

FISKERIDIREKTORATETS SKRIFTER

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

Reports from the Norwegian Fisheries Research Laboratory
Vol. I, No. 3

Published by the Director of Fisheries

Studier over den døde fiskemuskulatur
og dens forandringer under lagring

I. Kjemiske og bakteriologiske undersøkelser

*Studies of the post mortem fishmuscle
and its alterations during storage*

Av

Olav Notevarp,
Sverre Hjorth-Hansen og Olaf Karlsen

(Fra Avdeling for Mikrobiologi)

1 9 4 2

A.s John Griegs Boktrykkeri, Bergen

INNHALDSFORTEGNELSE

	Side
Innledning	5
Tidligere undersøkelser	8
Fiskemuskulaturens kjemiske sammensetning	29
a. Konvensjonelle analyser	29
b. Biokjemiske analyser	29
c. Fiskemuskelens oppløselighetsforhold	33
Forandringer i den døde muskulatur	35
Mikroorganismer	38
Egne undersøkelser	47
Prøvetaking for kjemiske og biokjemiske metoder	48
Prøvetaking for bakteriologiske undersøkelser	50
Metodikk for lagringsforsøk	53
Analysemetoder	55
Prøliminære undersøkelser	62
Bakteriologiske analyser	75
Lagringsforsøk	76
Sammenfatning av resultatene fra lagringsforsøkene	80
Resymé	83
Summary and conclusion	86
Litteratur	89

INNLEDNING.

Når fiskekjøtt lagres, taper det etterhånden sin behagelige smak og forandres i kvalitet så det mindre og mindre egner seg for kokning. Muskelfibrene løsner fra hinannen og deres evne til å »krølle« seg går tapt. Samtidig begynner fisken å lukte »fisk« i stedet for »sjø« og snart dekkes overflaten av et bakterieslim, som varsler om begynnende bedervelse. Alt dette er lett å iaktta når fisken ligger ved vanlig temperatur, for da inntreffer fenomenene i løpet av et par dager. Annerledes stiller det seg når fisken oppbevares i is eller på kjølelager, for da går disse forandringene langt seinere for seg og er ikke så liketil å vurdere ved hjelp av lukt og smak og syn, altså ved *organoleptiske* metoder. Det er mange faktorer som avgjør følsomheten av disse, etter sin natur subjektive metoder. Bortsett fra smak og behag, har de forskjellige individer forskjellig skarpt utviklet smak og lukt. Som vi seinere kommer inn på, er trimetylamin en av de viktigste årsaker til den såkalte fiskelukt som kommer når fisken får ligge noen tid. Nærvær av denne gass virker frastøtende på mange, selv når den forekommer i små mengder, andre gouterer mer av den. Sannsynligvis vil de fleste innta et mellomstandpunkt, og nettopp derfor er et høyt innhold av trimetylamin en begrensende faktor for salgbarheten og også anvendeligheten av fisken.

Organoleptiske kjennetegn.

De forskjellige kjennetegn av organoleptisk art som gjelder for forsk, framleis brukbar og bedervet fisk kan resymeres som vist i tabellen side 6.

Slike kjennetegn gjelder dog ikke generelt for alle fiskearter. Visse faktorer kan modifisere dem, såsom fiskemetoden, transporten osv.

Der lukter svakt ammoniakk av skater og håbrand med det samme de blir trukket opp av vannet. Gjellene på makrellen og silda er mørkebrune. Fisk som ligger i en haug på dekket antar en kraftig avfarging i berøringsflatene mellom de forskjellige fisk. Fargen kommer dog tilbake

Fersk fisk (nytrukken resp. nyslaktet)	Brukbar fisk	Bedervet fisk
Svak »sjøluft«.	Svak »fiskeluft«.	Råtten lukt, særlig av gjellene.
Fast, resp. stiv i muskulaturen.	Fast, resp. bøyelig i muskulaturen.	Bløt i muskulaturen, trykk etter hård gjenstand blir stående.
Intens farge.	Frisk—halvmatt i fargen.	Matt, »grå« i fargen.
Overflaten blank.		Overflaten matt.
Øyet klart, sort, hornhinnen gjennomskinende.		Øyet uklart, grått, hornhinnen melket.
Gjellene frisk røde, uten belegg.	Gjellene litt lysere, gjerne litt belegg.	Gjellene grårøde-grågule, slimet.
Bukskinnet seigt.		Bukskinnet skjørt.
Anus lukket.	Anus lukket.	Anus åpen.
Slimet jevnt fordelt på skinnet, gjennomsiktig.		Slimet har klumpet seg, er blitt uklart og derved tydelig synlig.
Skjellene stive.		Skjellene myke.
Søtlig, nøytral smak (i kokt tilstand).	Nøytral-svak »fiskesmak«	Kvalm smak og lukt av ammoniakk og trimetylamin.

når det avfargete parti får ligge fritt. På grunn av trykk under transport blir fisken ofte mer eller mindre deformert. Smaken av frisk håbrand er tydelig syrlig (under rigor antar håbrandkjøttet en pH av ca. 5,7, mens torsk og hyse bare når ned i 6,3).

Objektive friskhetsbestemmelser.

Organoleptisk bedømmelse av fiskens ferskhet er såvidt usikker at den ikke kan lites på i alle tilfeller hvor det gjelder å fastsette når fisken ikke lenger er brukbar til et eller annet øyemed og enda mindre hvor lenge den kan antas å ville holde seg. Det er derfor meget ønskelig å ha en objektiv metode av fysikalsk, kjemisk, fysikalsk-kjemisk eller

bakteriologisk art, som uavhengig av organoleptiske prøver, sikkert karakteriserer fiskens ferskhetstilstand til en hver tid.

Meget har vært gjort i de seinere år i nær sagt alle land for å finne en eller flere sådanne metoder, uten at saken framleis kan sies å være helt tilfredsstillende løst. Foruten å gi et pålitelig uttrykk for fiskens tilstand, som naturligvis er det viktigste ved metodene, må de også hvor det gjelder en hurtig avgjørelse, være relativt raske og enkle å utføre. Bakteriologiske metoder vil derfor som regel ikke være brukbare, da de krever minst et par døgn under utførelsen. Fysikalske metoder er lite utforsket, men fører vel vanskelig fram. Det blir derfor kjemiske eller fysikalsk-kjemiske metoder man må ty til i første rekke.

Nærværende undersøkelser er tatt opp for å undersøke de viktigste av de mange metoder som er foreslått for bestemmelse av friskheten av fisk, for om mulig å få klarlagt hvilke som må ansees brukbare eller særlig velegnet under våre forhold, eventuelt finne fram til forbedringer eller nye metoder for friskhetsbestemmelsen. For å få et grunnlag for vurderingen av de metoder som kan komme på tale er det imidlertid nødvendig å ha best mulig kjennskap til fiskemuskulaturens sammensetning og de kjemiske og fysikalske forandringer som foregår i denne.

Vi behandler derfor i det følgende først de viktigere tidligere undersøkelser på området, og derpå fiskemuskulaturens sammensetning og de forandringer som foregår i muskulaturen når den er død. Videre er gitt en oversikt over bakteriefloraen hos fisk i det miljø den er i berøring med. Våre egne undersøkelser og resultater er så omhandlet i arbeidets siste del.

Sistnevnte angår fortrinsvis kjemiske eller fysikalsk-kjemiske metoder for friskhetsbestemmelsen. For en best mulig fastleggelse av friskhetsgraden er der imidlertid også bestemt bakterietall for en betydelig del av prøvene.

For å kunne fremskaffe prøver med forskjellige, men på forhånd bestemte friskhetsgrader er der anvendt nyslaktet fisk som så er lagret under bestemte forhold, vanlig ved 0° C.

Det er nemlig ingen vesensforskjell på de prosesser som foregår i fiskekjøttet enten det lagres ved vanlig temperatur eller ved 0° C. Prosessene er underkastet loven om reaksjonshastighet og foregår 3—4 ganger så raskt ved 10° C som ved 0° C. Prosessene er av enzymatisk natur, hvor enzymene dels skriver seg fra muskulaturen selv, dels fra bakterier som utvikler seg på og i denne. Vi kommer nærmere inn på disse forhold i det følgende.

TIDLIGERE UNDERSØKELSER.

Ikke alle litteraturhenvisninger er tatt med her, da en del er nevnt under de forskjellige avsnitt seinere i arbeidet.

A. FISKENS KVELSTOFFHOLDIGE BESTANDDELER.

1. *Trimetylaminoxyd.*

SUWA (1909) fant trimetylaminoxyd i haimuskulatur og viste at bakterier spalter det til trimetylamin.

POLLER og LINNEWELH (1926) kunde bekrefte SUWAS påvisning av at trimetylaminoxyd spaltes til trimetylamin av bakterier fra sjøfisk.

COOK (1931) fant 0,2—0,5 g/100 g trimetylaminoxyd i saltvannsfisk.

BEATTY (1937) undersøker en rekke fisk fra sjøvann og ferskvann på trimetylaminoxyd og finner særlig høye tall for haier, skater, lysing og torsk, men intet i ferskvannsfisk.

