved forskjellig fortynningsgrad.*

Fiskesort	Fortynningsgrad	Spesifikk syrebindingsevne
Sei	4	49,9
	2,5	50,1
Torsk	10	60,0
	4	60,3

Anvendelse av saltsyre og melkesyre som titreringsssyre.

Når man opptar titreringskurver, bruker man som regel sterk syre, resp. sterk base, saltsyre og natronlut som tilsetningsmidler for å oppnå forandringer i vannstoffjonekonsentrasjonen. Da der dannes melkesyre under glykogenolysen i fiskemuskulaturen, hvorved for eksempel torskemuskulaturen »titreres« ned til $\text{pH} = 6,3$, vilde man få et tall for hvor meget melkesyre der måtte dannes for å nå den nevnte pH ved å utføre en titreringskurve av torskefarse med melkesyre. Dette tall vil bli meget tilnærmet riktig hvis man går ut fra en nettopp drept fisk hvor glykogenolysen såvidt er begynt. Ved analyse av en enkelt torskefarse fant vi at 25 g farse av $\text{pH} = 7,09$ måtte tilføres 10 ml/ n10 melkesyre for å oppnå $\text{pH} = 6,3$, det vil si at der måtte tilføres 0,36 g melkesyre pr. 100 g farse. Under glykogenolysen dannes altså minst denne mengde, da der jo også dannes litt for å bringe den levende muskels pH ned til $\text{pH} = 7,09$.

Da melkesyrens dissosiasjonsekspONENT er ca. 3,8, må der bli et større forbruk av melkesyre som titersyre enn av saltsyre når man titrerer ned mot $\text{pH} = 4$, da man jo kommer et godt stykke inn på melkesyrens pufferområde. Virkningen blir stadig større jo mer man nærmer seg mot melkesyrens pufferoptimum. Med saltsyren tilføres der ingen pufrende stoffer og saltsyren gir derfor det største utslag i pH -forandring man i det hele tatt kan få. Ved bestemmelse av spesifikk syrebindingsevne ved hjelp av melkesyre skulde man derfor få en høyere verdi for S enn med saltsyre. En enkelt torskefarse ble undersøkt ved hjelp av glasselektroder og fire parallellserier ga som gjennomsnitt:

Tabell 5. *Torskefarse titrert med saltsyre og melkesyre.*

Titreringsssyre	Spesifikk syrebindingsevne	
	S	R
Melkesyre	29,9	12,2
Saltsyre	25,6	12,2

At R ikke influeres av melkesyretilsetningen var å vente da melkesyrens pufferevne mellom $\text{pH} 6-7$ er ganske ubetydelig.

Man kan bare bruke saltsyre som titreringsssyre ved bestemmelser av S, hvis reproducerbare og sammenliknbare resultater skal oppnås.

Ammoniakkens betydning for størrelsen av de spesifikke syrebindingsevner S og R.

Vi viste nettopp at melkesyren innvirket på S-verdien, men derimot ikke på R-verdien. På grunn av ammoniakkens lave dissosiasjons-eksponent $pK_b = 4,7$ (pufferoptimum ved $pH = 9,4$) vil den ikke komme til å virke målelig på S-verdiens størrelse, mens den får en avgjørende innflytelse for R-verdien, direkte i mindre målestokk, indirekte derimot meget idet økningen av ammoniakkonsentrasjonen også medfører økning av farsens pH , hvorved den spesifikke syrebindingsevne av de enkelte stoffer tiltar.

En fiskemuskel fra en nyslaktet torsk ble skåret ut sterilt (skinnfri) og lagt i en Esmarkskål som ble satt inn i en vacuumeksikator. På bunnen av denne ble anbrakt en liten skål. Eksikatorens ble evakuert og ved hjelp av en anordning på eksikatorlokket ble der suget noen ml konsentrert ammoniakkvann ned i skålen på bunnen av eksikatorens. Hensikten var at fiskemuskelstykket skulde få absorbere rikelig med ammoniakk. Etter 15 timers henstand, hvorunder der et par ganger var sluppet mer ammoniakkvann til, ble eksikatorens evakuert, hvorefter der ble sluppet på steril luft. Det ble vekselvis gjentatt 4 ganger. Fiskemuskelen ble malt på kvern og den meget ammoniakkeholdige farse ble titrert.