BEATTY (1939) bestemmer trimetylaminoxyd i forskjellige fisk ved hjelp av LINTZELS metode (1934). All sjøfisk inneholder oksydet. All ferskvannsfisk er fri for det. Vandrefisk taper det eller syntetiserer det alt etter oppholdssted. Stoffets fysiologiske betydning er framleis ukjent.

2. *Andre N-holdige stoffer.*

CAMPBELL (1934) undersøkte torsk, hyse, laks, sild, skate og hummer med hensyn på *ikke-protein-N* i muskelen. Torsk og hyse var kjemisk meget like, og alle de 4 første inneholdt ikke-protein-N tilnærmet likt, mens skaten inneholder 3½ gang så meget. Hummeren inneholdt 1½ gang så meget. Torsken utmerker seg ved å være rik på lysin og fattig på histidin-arginin. Skatens store innhold skyldes urinstoff og flyktige baser, laksens histidin-arginin samt monoaminsyrer. Av hans materiale hitsettes:

mg. N i 100 gr fersk muskel.

N som	Torsk	Hyse	Laks	Sild	Skate	Hummer
Total ikke-protein ..	400,0	417,0	466,0	425,0	1423,0	682,0
Total flyktige base						
÷ NH ₃	2,8	7,6	0,6	4,7	152,1	0,6
NH ₃	9,5		11,9	9,3	35,4	19,9
CO (NH) ₂	2,3	2,0	1,3	1,7	(800,0)	0,07
Aminosyrer	34,2	28,3	39,1	45,4	52,9	211,0
Kreatin + Kreatinin	169,0	205,0	193,0	185,0	107,6	
Imidazol	spor	spor	2,4	28,1	—	4,7

Da CAMPBELL ikke har utført tørrstoffanalyser, kan vi ikke så lett sammenlikne disse tall. Antar vi dog at tørrstoffet i muskelen svinger mellom 17 og 23 g/100 g for de 4 første, må vi kanskje regne med en svingning av $\pm 15\%$ for disse tall for de enkelte fisk.

Hummerens lave urinstoffinnhold og høye aminosyreinnhold er verd å legge merke til. CAMPBELL finner videre:

mg N i 100 g fersk muskel.

N som	Torsk	Sild	Hummer
Total ikke-protein	419,2	437,0	682,2
Total flykt. base \div NH ₃	2,1		0,6
NH ₃	7,7	16,1	19,9
CO (NH ₂) ₂	1,9	4,0	0,07
Aminosyrer	39,2	48,8	211,0
Kreatin og Kreatinin	163,0	182,7	4,7
Imidazol-gruppen	spor	19,1	—
N-holdige baser	257,6	269,9	382,6
Purinbaser	24,5	8,2	10,7
Histidin-arginin fraksjon	32,7	72,7	191,0
Lysin fraksjon	157,9	145,6	150,6
Monoaminosyre fraksjon	95,7	97,9	221,5
Humin N 1	65,9	69,2	78,1
Total humin N	108,4	112,6	108,4

CAMPBELL (1934) fant at sild, laks, torsk og hyse inneholder glyksalinderivater i forholdet 30 : 4 : 1 : 1. Antar at dette er årsaken til den store mage-saftsekresjon ved nyting av sildepressaft.

LACHNO (1935). Forskjellige vertebrater som karper, torsk, gjedde, abbor osv., inneholder alle omtrent samme mengde av kreatinfosforsyre, fri kreatin og total N. Total N er gjennomsnittlig 2,79 % og herav er 5,77 % kreatin-N.

B. SLIMETS SAMMENSETNING.

CAMPBELL (1930) undersøkte sammensetningen av koljens slimlag som lett lot seg fjerne ved avskrapning særlig når den nyslaktete fisk fikk ligge 2—4 timer i ferskvann. Slimet inneholdt mycoprotein, sannsynligvis et fosforprotein og lipoider.

STEWART (1932) opplyser at dr. INGVALDSEN i Prince Rupert har analysert hyseslimet og funnet at 3 ml inneholder 33,3 mg N hvorav 11,9 % er aminosyre-N. Det inneholder dessuten litt kullhydrater og danner sammen med sjøvannets salter et utmerket medium for bakterievekst.

C. FISKEMUSKULATURENS PRÆ-AUTOLYSE.

LEIM, McLEOD og SIMPSON (1927) finner at rigor setter tidlig inn ved trålet fisk, og når sitt maksimum allerede etter 4 timer, mens tilstanden hos håndlinefanget fisk først setter inn senere og trenger ca. 6—12 timer for å nå sitt maksimum.

McLEOD og SIMPSON (1927) analyserte forskjellige fisk tatt på håndline på glykogen og fant fra 0,01—0,387 g/100 g. Trålet fisk inneholdt bare spor av glykogen.

Glykogen forsvinner med jevn hastighet fra sløyet fisk ved værelsestemperatur. Etter 6 timer er bare 20 % tilbake. Prosessen går meget raskere når fisken er i live og utfører kraftige muskelbevegelser.

Fri fosfor (fosfater beregnet som P) er 0,122 g/100 g i hyse tatt på håndline, og øker til 0,160 g/100 g i løpet av 24 timer. Til sammenlikning kan angis at SMITH (1932) i levende kaninmuskel finner 0,02 g/100 g men under rigor 0,2 g/100 g.

HUNTER (1928) påviste at muskelens kreatininnhold er bundet til fosforsyre som forbindelsen fosfagen. Når døden inntreffer spaltes fosfagenet i komponentene.

HUNTER (1929) finner at fiskemuskler inneholder mer kreatin enn husdyrmuskler. Hvite muskler inneholder mer enn røde og det er mer i muskler av eldre dyr enn av unge.

Ifølge BALDWIN ble der i 1929 funnet at kreatinfosforsyren bare forekommer hos vertebrater. Hos invertebrater inntar arginin kreatins plass i et analogt fosfagen.

MACPHERSON (1931) fant fra 0,03—0,614 g/100 g melkesyre i hyse.

SHARP (1932) påviste at alt fosfagen i hysemuskler er spaltet etter 24 timers lagring i is.

SHARP (1932, 1933—34) viser at glykogen spaltes og melkesyre lagres under glykogenolysen i muskelen og at melkesyremengden er variabel.

PARNAS (1932) mener at den primære årsak til rigor mortis, dødsstivheten, er å søke i spaltningen av fosfagen, ikke i glykogenspaltningen som må oppfattes som en samtidig løpende prosess.

SCHLIE (1934) viser at jo lenger fisken forblir dødsstiv, desto lenger holder den seg frisk. På grunn av fangstmåtene inntreffer dødsstivheten forskjellig hurtig hos forskjellige fiskesorter. Den inntreffer hos makrell allerede etter noen minutter, hos sild etter 2 timer, hos torsk etter 5 timer og hos flyndre etter 10 timer etter fangsten.

D. MUSKULATURENS OPPLØSELIGHETSFORHOLD.

LOGAN (1930) framstillet oppløselige proteinstoffer fra hysemuskler ved hjelp av vann, NaCl-oppløsninger og fosfatoppløsninger av pH=7,1. Underøkelsene syntes å vise at der eksisterer et vannoppløselig protein og et saltoppløselig som begge koagulerte raskt ved 70° C, det første ved pH = 6 og det annet ved pH = 5. De kan skilles ad på denne måte. Ved lav temperatur gikk koagulasjonen langsomt.

SCHMIDT-NIELSEN (1903) viste at fiskemuskler fra nettopp slaktet fisk er istand til å avgi rikelige mengder pressaft.

SCHMIDT-NIELSEN og STENE (1931) fant at nettopp slaktet torsk kunde avgi 2—20 g pressaft pr. 100 g fisk. Helt levende muskel avga ca. 2 g/100 g, mengden økte (5—10° C) i løpet av få timer, avtok og nådde en minimumsverdi

etter 1—2 døgn og økte så igjen til ca. 20 g/100 g. Helt bedrevet fisk avgir mindre igjen.

SCHMIDT-NIELSEN og STENE (1933) undersøkte flyndre og fant samme resultat som tidligere (1931) for torsk. Individuell forskjell utelukket anvendelsen av bestemmelse av pressaft for karakterisering av fiskens lagringstilstand.

E. FISKENS AUTOCHTONE BAKTERIEFLORA.

ANDERSON (1907) fant at frisk fisk som regel har steril muskulatur.

VAN DRIEST (1913) fant at muskulaturen hos torsk og hyse ikke var sterile selv når de blir undersøkt straks etter slaktningen.

LUMLEY, PIQUE og REAY (1929) fant 100—2000 bakterier pr. teskjefull slim hos hyse. Muskelen var steril. Skinnen hadde ca. 30—250 bakterier pr. cm². Fordøyelseskanalen inneholder et bakterieantall som avhenger av mengden av enno ufordøyet føde.

GIBBONS og REED (1930) hadde visse vanskeligheter med å oppnå sterile prøver av fiskemuskulaturen.

PROCTOR og NICKERSON (1935) undersøkte 120 sterilt utskårne muskelstykker fra 6 hyser. Der ble anlagt 336 faste og like mange flytende kulturer. Der kom noen bakterier bare på 6 av disse kulturer, men også på 2 av 126 kontrollr. De 6 kulturer som viste vekst var alle fortyninger. Forsøket ble gjentatt med 38 prøver fra 8 hyser. 34 prøver var sterile. Blod fra hjertet av lysing var sterilt ifølge aerobe og anaerobe kulturer.

De sluttet at fiskemuskelene in vivo er steril.

HARRISON (1917—1918) isolerte en og samme organisme fra 8 av 12 hyser. Den er nær beslektet med *Bacterium Vulgaris* (Proteus).

OBST (1919) undersøkte bakteriefloraen i sardinens fordøyelseskanal. Kanalen var fri for bakterier så lenge den var fri for føde.

HUNTER (1920 a) fant at fordøyelseskanalen hos gytende laks som regel er bakteriefri om prøven bare tas innen 2 timer etter fangsten. Blodet er også sterilt.

HUNTER (1920 b) påviste at de samme bakteriearter som var i sjøvannet også fantes i laksen.

BOHART (1928) har gitt en oversikt over marine bakterier.

REED og SPENCE (1929) fanget kolje utenfor en elvemunning på Nova Scotia og isolerte bakterier fra innvoller og overflateslim. Resultatene var:

	Innvoller	Slim
Proteus	70 %	18 %
Akromobacter	4,4 »	23 »
Pseudomonas	8,7 »	22 »
Flavobacter	5,6 »	8 »
Bacillus	5,7 »	24 »
Aerobacter	4,6 »	—
Andre typer	1,0 »	4 » (Mikrokokker)

STEWART (1932) undersøkte slim- og innvolls bakterier i hyse og framstilte 299 kulturer. Både i slim og innvoller er *Achromobacter* framherskende og representert ved flere typer. *Mikrokokker* fantes av og til i slimet, men aldri i innvollene. *Flavobacter* forekom uregelmessig i slim og bare i ett tilfelle i innvollene. *Pseudomonas* fantes i slimet på noen få fisk og alltid i et meget lite antall. De forekom aldri i innvollene. *Sporedannere* ble aldri funnet i slimet men i innvollene i et lite antall. Fotobakterier forekom uregelmessig begge steder.

SCHØNBERG og DEBELIC (1933) undersøkte et stort antall fisk med hensyn på bakterier og isolerte i alt 41 kulturer som så ble dyrket ved forskjellige pH. Fluoreserende arter grodde ikke ved pH 6,0 og *kan* derfor ikke opptre på husdyrkjøtt før dette blir temmelig gammelt. Artene grodde først ved pH = 6,4 som er den surhetsgrad fisk som torsk og hyse når ned i under rigor.

SANBORN (1932) fant mange forskjellige hittil ukjente organismer i overflateslimet på torsk og hyse i Nordatlanteren. Noen dannet viskøse kolonier på dyrkningssubstratene. Han utarbeidet en metode til bestemmelse av bakterienes proteolytiske evne. Der var flere arter som sterkere enn *Pseudomonas fluorescens* spaltet eggehvite. Denne er ellers kjent som en kraftig eggehvitespalter.

BEDFORD (1934) undersøkte sjøvanns- og bunnprøvers innhold av bakterier og satte disse resultater i relasjon til bunnfiskens flora.

Absolutt nytrukken hyse inneholdt 25—2100 bakterier pr. g.

BLAKE (1935) undersøkte innvollene av 102 fisk av laksefamilien. Herav var 62 fra naturlig vann (resten var akvariefisk). 22 fisk var uten føde. 8 av dem var fri for bakterier i mage og innvoller, 7 var tilsynelatende fri enten i mage eller innvoller. Alle de 40 fisk med føde hadde bakterier.

TJØTTA og SØMME (1938) isolerte 45 renkulturer fra 3 normale torsk og kulturene ble undersøkt på biokjemiske og morfologiske kjennetegn. Fisken inneholdt *Achromobacter*, *Flavobacter* osv. samt *Escherichia*. Fisken var oppbevart i Oslo havnevann i 2 og 12 timer samt i 8 dager. På gjeller, skinn og innvoller fantes gram negative, ikke sporedannende arter og *Escherichia angis* å komme fra det forurensete vann.

F. BAKTERIER PÅ MARKEDSFISK.

TOWER (1899) angir at:

1. Forråtnelse skjer hurtigere når innvollene ikke fjernes.
2. Fuktighet øker ødeleggelsen.
3. Fri adgang av luft nedsetter forråtnelsen.
4. Bløgging nedsetter forråtnelsen.
5. Hvis blod og innvoller fjernes og fisken bløgges vil fisken holde seg lenge også uten is.

Han vasket fisken med forskjellige midler, deriblant borsyre (3 %) i sjøvann, som nedsatte ødeleggelsen. Det skulde ikke brukes som preserveringsmiddel, men som et renslighetsmiddel for at fisken kunde nå konsumenten i en bedre tilstand.

TOWER advarer mot bruk av is av *ukjent* opprinnelse.

CROSS (1919) uttaler at slaktet fisk med vedhengende gjeller råtner hurtigere enn fisk som gjellene er fjernet fra.

HARRISON, PERRY og SMITH (1926) fant at muskulaturen hos 8 hyser var steril, når der ikke var gått mer enn 3 timer etter fangsten. Kjøttet nærmest gjellene ødelegges først, dernest den midtre del av ryggen, mens bedervelsen av halen tar lengst tid.

HARRISON (1929) isolerte *Pseudomonas fluorescens* fra kveite. Det viste seg at den fantes i isen som kveiten ble pakket i men ikke på fisken før den kom i berøring med båten.

SANBORN (1930) studerte havvannbakterienes betydning for fiskens bedervelse. De var istand til å fullføre denne og mange av dem var virksomme selv ved meget lav temperatur.

STEWART (1934) undersøkte markedsfisk med hensyn på aerobe bakterier. Det var hovedsakelig akromobakter- og flavobakter-arter samt mikrokokker som ble funnet. Særlig meget var det av *Achromobacter pellucidum* som antakelig er den kraftigste eggehvitespalter på fisk.

GRIFFITHS (1937) som refererer tidligere arbeider i en litteraturundersøkelse viste at *Escherichia coli* ikke er en normal bakterie i magen og innvollene på sjøvannsfisk. Den forekommer når fisken er fanget i urent farvann og på grunn av behandlingen i land. De viktigste arter som forekommer på fisk er: *Stafylococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacter*, *Akromobacter*, *Escherichia*, *Bacillus* og *Serratia*.

Bakterieantallet økte når fisken gikk tilbake i kvalitet. 1 mill. bakterier pr. g viste en fisk som ikke kunde selges på markedet. *Det nevnes som ønskelig å få stadfestet bakteriologiske standarder for fiskens friskhet.* Fisk som ikke har tatt til seg næring inneholder i alminnelighet ingen bakterier i magen eller innvollene.

LÜCKE og FRERCKS (1940) undersøkte bakteriefordelingen hos torsk. Først ble forskjellige substrater sammenliknet og de ble stående ved vanlig agar med 0,5 g/100 g NaCl ved kintallbestemmelser. Det høyeste kintall fant de umiddelbart like under skinnen, deretter avtok det gradvis ned mot ryggenet, men like ved dette fant de som regel tall som lå noe høyere igjen dog aldri så høyt som like under huden. Denne fordeling forble den samme selv i lenge lagret fisk som har vært tydelig bedervet. De advarer mot å beskadige fisken for eksempel med stikk under behandlingen, da sårflater blir utgangspunkter for intens bakterievekst. Stagnerende smeltevann er meget farlig i bakteriologisk henseende. Små fisk er langt lettere hjemfallen til ødeleggelse enn stor fisk. Når fisk ligger stuet sammen vil der oppstå forskjellige livsbetingelser i berøringsflater og hulrom som dannes, og mens enkelte steder har en kraftig utvikling av bakterier, vil andre kunne forbli sterile. Dette har selvsagt en stor betydning for den bakteriologiske bedømmelse av fisken når den kommer i havn. Arbeidet er forsynt med et større tabellverk.

G. KJEMISKE STOFFER DANNET UNDER BAKTERIEVIRKSOMHET OG DISSE STOFFERS KJEMISKE REAKSJONER.

GIBBONS og REED (1930) bestemte ammoniakkdannelsen i en steril og en bakterieinfisert hysemuskel. I løpet av 24 timer ble dannet $2\frac{1}{2}$ gang så meget NH_3 i den infiserte muskel, etter 48 timer ca. $7\frac{1}{2}$ gang så meget som i den sterile.

HESS (1932) fant at autolysen gikk tregt ved temperaturer mellom $2,2$ og $\div 1,1^\circ \text{C}$, mens bakterier gror. Fisk ble ekstra infisert med kulturer av bakterier fra samme fisks overflate og der ble bestemt flyktige baser.