Tabell 6. *Innflytelsen av ammoniakk på syrebindingsevnen av torsk.*

Prøven	Spesifikk syrebindingsevne	
	S	R
Ubehandlet	21,4	6,4
Behandlet	21,3	21,0

R er steget til det tredobbelte av normal verdi, mens S ikke påvirkes det minste.

pH- $\text{forandringer i den døde muskulatur.$

Som vi før har nevnt foregår der visse enzymatiske reaksjoner i muskulaturen etter at fisken er død. Under disse omsetninger dannes der både syrer og baser. Til å begynne med dannes der sure stoffer i overskudd så muskulaturen antar stadig surere reaksjon. Når glykogenet er brukt opp, kan der ikke dannes mer melkesyre og den minimale

pH er da nådd. Seinere dannes der nok syrer som før, men disse syrer er svake syrer som eddiksyre og kullsyre og de influerer ikke så meget på vannstoffjonekonsentrasjonen at pH vil synke ytterligere. Hovedsakelig dannes no basiske stoffer og pH stiger og når i bedervet fisk opp i verdier henimot 8.

I tabell 7 finner man en del måleresultater av pH i fisk som har vært lagret ved 0° C i forskjellig tid. Disse tall er funnet i enkelt-fisk og er derfor ikke så pålitelige som tall der er framgått av et større antall målinger. Seinere vil vi utføre slike målinger ved hjelp av stikkelektroder som tillater en å følge pH-kurvens forløp gjennom lengre tid i den hele fisk.

Tabell 7. *Torsk lagret ved 0° C. 25 g farse + 75 ml vann.*

Antall timer etter slakting	pH	Anmerkning
0,5—3	7,33—7,19—7,09—7,07—7,06—7,05	
5	6,96—6,95—6,87—6,80	
20	6,63	
25	6,45	
36	6,32	
48	6,40	
120	6,66—6,68	
168	6,64—6,80	
312	7,04	
456	7,99—8,01	
		Nesten stiv meget stiv nesten stiv

Minimal pH som tilsvareer maksimal syreproduksjon der igjen antakelig medfører maksimal dødsstivhet, synes å inntre etter 1—2 døgn ved 0° C. Andres undersøkelser og også våre synes å vise en holdbarhetsgrense for småtorsk ved 10—11 døgn lagring ved 0° C. Etter tallene i tabell 7 å dømme skulde denne grense være nådd når pH igjen er steget til 6,9.

Ved hjelp av minst 2 pH-bestemmelser utført med noen tids forskjell kan man avgjøre om fisken nærmer seg mot eller fjerner seg fra rigor. Viser målingene avtagende pH-verdier, forestår rigor og fisken blir stivere og stivere, tiltar pH-verdiene befinner muskulaturen seg fremdeles i rigor eller er allerede begynt å mykne.

Som bekjent er kveiten en meget mer holdbar fisk enn torsken. Da den ikke er en i vanlig forstand fet fisk som sild og laks, men har sitt fett deponert lokalt, kan det ikke være fettete som gjør den utpreget

holdbar. Årsaken må være de store melkesyremengder som dannes under rigor og som bringer vannstoffjonekonsentrasjonen meget i været, slik at pH synker til ca. 5,5. Herved skapes meget slette utviklingsmuligheter for bakteriene, som alle gror best mellom pH = 6,5—7,5. Det tar derfor lang tid før bakteriene gjør seg gjeldende.

Tabell 8. *Kveite lagret ved 0° C. 25 g + 75 ml vann.*

Antall timer etter slakting	pH	Anmerkning
2—5	7,1—7,2	
36	5,67	
264	5,57	
360	1) 6,37 2) 6,40	1) Målt i suspensjon.
480	1) 7,01 2) 7,04	2) Målt i filtrat.

Bestemmelser av spesifikk syrebindingsevne i farse, pressafter etc.

I det følgende anføres en del bestemmelser av syrebindingsevner i farse, pressafter, ekstrakter og sera utført ved hjelp av de tidligere omtalte metoder.

Spesifikk syrebindingsevne av friske farser.