OKOLOFF (1932) undersøkte sild fra forskjellige farvann:

	Forekomst av silden		
	Stillehavet	Astrakan	Kertsch
<i>Frisk fisk:</i>	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g
Totalflyktig N.	40—90	20—40	15—30
NH ₃ —N	28—65	16—33	12—29
N (CH ₃) ₃ —N	4—20	0,9—5	0—3
<i>Bedervet fisk:</i>			
Totalflyktig N.	54—185	40—41	80
NH ₃ —N	43—182	27—33	70
N (CH ₃) ₃ —N	—	3—7	—

Av OKOLOFFS arbeid framgår det meget interessante faktum at NH₃ og trimetylaminn varierer etter fangststedet. Det er jo en enorm forskjell på trimetylaminninnholdet i fisken i Stillehavet og ved Kertsch.

HINARD (1932) foreslår anvendt forholdet mellom NH₃—N og total vannoppløselig N som et kriterium på fiskens tilstand før den benyttes til hermetisk nedlegning. Det framgår av noen av våre undersøkelser at dette forhold eller enda bedre forholdet mellom (CH₃)₃N—N og total vannoppløselig N tør gi et godt begrep om fiskens friskhet. Metoden medfører en Kjeldahl-bestemmelse.

YAMAMURA (1933) undersøkte 22 forskjellige fiskesorter av marin opprinnelse og bestemmer NH₃ etter FOLINS metode. Råtten lukt opptrer når der kan påvises 30 mg NH₃ i 100 gr kjøtt. Dette er i overensstemmelse med TILLMANS og OTTOS og GLASSMANN og ROCHWARGERS resultater.

PISTELLI (1933) uttaler at der ikke finnes noen metode som nøyaktig vil kunne angi det tidspunkt da forråtnelsen setter inn. Man må holde seg til en aminosyrebestemmelse.

TANIKAWA (1935 a, b) undersøkte kjøttet av karper, sardiner, laks, tunfisk, østers og krabbe og fikk følgende resultater: Flyktige baser stiger enormt etter at der er dannet 30 mg pr. 100 gr kjøtt. Indol kan samtidig påvises i kjøttet, men i friskt kjøtt finnes det ikke. Bakterieveksten tiltar også samtidig raskt. Ved å bestemme flyktige baser skulde det altså lykkes å fastsette en påbegynt dekomposisjon. Svovelvannstoff-bestemmelse kan også benyttes, men er ikke så pålitelig som flyktige baser.

HOLMOV (1937) undersøkte ansamlingen av sulfider og flyktige baser i lagret fisk. Mens dannelse av flyktige baser utmerket indikerer fiskens tilstand, er H₂S-dannelsen ikke egnet hertil i et hvert fall i den første lagringstid.

BROCKLESBY og RIDDELL (1937) viste at trimetylaminnoksyd *ikke* spaltes når fiskemusklene er sterile.

MALIN (1937) påviste at førsteklasses husdyrkjøtt, fisk (stør), fugl (kylling) inneholder 6—16 mg NH₃/100 g.

Brukbart fiske- og fuglekjøtt viste 18—20 mg. Kjøtt, fisk og fugl av dårlig kvalitet 27 mg eller mere.

TILLMANS metode for O₂-absorpsjon som går ut på å behandle kjøttet med O₂-mettet vann og retirere uforbrukt surstoff etter kjent metode, viser tallene 6,4—9,5 for kjøtt av god kvalitet og 20—23,5 for kjøtt av dårlig kvalitet.

SHTENBERG, ROKHLINA og SHILLINGER (1938) fant at god fisk kan inneholde inntil 0,02 mg indol pr. kg. Når innholdet er steget til 0,03 mg pr. kg er fisken bedervet.

Frisk fisk inneholder ikke indol, men det dannes i lagret fisk av visse bakterier. Slike bakterier er coli, proteus, aquatilis solidus og communis. Angir analysemetode for indol.

TANIKAWA (1938) påpeker at de fleste forskere har funnet en øvre grense for flyktige baser på 30 mg/100 g muskel som er karakteristisk for en enda brukbar fisk. Denne grense har hittil utelukkende vært basert på organoleptiske prøver. TANIKAWA mener at grensen er vitenskapelig korrekt av den grunn at:

1. Flyktige baser dannes fra dette punkt av med en rask stigende hastighet.
2. Først ved dette punkt begynner dannelsen av indol som ikke eksisterer i friskt kjøtt.
3. Ved dette punkt tiltar bakterienes deling hurtig.

CHAPMAN CROOKS og RITCHIE (1938). NH_3 -bestemmelse i oppmalt fisk gav tilfredsstillende indikering av hyseproteinets dekomponering. Muskelkjøtt som inneholdt mindre enn 35 mg pr. 100 g muskel er normalt frisk og av god kvalitet. Temperaturen spiller avgjørende rolle for NH_3 -danneshastigheten.

BEATTY (1938) har fortsatt sitt tidligere arbeid og viser at trimetylaminnfraksjonen virkelig består av trimetylaminn som skriver seg fra reduksjonen av trimetylaminnoksyd. BEATTY inndeler de flyktige baser i 4 grupper:

1. NH_3 .
2. Primære aminer.
3. Sekundære aminer.
4. Tertiære aminer.

Av disse bindes NH_3 og de primære baser av formol og den fraksjon som BEATTY og GIBBONS isolerte, må altså bestå av de to siste grupper. For å fjerne gruppe 3 gikk Beatty fram etter BOURY og SCHWINTES metode, hvor alle grupper unntaken 4 ødelegges v. h. a. natriumnitrit og eddiksyre, idet han dog modifiserte deres framgangsmåte. Han kunde da vise at der i det hele tatt ikke forekom noe av gruppe 3 og fraksjonen måtte derfor bare bestå av gruppe 4. Dette gjaldt ved 0°C , $+5^\circ\text{C}$, $+10^\circ\text{C}$ og $+20^\circ\text{C}$ og til alle de tider under lagringen som analyser ble utført. Det lyktes å syntetisere $\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{O}$ av det $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ som kunde isoleres fra en større mengde pressaft av torsk. BEATTY angir så de sannsynlige kilder for $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ i fisken, nemlig kreatin, betain og trimetylaminnoksyd. Han analyserte $\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{O}$ og $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ hver for seg under lagringen ved forskjellige temperaturer og fant at summen av dem er konstant.

TARR (1938). Der er ikke alltid korelasjon mellom det dyrkbare bakterieantall og mengden av trimetylaminn i fisk som ødelegges.

COLLINS (1938) gir en oversikt over fiskens ødeleggelse og pointerer herunder betydningen av trimetylaminnoksydet som surstoffkilde for de fakultativt anaerobe bakterier.

TARR og SUNDERLAND (1938) påpeker at bakterieantallet og trimetylaminnmengden ikke alltid behøver å korrespondere fordi:

1. Der tapes trimetylaminnoksyd under behandlingen av fisken, for eksempel ved drypp (fileter).
2. Den absolutte mengde av stoffet varierer med fiskearten, sesongen og fangststedet.

3. Visse bakteriearter spalter i det hele tatt ikke oksydet, som for eksempel aerobe arter.
4. Visse reduserende arter reduserer hurtigere enn andre.

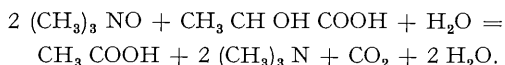
TARR og BAILEY (1939) kommer til samme resultat som TARR og SUNDERLAND: Der behøver ikke å være overensstemmelse mellom bakterieantallet og trimetylaminmengden i lagret fisk.

SHEWAN (1939) antar at trimetylaminøkningen i iset hyse er et brukbart kriterium på forråtnelsesstadiet.

WATSON (1939 a) påviste at det hovedsakelig er slekten *Achromobacter* som utvikler seg på fisk ved + 2° C. *Achromobacter* består av obligate aerobe og fakultativt anaerobe arter og bare disse siste spalter trimetylaminoksyd til trimetylamin. Floraen på fisken består i overveiende grad av obligate aerobe. Veksten av renkulturer av fakultative anaerobe *akromobacter*arter forløper parallelt med dannelsen av trimetylamin under laboratoriebetingelser.

Nærvær av luft (surstoff) medfører en trimetylaminoksydbesparende effekt som økes om der kontinuerlig ledes luft over fiskens overflate.

WATSON (1939 b) fant at spaltningen av trimetylaminoksydet skjer etter følgende skjema:



Oksydet reagerer med melkesyre som dannes under rigor av glykogen, og gir eddiksyre, kullsyre og trimetylamin.

TARR (1940) viste at bare 10 % av de av ham isolerte bakterier fra syv fiskemusklér er istand til å danne trimetylamin av trimetylaminoksyd.

Han påviste nærvær av et enzym som kan aktivere oksydoksyd molekylet og gjøre det skikket for reduksjon av bakteriecellenes dehydrogenasesystemer.

BEATY og COLLINS (1940) som undersøkte pressaft av fisk inndeles ødeleggelsen i to perioder:

1. Oksydasjon av melkesyre og kullhydrater.
2. Oksydasjon av aminosyrer og proteinhydrolyse.

Trimetylaminoksydspaltningen skjer hovedsakelig under den første periode. Fiskens forråtnelse skjer i langt overveiende grad ved bakterier. Autolyse spiller en ubetydelig rolle.

H. LAGRINGSFORSØK.

TILLMANS og OTTO (1924) undersøkte frisk og mindre bedervet fisk ved hjelp av ammoniak-, aminosyre- og polypeptidbestemmelser.

NH₃, aminosyrer og polypeptider tiltok etter hvert som friskheten av fiskestykkene avtok. På det punkt hvor forråtnelsen tok til, var NH₃-mengden kommet opp i ca. 30 mg i 100 g kjøtt og aminosyre-N i ca. 100 mg i 100 g.

FELLERS (1926) anser fiskeslimet som hovedinfeksjonskilden av fiskebåter og transportfartøyer hvor slimet blir liggende igjen i sprekker og sammenføyninger, i lasterommet og på dekket.

Bakteriene utvikler seg raskt i slimet, hvilket framgår av følgende tall:

Bakterier i rå laks:

Fiskens lagringstid ved 17° C	Bakterier pr. ml slim
1 time	370
2 »	1.950
4 »	20.000
6 »	120.000
12 »	110.000.000
24 »	3.900.000.000

Av FELLERS store materiale hitsettes en tabell i en noe omarbeidet form som viser bakterieantallet på gjellene, i buk- og ryggkjøtt samt i innvollene på rå laks. Likeledes viser tabellen indolinnholdet i kjøttet, innvollene og gjellene. Det framgår meget tydelig at gjellene først og framst ødelegges, dernest innvollene, mens ryggkjøttet er mest motstandsdyktig.

Bakterier i rå laks lagret ved ca. 14° C.:

Lagringstid dogn	Bakterier pr. g				Indol µg/100g		
	Gjeller	Bukkjøtt	Ryggkjøtt	Innvoller	Kjøtt	Innvoller	Gjeller
Frisk	370	0	0	0	0,0	0	0
1	51.360	295	18	1.460	0,2	0,9	5,1
2	923.000	4.750	3.530	6.840	0,5	1,3	13,0
3	19.121.000	25.800	15.000	151.300	3,4	3,8	77,0
4	9.814.000	79 000	41.400	175.300	11,2	5,3	260,0
5	143.530.000	1.448.000	172.800	843.600	39,0	15,0	580,0
6	235.630.000	932.000	453.000	1.664.000	78,0	79,0	810,0

Den bakteriologiske undersøkelse strakte seg over 252 ferske og 138 lagrete laks, mens 42 sjøvann- og elvevannprøver ble utført. Resultatet var at frisk muskel var steril mens mage og tarm også kunde være det under vandring og gytning. Gjellene surner og avfarges først og bakteriene spres herfra til kjøttområdet omkring som dernest ødelegges, deretter skjer ødeleggelsen omkring anus og buken og tilslutt råtnet ryggmuskulene.

Bakteriene beveger seg gjennom skinnen på 24—60 timer, jo høyere temperaturen er, desto raskere. Størrelsen av fisken spiller også inn og teksturen av kjøttet. En fisk som er løs i kjøttet ødelegges raskest.

FELLERS isolerte 412 renkulturer hvorav:

- 130 kokker.
- 18 sporedannende aerober.
- 72 ikke sporedannende aerober (chromobacter).
- 150 aerobe achromobacter.
- 27 gjær.
- 8 obligate anaerober.
- 7 spiriller.

Den friske laks' flora består av: kokker, gjær og sporedannende aerobere. Senere kommer disse artene til: Pseudomonas, Aerobacter og Escherichia. Gjær, spiriller og obligate anaerobere spiller underordnet rolle under fiskens forråtnelse.

De undersøkte vannprøver inneholdt samme arter som fisken selv.

FELLERS (1932) undersøkte laks på bakterier og angir følgende tall:

Normal farge og lukt av fisken	2.000 bakt. pr. g
Svak farge og svak lukt av fisken	2.000— 20.000 —»—
Misfarge og kraftig lukt av fisken.....	20.000—200.000 —»—
Sterk misfarge og sterk lukt av fisken	over 200.000 —»—

SARUYA (1932) lagret makrell og bestemte bakterieantallet og fant ved 0° C:

Nyfanget	4.400 pr. g
7 døgn	70.000 —
14 døgn	170.000.000 —
21 døgn	800.000.000 —

SARUYA (1932) oppbevarte makrell ved lave temperaturer og bestemte flyktige baser + NH₃ etter FOLIN, og aminosyre-N etter VAN SLYKE.

Resultatene var:

Lagringstid	Amino- N.	Flyktig N.	Anm.
1 døgn	% 0,15	% —	Frisk
2 »	—	0,03	—
8 »	0,16	0,01	—
15 »	0,14	0,03	Ubehagelig lukt
22 »	0,18	0,04	Helt råttent.

Aminosyrebestemmelsen har ikke gitt noe utslag, mens derimot flyktig N tydelig viser at dekomposisjonen skrider framover.

NOTEVARP og HJORTH-HANSEN (1933) undersøkte lagret småsei. Total ammoniakk steg under lagringen, men mengdene som ble dannet varierte meget. Formol-N gav ikke brukbare tall for karakterisering av fiskens tilstand. pH viste synkning under rigor og senere økning. Bakterieantallet syntes best å gi uttrykk for de forandringer som fant sted. Analysene ble alltid utført på en enkelt fisk.

GRIFFITHS og STANSBY (1934) sammenliknet kjemiske analyser og bakteriebestemmelser i hyse som ble lagret i is. Tallene tiltok sterkt etter 7—11 dager.

BOURY og SCHWINTE (1935) presenterer etter en kritisk gjennomgåelse av analysemetodene, de resultater som er oppnådd ved undersøkelser over holdbarheten av forskjellige fiskesorter. All fisk er innkjøpt på parisermarkedet og oppbevart ved ca. 10° C. Hver prøve består av et større antall fisk, hvorav noen analyseres 1ste dag, resten 2den, 3dje og 4de dag. De karakteriserer fisken på følgende måte: 1. god, 2. nokså god, 3. middels, 4. nokså slett (dårlig), 5. slett (dårlig).

- De betegner: 1. som tilfredsstillende tilstand,
 2. mellomtilstand,
 3. fisken bærer sikre tegn på begynnende forråtnelse, og kan ansees som ikke helt tjenlig til menneskeføde,
 4. mellomtilstand,
 5. fisken tydelig råtten.

Hvis man tar for seg resultatene for fisk som betegnes god, tør man vel regne med at denne har vært død i 1 eller 1½ døgn før analysen skjedde. For de forskjellige former for N finner forfatteren i 100 g kjøtt av følgende fisk (vi tar bare med dem som særlig interesserer våre fiskerier):

Sort	Total opl. N	Amino N	Total flykt. N	NH ₃ N	N(CH ₃) ₃ N	Total N i kjøtt
	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g
Sild.....	629	78,1	15,1	12,5	2,0	2,90
Makrell	645	83,8	18,1	15,9	1,8	3,03
Hvitting	682	70,5	13,3	12,1	0,7	2,84
Skate	1600	118,0	20,2	18,5	2,1	3,90
Flyndre	580	71,5	18,9	13,4	5,1	2,88

Der konkluderes med at tallene for oppløselig N, total ikkeprotein-N og aminosyre-N ikke er brukbare til å skille mellom forholdsvis frisk fisk og fisk som er på kanten av forråtnelse. Derimot synes de flyktige baser, NH₃ og N(CH₃)₃ å kunne gi pålitelig uttrykk for hvor langt dekomposisjonen av fisken er kommet.

BOURY og SCHWINTES arbeid går videre ut på å søke etter andre muligheter for bestemmelse av fiskens ferskhet. Således prøver de: 1. Indol, 2. Svovelvannstoff, 3. pH, 4. Bestemmelse av surstoff i ekstrakt, 5. Metylenblåttreduksjon, og for fete fisk: 6. Forandringer av fettene. a. Syredannelse. b. Harskning.

1. Indolpåvisning ble utført i makrell og sild angitt som μg , mikrogram, (10^{-6} g) pr. 100 g kjøtt.

Fersk sild inneholdt mindre enn	0,10— 0,16	$\mu\text{g}/100$ g
Såvidt anvendelig sild	1,6 — 3,2	—
Nesten råtten sild	9,0 —12,5	—
Fersk makrell	0,1 — 0,15	—
Såvidt anvendelig makrell	0,5	—
Nesten råtten makrell	0,53— 0,62	—

Noen alminnelig anvendelse kan metoden ikke få, muligens må den prøves for hver enkel fiskesort. Man ser forskjellen mellom sild og makrell. Tallene for den råtne makrell skulde jo tyde på at denne var helt fin, når man sammenlikner den med silden.