Tabell 9. *Spesifikk syrebindingsevne av farser.*

Fiskesort	pH	Farsens tørrstoffinnhold	Spesifikk syrebindingsevne	
			S	R
Sei	6,67	19,2	22,4	4,5
	6,36	19,2	22,3	3,4
	6,30	22,1	17,4	<1
Torsk	7,33	21,4	19,7	10,5
	7,20	22,1	25,0	
	7,19	19,0	23,1	8,0
	7,09	19,6	25,6	9,1
	7,06	20,8	21,2	10,5
	7,00	19,3	23,3	
	6,84	19,8	19,3	7,6

Nydrept torsk som enda ikke er kommet i rigor, viser etter dette, riktig nok lille materiale, en gjennomsnittsverdi for S av 22,4 og en R verdi av 9,1. Variasjonene fra fisk til fisk er ganske store. Seien viser meget lave verdier for R, men den er da også omtrent optimalt dødsstiv.

Spesifikk syrebindingsevne av pressafter.

Pressafter kan betraktes som det vannekstrakt som framkommer når farsetørrestoffet oppslemmes i den vannmengde som farsen inneholder. Pressafteren inneholder ganske meget tørrestoff, for torsk har vi funnet mellom 8—9 g/100 ml og for sei ca. 12,5 g/100 ml. Dette tørrestoff inneholder da relativt mer vannoppløslig eggehvite enn vannekstraktene gjør. (NOTEVARP, HJORTH-HANSEN og KARLSEN, 1942). Da den vannoppløslige eggehvite har en lavere syrebindingsevne enn de vannoppløslige ikke-eggehvitestoffene, skulde man derfor vente en litt lavere syrebindingsevne for pressafttørrestoffet enn for vannekstrakt-tørrestoffet framstillet av 250 g farse/1000 ml.

Dette fremgår ved sammenligning av tabellene 10 og 11. Samme torsk blev lagret et døgn ved 22° C.

Tabell 10. *Spesifikk syrebindingsevne av pressafter.*

Fiskesort	pH	Tørstoff g/100 ml	Spesifikk syrebindingsevne	
			S	R
Nylig drept småtorsk	6,78	8,3	29,2	13,6
—»—	6,80	8,2	29,4	
—»—	7,01	8,4	29,3	16,3
Samme torsk 24 timer ved 22° C	7,80	8,6	25,1	32,8

S-verdien sank noe ved denne lagring, mens R-verdien økte til det dobbelte og samtidig var der en kraftig utvikling av bakterier.

Spesifikk syrebindingsevne av vannekstrakter.

Vannekstraktene ble framstillet av 250 g farse/1000 ml. Den spesifikke syrebindingsevne S ligger noe høyere enn pressafterenes. R synes å avta med syretrinnet.

Tabell 11. *Spesifikk syrebindingsevne av vann-ekstrakter (250 g farse/1000 ml).*

Fiskesort	pH	Spesifikk syrebindingsevne	
		S	R
Torsk	7,37	31,5	29,4
	7,28		20,4
	7,11	30,2	23,5
	7,01		17,4
	7,00		18,8
	6,90		17,4
	6,85		13,1
	6,64		10,5

Spesifikk syrebindingsevne av den uoppløselige fraksjon.

Kjeldahlanalyser viser at den uoppløselige fraksjon scm blir tilbake etter utvasking, dialyse og avsluttende utvasking med destillert vann av farsen hovedsakelig inneholder proteinstoffer. Disse er en blanding av globulin X og myosin og sannsynligvis i delvis denaturert tilstand. Med eggehvitestoffers høye molekylarvekter er det rimelig at fraksjonens syrebindingsevne er lav. Dette framgår da også av tabell 12.

Tabell 12. *Spesifikk syrebindingsevne av den uoppløselige fraksjon.*

Fiskesort	Spesifikk syrebindings- evne S
Torsk	9,9
	10,2
	10,6
	10,8
Lyr	10,8

Spesifikk syrebindingsevne av sera.

Som det framgikk av tabell 4 er det likegyldig hvilken farsekonsentrasjon som benyttes når syrebindingsevnen av sera skal bestemmes. Den totale syrebindingsevne av dem er jo proporsjonal med

tørrestoffkonsentrasjonen i serumet og da blir den spesifikke syrebindingsevne den samme enten man veier inn 100 g eller 500 g farse ved framstillingen.

Tabell 13. *Spesifikk syrebindingsevne av sera*

Fiskesort	Spesifikk syrebindings- evne S
Torsk, nettopp drept	60,0
	60,3
	61,3
	63,9
	64,8
Lagret ved 0° C i 20 døgn	34,8
Sei, nettopp drept	50,0
	50,8
Pigghå, helt fersk	86,0
Vårsild, helt fersk	44,0
	45,3
	45,9
	46,0

Sera antar som før nevnt en pH-verdi lavere enn farsens, da jernhydroksydet inneholder litt saltsyre. R-verdien må derfor bestemmes på den måte at man først måler farsens pH og deretter titrerer serumet mellom $\text{pH} = 6$ og den pH som farsen har. Kveiteserumet viser en meget større syrebindingsevne enn torskens, hvilket er i god overensstemmelse med den langsomme pH-forandring som finner sted i kveitekjøttet under lagring (se tabell 8). Den spesifikke syrebindingsevne hos forskjellige fiskesorter i nydrept tilstand vil antakelig kunne gi et godt bilde av hvilken holdbarhet en kan vente seg av dem. Den bedervete fisk viser en langt lavere verdi enn den ferske. Som man vil forstå er denne tilbakegang av S, respektiv økning av R, mer og mer pregnant i retningen farse—pressaft—vannekstrakt—serum, hvilket skulde medføre visse fordeler i analytisk henseende. Ved analyse av sera i stedet for farse, vilde man derfor få så meget tydeligere utslag for syrebindingsevnen (og selvsagt også ved bestemmelser av ammoniak, trimetylamin, trimetylaminoksyd og andre stoffer som er oppløselige proporsjonalt med farsekonsentrasjonen). Vi vil i et seinere arbeid komme tilbake til statistiske undersøkelser over forskjellige stoffer som forekommer i fiskemuskulaturen og da også til dennes syrebindingsevne.

Den spesifikke syrebindingsevne av dialysater.

Man kan atskille de oppløselige eggehvitestoffer og ekstraktstoffene i et vannekstrakt ved å dialysere dette i en kolloidium- eller en Schleicher og Schüllhylse nr. 579 mot destillert vann. Mens de oppløselige eggehvitestoffer forblir i hylsen, går alle de lavmolekylære ekstraktstoffer over i vannet. Den oppløsning man da får, burde vise en spesifikk syrebindingsevne av omtrent samme størrelse som den serumet av samme farse har.

Tabell 14. *Spesifikk syrebindingsevne av dialysater.*

Fiskesort	Spesifikk syrebindingsevne S
Torsk, nettopp drept	63,8
	64,2
	67,5

Det framgår av tabellen at den spesifikke syrebindingsevne av dialysater er temmelig lik serenes. Da et serum imidlertid kan framstilles på en brøkdel av den tid dialysen tar, vil anvendelsen av dialysater ikke få noen praktisk betydning ved undersøkelser over holdbarheten av råfisk.

TILLEGG.

Torskerogn og dens aciditetsforhold.

En torskerogn på et noe sent utviklingsstadium ble tatt ut av en nettopp slaktet torsk. Rognkornene og plasmaet ble skrapet ut av sekken og blandet godt før innveiningene. Rognkornene ble ikke knust mer enn hva der skjedde under utskrapningen.

Tabell 15. *Torskerogn, såvidt begynt å bli gjennomsliktig.*

	Farse g/100 g	Vann- ekstrakt g/100 g	Uopløselig fraksjon g/100 g
Tørrstoff	29,85	3,8	26,05
Aske	2,36		
Total P	0,44		
Spesifikk syrebindingsevne S	12,5	25,6	10,8
Spesifikk syrebindingsevne beregnet ..	12,7		
pH	6,19	6,22	

Innholdet i rognsekken (i et hvert fall på det nevnte utviklingsstadium) har en meget lavere syrebindingsevne enn fiskemuskulaturen, mens syrebindingsevnen for den uopløselige fraksjon er lik i begge tilfeller.

Torskerogn og dens oppløselighet ved forskjellige pH.

Ved tilsetning av saltsyre til like store porsjoner av rogn ble rognen meddelt forskjellige syretrinn mellom pH = 6,2—3,8. Der ble arbeidet ved konstant volum. Etter 2 timers rystning ble oppslemningen filtrert og tørrstoff og pH bestemt i filtratet.

Tabell 16.

Torskerogns oppløselighet ved forskjellige pH.

pH	Tørrstoff pr. 100 g rogn	
	Oppløselig	Uopløselig
6,19	3,80	26,05
5,66	4,32	25,53
5,19	4,96	24,89
4,84	6,00	23,85
4,54	8,84	21,01
4,13	19,00	10,85
3,80	22,10	7,75

Ca. 13 % av stoffene i torskerognen var altså oppløselige i vann. Når syretrippet avtar, stiger oppløseligheten av tørrstoffet og den stiger særlig sterkt mellom pH 4,54 og 4,13.