2. Svovelvannstoffbestemmelse finnes rent generelt å ikke ha noen interesse.

3. pH. Forfatteren finner i alle tilfeller verdier for pH som ligger forholdvis surt an, 6,4—6,7. Dette kommer av at deres fisk allerede er mange timer gammel før undersøkelsene gjøres. De har neppe arbeidet med fisken før etter rigor.

4. og 5. Av disse biologiske metoder lyktes det ikke å få brukbare tall for dekomposisjonen.

6 a. Syremengden i oljen som kan isoleres fra sardinen og makrellen øker jevnt og tør anvendes som et kriterium på at fisken er mer eller mindre frisk, men ikke som kriterium på hvor langt dekomposisjonen av fiskekjøttet er nådd.

6 b. Måling av harskningen ga ikke brukbare resultater.

Det er den biokjemiske side av fiskeforråtnelsen som det er lagt hovedvekten på i dette arbeid. I all korthet kommer forfatteren også inn på den *mikrobiologiske* og *fysikalske* side.

De nevner således at bakterieantallet på fisken kan fastsettes enten ved kultur i vanlig agar eller ved direkte telling i mikroskopet. Der angis ingen tall for kulturer, men der nevnes at en frisk makrell viser 1 bakterie pr. 10—20 felter i mikroskopet, mens en som har begynt å gå i forråtnelse viser 5 bakterier pr. felt.¹⁾

Av fysikalske metoder har de målt deformasjonskraften ved hjelp av dynamometriske apparater spesielt tilpasset herfor.

De finner:

Antall dager etter at fisken er fanget	Deformasjonstall
1	390
2	365
3	210
4	240
5	220

Endelig har de undersøkt fisken med Woods lys.

Alder	Tilstand	Fluorescens
1	God	Fiolett, meget svak
2	Passabel	Blåhvit, meget svak men intens ved halen
3	Dårlig	Hvit, ganske sterk praktisk talt overalt.

REAY (1935) lagret fisk i is i 20 døgn og bestemte bakterieantallet som ikke steg nevneverdig før mellom det 7de og 10de lagringsdøgn. Den 12te dag hadde bakteriekurven skutt kraftig i været for så senere, inntil den 20de dag, å bli stadig flatere og flatere. Samtidig ble lukten av fisken observert. Der var ingen forandring å merke på lukten før den 7de dag, mellom 7de og 10de ble den sterkere, mellom 10de og 12te var den skjemt og først mellom 13de og 15de dag ble lukten utpreget råtten. Luktens utvikling og bakterieøkningen følger hinannen derfor ganske godt.

Ennvidere bestemte han flyktig N. Først etter 10 døgn øket flyktig N nevneverdig og nådde toppen etter 14—15 døgn. I den friske fisk ligger flyktig N mellom 5—10 mg/100 g og mellom den 10de og 15de lagringsdag finner han 25—60 mg/100 g.

¹⁾ Det undersøkte felt i mikroskopet hadde en diameter på 0,17 mm, og der ble arbeidet med 800 gangers forstørrelse (oljeimmersjon : $\frac{1}{2}$ a).

NICKERSON og PROCTOR (1935) undersøkte hyse ved hjelp av elektrometriske titreringer etter STANSBY og LEMON, pH, aminosyrer etter VAN SLYKE, og ved formoltitrering, ammoniakk og bakterietellinger.

pH kunde ikke benyttes da forandringene var for små. De fant sted enten i sur eller alkalisk retning. pH opprinnelig var 6,65—6,90. De sureste gikk i alkalisk, de minst sure først i sur retning. Aminosyrer etter VAN SLYKE øket noe til å begynne med i sterile prøver for så å avta, i ikke sterile var der en viss økning å spore. Det samme gjelder også formoltallene. Ammoniakkallene er mest karakteristisk og skal gjengis her for de ikke sterile prøver:

Temperatur ° C	Tid i timer					
	0	24	48	72	96	120
	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g
+ 5	5,4	6,4	9,1	9,8	10,8	12,8
+ 10	6,0	8,7	10,3	12,2	17,6	18,5
+ 15	6,1	11,7	13,2	15,5	24,7	—

All fisk ble frosset med kullsyreis ved fangsten og lagret ved ca. 18° C inntil undersøkelsen fant sted.

De bestemmer også bakterietilveksten ved 0°, + 5°, + 10°, + 15° C og finner følgende gjennomsnittstall som vi her gjengir som logaritmer.

Temperatur	24 timer	48 timer	72 timer	96 timer	120 timer
0	2,08	2,16	2,70	2,93	3,50
5	2,90	3,04	3,53	3,65	3,90
10	2,49	2,72	3,63	5,02	5,63
15	4,69	5,11	5,33	6,54	—

Da det i den praktiske fiskeomsetning ikke er mulig å holde fisken bakteriefri, anbefales anvendelse av lave temperaturer under oppbevaring, da dette i høy grad nedsetter bakterienes livsvirksomhet. Disse antas å være hovedfaktoren ved forråtnelsen av hysekjøttet.

VAN DEURS og HOFF-JØRGENSEN (1936) fant at øverste grense for holdbarhet av fiskefiléer indikeres ved pH 7,5. Av stor betydning for holdbarheten er den tid som hengår fra fisken blir slaktet til den kommer i is. Dette framgår av at grense-pH = 7,5 nåes raskere jo lenger man venter før fisken legges i is. Deres resultater dessangående framgår av følgende lille tabell:

Tid fra slakting til ising..	1 time	4 timer	10 timer	22 timer	30 timer
Grense-pH nåes etter	11 dager	9,75 dager	6,25 dager	4,5 dager	2,75 dager.

BOURY (1936) har fortsatt nevnte arbeid av BOURY og SCHWINTÉ og har for det første foretatt en forandring av destillasjonsapparatet for totale flyktige baser. Isbadet blir sløyfet og skumhindreren forandret mens vannkjølingen erstattes med luftkjøling. Dette er bare detaljforandringer som intet endrer på prinsippet, de bare tjener til å lette arbeidet med destillasjonen. Deretter har han endret

framstillingen av vannekstraktet idet tiden forlenges og temperaturen av vannet er ca. 20° C (tidligere var det 50° C).

Han fortsetter undersøkelsene over forskjellige fiskesorter og finner for frisk makrell:

	Total flykt. N	NH ₃ N	N(CH ₃) ₃ N	Total N i kjøtt
	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g	g/100 g
Makrell	17,2	14,8	2,0	3,10
	17,2	14,9	2,3	3,08
	18,0	14,5	3,1	2,9
	23,4	21,0	2,4	3,22
	18,9	16,3	2,4	3,8

Disse tall stemmer overens med tallene i BOURY og SCHWINTES arbeid (1935).

BOURY foretok også en bestemmelse av flyktige N-baser i hvitting som lagres i is i 12 døgn. En analyse utføres straks, en etter 7 døgn og den siste etter 12 døgn. Tallene er mg N pr. 100 g total N i kjøttet.

Varighet	Total flykt. N	NH ₃ N	N(CH ₃) ₃ N
	mg N/100 g total N	mg N/100 g total N	mg N/100 g total N
0 døgn God	531	466	38
7 » Nokså god	889	672	113
12 » Slett	1194	815	260
Et nytt forsøk gav følgende tall:			
0 døgn God	474	432	30
12 » Nokså god	1066	—	—
15 » Slett	1102	795	300

Etter tallene å dømme er trimetylaminet ganske karakteristisk idet det gir langt kraftigere utslag enn ammoniakk.

BEATTY og GIBBONS (1936) bestemte bakterier og flyktige baser i muskelpressaft som ble oppbevart ved 0°, + 5°, + 10° og + 20° C. Der er god overensstemmelse mellom bakterieantallet og mengde flyktige baser. Som gjennomsnitt av undersøkelser av flere hundre torsk, bedømt av flere personer organoleptisk, mener BEATTY og GIBBONS å kunne uttale at lukten av fisken tar til når den er dannet ca. 4—6 mg flyktige baser og at den er meget utpreget når den er nådd opp i 12 mg pr. 100 g kjøtt.

Ved undersøkelser av gjeller og kjøtt hver for seg viser alle prøver at gjellene ødelegges meget raskere enn kjøttet ved 20° C.

Økningen av flyktige baser i sterilt oppbevart, på forhånd sterilisert torsk-kjøtt er meget liten, i løpet av 21 døgn ved 0° C øket det i fisk som følger:

	Etter 0 døgn	Etter 21 døgn
1.	9,3	13,8
2.	9,3	14,3
3.	8,9	13,8
4.	11,5	16,1
	mg/100 g	mg/100 g

Økning i fileter som ble behandlet og oppbevart som vanlig ved handelsprodukter (ved 0° C) var (her angis gjennomsnittstallene for 7 fisk som ble undersøkt hver for seg):

Tid i døgn	mg N i 100 g
0	8,2
8	8,6
9	9,4
10	12,1
11	15,6
12	17,7
14	32,6

Analyser av helt fersk fisk gjennom et år har vist 5—12 mg pr. 100 g kjøtt' variasjonen er altså ganske stor. Dette resultat kommer også REAY (1935) til-

Deretter går BEATTY og GIBBONS over til å undersøke mulighetene for å bruke trimetylaminbestemmelser i fisken.