Syrebindingsevnen av serum av silderoegn og sildemelke.

Syrebindingsevnen av rogn- og melkeserum fra vårsild avviker meget fra hinannen som det fremgår av tabell 17.

Tabell 17.

Spesifikk syrebindingsevne av rogn- og melkeserum.

Organ	Spesifikk syrebindingsevne
	S
Rogn	24,2
	24,6
	26,7
Melke	56,3
	57,8
	59,5

SAMMENFATNING.

Der er gitt en oversikt over fiskemuskulaturens acidimetri særlig i tilslutning til et arbeid av STANSBY og LEMON som går ut på å skape en metode av fysikalsk-kjemisk art for objektiv bedømmelse av friskhetstilstanden hos fisk. Da metoden kan utføres på relativt kort tid, har den fått ikke så liten anvendelse, men det framgår av litteraturen at andre forskere ikke har vært i stand til å oppnå kurver av samme forløp som STANSBY og LEMON. Det har vært nevnt forskjellige årsaker hertil, men der foreligger ingen målinger som har kunnet belyse årsakene til uoverensstemmelsene.

STANSBY og LEMON tar bare hensyn til fiskemuskulaturens innhold av eggehvite, som de anser som de puffergivende stoffer uaktet den også inneholder flere andre sterkt puffrende stoffer og deres analysegang tilsteder vanskelig en absolutt ens behandling av prøvene.

På grunnlag av kjennskapet til de viktigste av muskulaturens kjemiske enkeltkomponenters syrebindingsevne har vi utarbeidet en metode som skulde være bedre fundert og riktigere i analytisk-teknisk henseende enn den nevnte metode.

Der defineres først noen størrelser:

1. Den *spesifikke* syrebindingsevne er det antall mg HCl som bindes av 1 g *tørstoff* av farse, pressaft, vannekstrakt, serum, dialysat eller kjemisk enkeltkomponent innen et visst område på pH-skalaen. Størrelsen kalles S hvis området er fra $\text{pH} = 6-4,3$ og R hvis området ligger mellom prøvens aktuelle pH og $\text{pH} = 6$. Vi bibeholder derved samme områder som STANSBY og LEMON.

2. Den *partielle* syrebindingsevne er produktet av en kjemisk enkeltkomponents spesifikke syrebindingsevne og dens tørstoffmengde i 100 g muskulatur, 100 ml pressaft osv.

3. Den *totale* syrebindingsevne er det antall mg HCl som bindes av samtlige komponenter i 100 g muskulatur osv. og betegnes T_S og T_R . T_S og T_R utgjør altså summen av de partielle syrebindingsevner og er også lik den spesifikke syrebindingsevne av muskulaturen multiplisert med tørstoffinnholdet i 100 g farse, pressaft osv.

Mens STANSBY og LEMON utfører sin metode i en oppslemning av farse, har vi med disse definisjoner gjort den utvidelse at undersøkelsen også kan foretas for eksempel i vannekstrakter eller helst i sera hvilket vi finner meget bekvemmere.

Der ble funnet følgende resultater:

1. pH av en oppslemning av fiskemusculatur avhenger av blandingsforholdet mellom farse og vann under anvendelse av konstant volum.

Når fortynningsgraden $\frac{(g \text{ farse} + g \text{ vann})}{g \text{ farse}}$ stiger, stiger også pH og relativt mer over en viss fortynningsgrad, ca. 10.

2. Titreringskurver (korrigerede) for fisk lagret i forskjellig tid antar forskjellig forløp, hvilket gjør dem anvendelige for karakterisering av fisks friskhetsgrad.

3. Da vannekstraktenes innhold av eggehvitestoffer ved nydrept fisk er relativt høyere jo mindre fortynnet ekstraktene er, og eggehvitens spesifikke syrebindingsevne er lavere enn ikke-proteinstoffenes, avtar vannekstraktenes syrebindingsevne når fortynningsgraden avtar.

4. Serumstoffenes og dialysatens spesifikke syrebindingsevne er identiske og uavhengig av fortynningsgraden.

5. Spredte analyser ga som resultater: Frisk småtorsk, S_{farse} mellom 19,3—25,6, R_{farse} mellom 7,6—10,5, frisk sei, S_{farse} mellom 17,4—22,4, R_{farse} mellom 1—4,5. Frisk småtorsk, S_{pressaft} ca. 29, $S_{\text{vannekstrakt}}$ mellom 29—39. Sei viser noe lavere verdier. Frisk småtorsk S_{serum} mellom 60—65 og S_{dialysat} mellom 63—67. Frisk sei S_{serum} ca. 50, pigghå S_{serum} ca. 86 og sild S_{serum} 44,0—46,0. Den uopløselige fraksjon i muskulaturen viser for småtorsk og lyr $S = \text{ca. } 10,4$. Torskerogn viste $S = 12,5$. Dens oppløselighet stiger sterkt når vannstoffjonekonsentrasjonen tiltar. Det er stor forskjell mellom de spesifikke syrebindingsevner av sera fra silderogn og sildemelke.

Jeg takker herved styrer OLAV NOTEVARP for hans interesse under utførelsen av arbeidet og for gjennomsynet av manuskriptet samt ing. KAARE BAKKEN for velvillig hjelp.

SUMMARY AND CONCLUSION.

STANSBY and LEMON (1933) devised a method for measurement of the buffering capacity of aqueous suspensions of minced haddock musculature. They assume that the bacterial production of compounds of low molecular weight, e. g. amines and ammonia, is preceded by the autolytic splitting of the protein molecule under production of peptones and simpler polypeptides. They pay no attention to the non proteinic compounds, most of which are nitrogenous bases and liable to bacterial decomposition, and attach too high an importance to what they call the »primary, autolytic« changes of the proteins. The splitting of proteins would cause increasing buffering capacity, although the authors, basing their opinion on analytical findings, state the contrary. The cause of the decrease must be sought elsewhere.

Immediately after death the fish muscle undergoes at least three processes, phosphagenolysis, glycogenolysis and the splitting of adenosinpyrophosphate. When these processes are complete, the musculature is in the state of rigor mortis. The passing-off of rigor is an autolysis in the physical sense of the word. This lysis is followed by the lysis we most often call the autolysis, viz. the slow lysis of the proteins by the enzymes contained in the cells of the musculature. By the physical autolysis the proteolytic enzymes are set free and activated in the denaturated muscle. Therefore, the splitting of the protein molecule is a relatively late occurring process during the storage of fish.

The fish musculature, beside the proteins, also contains many differing non protein nitrogenous compounds, some of them occurring in not negligible quantities. We mention for example trimethylamine oxide, anserine, carnosin and creatine. All of these compounds are broken down by bacteria and the final products formed are quantitatively far superior to similar products formed by the proteolytic enzymes.

By facultative anaerobic species of *Achromobacter* trimethylamine oxide is broken down to trimethylamine, a weak base with ionisation exponent $pK = 3,6$. It has its optimum buffering capacity at $pH = 10,4$,

far above the optimum of trimethylamine oxide which is at $\text{pH} = 4,7$. The decrease in buffering capacity of the musculature of the stored fish must be principally due to the bacterial breakdown of trimethylamine oxide, but may also, even in a smaller way, be induced by other bacterial processes.

In this paper we have devised a method founded on the above-mentioned base and have generalised it to be used not only for minced muscle, but also for pressjuice, water extract and sera. We define:

1. The *specific* acid-binding capacity is the number of milligrams of hydrochloric acid (HCl) with which *one* gram of the dry matter of minced muscle, pressjuice, water extract, serum or an individual chemical component of the musculature combine within the ranges $\text{pH} = 6-4,3$ (S) and from the actual pH of the muscle to $\text{pH} = 6$ (R).

2. The *partial* acid-binding capacity is the product of the concentration (grams/100 g) of one individual component and its specific acid-binding capacity.

3. The *total* acid-binding capacity is the number of milligrams of hydrochloric acid (HCl) with which 100 grams of muscle or 100 milliliters of pressjuice, waterextract or serum combine within the specified ranges (T_S and T_R). The total acid-binding capacity is the sum of the partial acid-binding capacities and it is also the product of the concentration of dry matter and the specific acid-binding capacity of the muscle, pressjuice &c.

The following results were found:

1. The pH -value of the suspension of fish muscle depends on the relation between the quantity of muscle and water. When the dilution index $\frac{(\text{grams muscle} + \text{grams water})}{\text{grams muscle}}$ increases, the pH -value increases

also and relatively more above a diluting index > 10 .