Trimetylaminoksyd forekommer i marine dyrs kjøtt og reduseres av mange bakteriearter til trimetylamin. Der henvises til BOURY og SCHWINTÉ som fant at trimetylamin stadig øker i fisk som lagres. Forfatterne benytter CONWAY og BYRNES metode for bestemmelsene.

Det kunde ikke påvises noen nevneverdig økning av N (CH₃)₃ i sterile fiskeprøver eller i steril saft. *Altså skyldes trimetylamindannelsen ikke autolytiske reaksjoner.* Det er all grunn til å anta at den skyldes bakteriell reduksjon av trimetylaminoksyd.

I fersk nyslaktet fisk ble trimetylamin-N bestemt i mer enn 100 fisk (torsk, hyse, sild, lysing og lyr). Den laveste verdi som ble funnet var 0,06 mg i 100 ml pressaft og den høyeste 0,3 mg. Gjennomsnittet var 0,17 mg. Da lukten først kom ved ca. 4 mg (altså ca. 25 × originalverdien), er det innlysende hvor meget nøyaktigere en trimetylamin-analyse vilde være enn en ammoniakkanalyse ved bestemmelse av fiskens ferskhet. Når det her blir anvendt uttrykket trimetylamin, er forfatterne selv oppmerksom på at der kanskje også er andre baser ved siden av som opptrer på samme måte. Dette spiller i og for seg mindre rolle for anvendelsen av prøven.

BROCKLESBY og RIDDELL (1937) finner trimetylamin i iset kveite som tabellen viser:

Lagringstid i døgn.

	0	3	5	7	9	12	13	14	15
	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g
Buklapper	0,4	0,5	0,5	0,3	0,6	1,7	5,2	11,4	13,3
Nakker	0,2	0,3	0,5	0,3	0,4	1,2	4,4	8,5	11,5
Ryggmuskulaturen	0,2	0,3	0,5	0,3	0,4	1,3	4,8	8,9	12,8

LÜCKE og SCHWARTZ (1937) fant at hovedinfeksjonskilden for fersk fisk er fiskens tarminnhold. Andre mer eller mindre viktige kilder er havvannets og havbunnens bakterieinnhold, hertil kommer så båten og isen. Slaktning og spyling ombord på trawlerne foregår ikke tilfredsstillende nok, sett fra mikrobiologisk standpunkt. Temperaturen i fiskerommene er heller ikke tilstrekkelig

lav til at fisken kan holde seg i 14 dager under transport til hjemmehavn. Å fjerne slimet fra fiskeskinnet nedsetter i høy grad bakterieantallet, men det er en tvilsom metode, da den tør medføre en lettere inntrengen av bakterier i kjøttet. Fisk i is-saltblandinger viser et lavere bakterietall enn fisk i bare is.

VAN DE VELDE (1937) undersøkte blant annet lagret torsk og hyse og fant følgende resultater for torsk:

Torsk oppbevart ved 18° C.

Serie 1	Metylenblått	Janusgrønt	Azurufin
Fersk	avfarget	nesten avfarget	avfarget
24 timer	på 20 timer	på 20 timer	på 20 timer
(svak lukt)	» på 1 time	rosa på 2 timer	rosa på ½ time
2 dager	» på 20 min.	blekrosa på 6 timer	avf. på 1 time
(sterk lukt)		Rødviolett på ½ tim.	
		Blekrød på 2 timer	» på 20 min.

Tidligere undersøkelser har gitt usikre og svingende resultater for reduktaseprøven, men forfatteren mener at tilsetning av melk har gjort metoden brukbar (se analysemetoder).

Tilsvarende resultater fant han for hysen.

Ved hjelp av SKARS metode fant forfatteren i denne torsk:

i fersk tilstand	0 bakterier pr. felt.
5 timer 18° C	3 —»— —»—
5 — 37° C	8 —»— —»—
24 — 18° C	150 —»— —»—
24 timer: 5 timer ved 37° og 19 timer ved 18° C....	200 —»— —»—

SHEWAN (1937) undersøkte holdbarheten av hyse som ble lagret i is. Han bestemte bakterier, summen av flyktige baser, ammoniakk, dimetylammin og trimetylammin. Filetene av 10 fisk ble skåret opp i stykker og blandet, 100 g ble innveiet, og fordelt i vann og alkohol ved hjelp av en hurtiggående rører. Suspensjonen ble mettet med boraks og destillert i vakuum. Destillatet ble oppfanget i H₂SO₄ og blandingen av H₂SO₄ og sulfatene ble så fraksjonert. To undersøkelsesrekker etter 20 døgn og 36 døgn ble gjennomført.

Resultatene er vist i tabellen s. 25.

Denne tilbakegang i ammoniakk og totale baser en tid etter starten har vi også stadig kunnet påvise.

I følge SHEWAN er altså mengden av triaminer det beste kriterium på ødeleggelsen, idet dets mengde fra starten av øker 43 ganger, mens mengden av diamin øker 28 ganger og ammoniakk bare 5 ganger. Endelig øker totalbaser ca. 7 ganger. Da diamininnholdet stadig følger bakteriemengden, anser SHEWAN bestemmelsen av dette som særlig verdifull og arbeider videre hermed.

MARKOFF (1939) undersøkte en makrellarts (*Pelamys sarda*) forandringer under lagring. Skinnet, tarmene og gjellene er setet for bakteriene som alle er av psykrofil art. Disse understøttes av mesofile arter som skyldes sekundær infeksjon etter fangsten, når fisken går i forråtnelse. Bakteriebildet på fisken

Lagringstid døgn	N=mg/100 g				log bakterie antall
	Total	NH ₃	diamin	triamin	
0	11,3	10,0	0,08	0,6	3,2
3	10,4	8,3	0,25	1,0	3,6
6	10,2	7,9	0,55	1,3	4,2
9	14,7	10,0	1,25	3,4	5,3
13	24,9	12,0	1,48	11,2	6,2
16	39,0	19,8	1,84	17,1	6,4
20	62,6	39,2	1,62	21,0	7,0
23	65,3	37,8	2,83	25,7	—
27	77,9	51,5	2,03	24,6	—
36	77,0	53,0	1,00	23,2	7,3

skifter under lagringen. Der hersker ingen lovmessighet mellom de forskjellige faser av ødeleggelsen. Svartehavsfisk spaltes av:

1. Bakterier som kan spalte proteinstoffer med eller uten nærvær av kullhydrater, som Proteus, vibrierer osv.
2. Bakterier som *ikke* spalter proteinstoffer i fravær av kullhydrater, som Bact. coli.
3. *Vibrio aquatilis* som inntar en mellomstilling mellom 1 og 2.
4. Peptonspaltere som gir indol og svovelvannstoff.
5. Streptokokker, mikrokokker.
6. Fluoreserende arter (Pseudomonas).
7. Bact. Zopfi, Bac. Ellenbachensis.
8. Sarcina og Tetragenä.
9. Sporedannere.
10. Restgruppe, ikke nærmere angitt.

SNOW og BEARD (1939) undersøkte laksens bakterieflora og isolerte ikke mindre enn 1838 renkulturer av bakterier som de kan anbringe i 15 slekter. Hertil kommer gjærarter og en del lavtemperaturvoksende bakterier. Obligate anaerobere fantes ikke.

Hos alle fisk forekommer slektene Achromobacter, Micrococcus, Pseudomonas, Kurthia, Flavobacterium og Proteus.

Indolmengden er et inadekvat uttrykk for spaltningen, da indolproduserende bakterier forekommer uregelmessig.

Svovelvannstoffmengden i fisken synes brukbar.

Flyktige syrer gir best resultat, men da bestemmelsen av dem er et nytt felt, må der arbeides videre hermed.

ASCHEHOUG og VESTERHUS (1940) undersøkte bakterieantallet i vårsild som ble lagret ved forskjellige temperaturer. Dyrkninger skjedde aerobt og anaerobt ved 37°, aerobt ved 22° C. Det aerobe og anaerobe kimtall ved 37° C var begge lave sammenliknet med det aerobe kimtall ved 22° C. Lagring ved lav temperatur medfører lavere kimtall. Silden råtnet ved 13° C på ca. 3 døgn, ved 5—8° C på ca. 4 døgn.

De aerobe bakterier ved 22° C var gramnegative små staver. Disse stavers omsetninger var det som nedbrøt silden.

I. ANALYSEMETODER.

SKAR (1922) angir en metode for direkte telling av bakterier i melk. Den burde også kunne finne anvendelse for fisk (se VAN DE VELDE).

TILLMANS og OTTO (1924) undersøkte frisk og mindre bedervet fisk ved hjelp av ammoniakk-, aminosyre-, og polypeptidbestemmelser. Muskelstykker ble oppbevart på kolber ved en temperatur av 12—15° C i flere dager. Utseende og lukt ble bedømt hver dag inntil forråtnelsen var kommet godt igang. Noen stykker kjøtt ble fordelt i den 10-dobbelte mengde vann i en kolbe, tilsatt toluol og rystet i 24 timer. Etter filtrering ble NH₃ og aminosyrer bestemt i alikvote deler. For aminosyrer ble brukt SØRENSEN-GRÜNHUTS metode. En del av filtratet ble felt med kolloidal Fe(OH)₃ og polypeptider bestemt etter WALDSCHMIDT-LEITZ metode.