2. Corrigated titrating curves of stored fish have courses dependent on the storage time. This qualifies them for characterisation of the freshness of fish.

3. On account of the relatively higher solubility of the protein fraction of the water extracts with increasing ionic strenghts, and the lower specific acid-binding capacity of the protein fraction, the acid-binding capacity of the extracts decreases at same time as the index of dilution.

4. Serum and dialyzate (containing the non proteinic water soluble compounds of the muscle tissue) have both the same specific acid-binding capacity which is independent of the index of dilution.

5. A few analysis of minced fresh fish showed the following numbers: Small cod, S = 19,3—25,6 and R = 7,6—10,5. Coalfish, S = 17,4—22,4 and R = 1—4,5. Pressjuice: Small cod, S = 29. Water extracts (index of dilution = 4) Small cod, S = 29—39. Sera and dialyzate: Small cod, S = 60—67, coalfish, S = 50, pickled dogfish, S = 86 and herring, S = 44,0—46,0. The insoluble fraction of the muscle tissue: Small cod, S = 10,4. Fresh cod roe has a low specific acid-binding capacity, viz. S = 12,5. Its solubility increases rapidly with the hydrogen ion concentration. Sera: herring roe ♀, 24,2—26,7 and ♂, 56,3—59,5.

LITTERATUR

- ACKERMANN og HOPPE-SEYLER, 1931: Z. Physiol. Chem. 197, 135.
- BATE SMITH, 1937: Proc. Roy. Soc. London. Ser. B. 136.
- 1937: Rep. Food Invest. Board 1936, 21.
- 1938: Sammesteds 1937. 15.
- BEATTY og GIBBONS: 1937: J. Biol. Board Canada III, 77.
- BENSON, 1928: J. Biol. Chem. 78, 583.
- BOURY og SCHWINTE, 1935: Rev. Trav. Office Pêches Mar. 9, 401.
- CUTTING, 1938: Rep. Food Invest. Board 1937, 78.
- DEUTSCH og EGGLETON, 1938: Biochem. J. 32, 209.
- DØVLE, 1938: Meld. Norges Landbr. h. skole 18, 199.
- FENN, 1935: Protoplasma. 24. 337.
- FUHRMANN, 1941: Elektrometrische pH-Messung mit kleinen Lösungsmengen. Springer, Wien.
- FURUSAWA og KERRIDGE, 1926—27: J. Marine Biol. Assoc. Unit. Kingdom XIV N. S.
- HARRIS, 1923: Proc. Roy. Soc. London B. 95, 440.
- HINTERSATZ, 1931: Berl. Thierärztl. Wochenschr. 590.
- HIRSCH, 1924: Biochem. Z. 147, 433.
- HUNTER, 1928: Creatine and Creatinine. London.
- JØRGENSEN, 1935: Wasserstoffionenkoncentration (pH). Steinkopff, Dresden og Leipzig.
- MACLEOD og SIMPSON, 1927: Contr. Canad. Biol. Fish. 3, 437.
- MACPHERSON, 1932: Biochem. J. 26, 80.
- NICKERSON og PROCTOR, 1935: J. Bact. 30, 383.
- NOTEVARP og HJORTH-HANSEN, 1933: Årsberetn. vedk. Norges Fiskerier 1932.
- NOTEVARP, HJORTH-HANSEN og KARLSEN, 1942: Fiskeridir. Skrifter. Serie Unders. ved St. F. f. stasjon. Vol. I. no. 3.
- 1943: Tidskr. f. Kjemi, Bergv. og Metall. 3. 2.
- POLOEKTOFF, 1933: Z. Fleisch- und Milchhyg. 43, 121.
- REED, RICE og SINCLAIR, 1929: Contr. Canad. Biol. Fish. N. S. 7, 147.
- SHARP, 1935: Biochem. J. 29, 850.
- STANSBY og LEMON, 1933: Ind. and Eng. Chem. (Anal. Ed.) 5, 208.
- SUWA, 1909: Pflügers Arch. Ges. Physiol. 128, 421.
- 1909: Sammesteds. 129, 231.
- VAN DEURS og HOFF-JØRGENSEN, 1936: Ingeniøren 45, Avd. Kemoteknik. III, 1.
- VAN SLYKE, 1922: J. Biol. Chem. 42, 525.
- YAMAMURA, 1933: Bull. Jap. Soc. Sc. Fish. 2, 118.