GLASSMANN og ROCHWARGER (1929, 1930) bestemte NH₃ ved hjelp av absorpsjon til permutitt og kolorimetrering av eluatet etter Nessler. Bestemmelsene ble utført i muskulaturen, etter at skinnen var fjernet. Begynnende forråtnelse antydes av et ammoniakkinhold på 25 mg/100 g.

OKOLOFF (1932) bestemte ammoniakk og trimetylamen i sild. Han malte silden på kjøttkvern, veiet inn 50 g farse og fordelte denne i 1000 ml vann. Etter 24 timers henstand i isskap ble macerasjonen filtrert og to kolber ifyllt 400 ml filtrat hver. Der ble tilsatt 2 g brent magnesia og destillert til 300 ml var gått over. I det ene destillat ble total-flyktig-N bestemt og etter tilsetning av formol også NH₃. I det annet destillat ble trimetylamen bestemt etter at alt annet N var fjernet med natriumnitrit og eddiksyre. Oppløsningen ble gjort alkalisk og destillert på ny.

BUDACJAN (1932, 1933) har angitt en metode for bestemmelse av svovelvannstoff. Den vil vel særlig få interesse for krustasekjøtt som er rikere på svovel enn fiskekjøtt.

CONWAY og BYRNE (1933) har angitt en meget enkel mikrometode for bestemmelse av NH₃ og trimetylamen. Flate glasskåler med tilslepet glasslokk er delt i to konsentriske rom. I det ene tilpipeteres 2 ml 1/60 normal saltsyre, i det annet 2 ml av den væske som skal undersøkes samt 2 ml mettet pottaske-oppløsning. Etter 2 timers henstand retitreres uforbrukt saltsyre med natronlut ved hjelp av mikroburette. Metoden tillater bestemmelse av ca. 99,5 % av den foreliggende ammoniakk i blod eller muskelsaft.

LÜCKE og GEIDEL (1935) anbefaler bestemmelse av N-holdige flyktige baser som øker progressivt med forandringene i fiskekjøttet. 5—10 g finmalet kjøtt anbringes i et destillasjonsapparat, tilsettes 300 g vann og 1—2 g nybrent MgO. Basene oppfanges i n/10 svovelsyre. De undersøkte sild, torsk, hyse, sei, lange og rødfisk og noen flyndresorter i fersk tilstand og fant 20 mg flyktig N i 100 g fersk fisk. 50 mg i 100 g viser fullstendig ødeleggelse og ca. 40 mg settes som grense for anvendelse av fisken til menneskeføde.

BEATTY og GIBBONS (1936) anser flyktige N-holdige baser og økningen av dem for å være et utmerket kriterium på ferskhetsgraden av fisk. De undersøkte torsk. Økningen av disse baser fra før rigor til første spor av lukt var omtrent 6 mg pr. 100 g kjøtt og skyldes praktisk talt bare bakterievirksomhet. Det kan *kun* brukes til å følge ødeleggelsen av fisken, hvis man kjenner verdien av N-basene i fiskekjøttet ved *starten* av lagringen, da disse opprinnelige verdier kan variere like meget som den angitte verdi (6 mg pr. 100 g).

Metoden består i vakuumdestillasjon av basene i et modifisert Parnass-apparat. Mettet natriumborat (pH = 9,5) benyttes som et mildt alkaliserende

middel. Basene oppfanges i $\frac{1}{70}$ n syre. Der retitreres med $\frac{1}{70}$ n natronlut under tilsetning av de WESSELOWS indikator. Der destilleres $\frac{1}{2}$ time (volum ca. 15 ml). 2 g kjøtt innveies. Senere går de over til å bruke CONWAY og BYRNES metode.

VAN DE VELDE (1937) studerte som nevnt fiskekjøttets dekomposisjon ved hjelp av følgende 3 metoder:

1. Reduktaseprøve med
 - a. Metylenblått.
 - b. Janusgrønt.
 - c. Azurufin.
2. Direkte bestemmelse av kimtallet ved hjelp av SKARS metode.
3. Behandling av fiskekjøttet med aceton og undersøkelse av ekstraktet med kvartslampe.

1. Reduktaseprøven: Først steriliseres melk (5 ml i hvert glass) ved 120° C. 2 g fiskekjøtt tilsettes og der rystes til fiskekjøttet er fordelt. Så tilsettes 2—3 dråper fargestoffoppløsning. Der rystes og tilsettes et lag parafin (2 mm). Glasset stilles ved 37,5° C og avfargingstiden noteres. I tilstrekkelig bedervet fisk avfarges metylenblått helt, Janusgrønt slår om til rødt (rosa) og Azurufin gir først rødt som tilslutt helt avfarges. Oppløsningene av metylenblått og janusgrønt framstilles som følger:

- a. Metylenblått: 30 ml mettet oppl. i etanol
1 ml KOH 1 %
99 ml dest. vann.
- b. Janusgrønt: 5 ml mettet oppløsning i vann
195 ml dest. vann.

2. SKARS metode finner han utmerket og anbefaler den for fisk (se Centralblatt für Bakteriologie II, 57, 326. 1922).

3. Behandling med aceton og bestråling med kvartslampe. 20 g fiskefarse blandes med 100 ml nydestillert aceton. Filtratet bestråles med kvartslampe. Allerede etter få timers oppbevaring ved vanlig temperatur, når den friske lukt av fisken var ved å forsvinne var der allerede fargeforandring å spore. Den øket etter hvert. VAN DE VELDE mener at denne undersøkelsesmetode kan få betydning. Der vil komme et utførligere arbeid herover senere.

REAY (1937) undersøkte en syntetisk blanding av NH_3 , monometylamin, dimetylamin, trimetylamin og trimetylaminoksyd for å finne en sikker kvantitativ analysegang ved undersøkelser av fisk på disse kvelstoffholdige produkter. Han kom til følgende resultater,:

Stoff	N i mg		
	Tilstede	Funnet	Funnet i %
Total flykt.-N	78,0	78,1	100
NH_3 -N	46,4	46,6	100
NH_3CH_3 -N	9,1	8,8	97
$\text{NH}(\text{CH}_3)_2$ -N	10,5	10,6	101
$\text{N}(\text{CH}_3)_3$ -N	12,0	11,7	98
$\text{N}(\text{CH}_3)_3$ O-N	10,5	10,7	102

når han går fram på denne måte: Blandingen som klorider rystes i mørkt rom med en alkalisk suspensjon av kvikksølvoksyd som kvantitativt fjerner ammoniakk. Filtratet konsentreres og metylamin bestemmes med VAN SLYKES manometermetode. Dimetylaminn ble bestemt i nærvær av de andre aminer etter tilsetning av ammoniakk, kolorimetrisk med kobberdithiodicarbamat. Ved bestemmelse av trimetylaminn måtte først mono- og dimetylaminn fjernes ved reaksjon med NaNO_2 i LUNGES nitrometer. Deretter destilleres trimetylaminn over i syreforlag. Summen av de totale baser ÷ summen av aminene = ammoniakken.

FIRSSOW (1937) bestemmer NH_3 i fisk og kjøtt ved hjelp av en modifisert Nesslermetode.

STROHECHER, VAUBEL og KIRCHBERG (1937) beskriver en metode for bestemmelse av kjøtt og fisks *oksydasjonstall*.

Fiskemuskelmasse behandles med garvesyre og destilleres med vanddamp. Destillatet kokes med svovelsyre og permanganat hvis uforbrukte mengde retitreres med oksalsyre. Forbruk (ml $n/10$) omregnes på tørrstoff og er lik oksydasjonstallet. Tallet stiger i fisk når den lagres. Normal torsk viser tall mellom 28,9—47,4 og bedervet mellom 69,8—79,2. Variasjonene er altså tydelige.

KIMURA og KUMAKURA (1938) innveier 50 g farse (i Claisenkolbe) tilsetter 150 g ammoniakkfritt vann, 150 ml metylalkohol, 50 ml 10 % $(\text{COOK})_2$ -oppløsning og 50 ml 15 % K_2CO_3 -oppløsning og destillerer i vakuum ved 40 °C i 30 min. over i et forlag med 0,05 normal H_2SO_4 . Der retitreres. 10 mg i 100 g totale flyktige baser tyder på meget frisk fisk. Ved begynnende forråtnelse finner de 20 mg N/100 g ved fremadskreden 30 mg/100 g. Krabbe og haikjøtt viser avvikende verdier.

LINTZEL og HERRING (1939) bestemmer trimetylaminn i et serum av fisken framstillet ved hjelp av natriumwolframmat. En alikvot del av serumet tilsettes soda og formol, hvoretter trimetylaminn drives over i et forlag ved hjelp av en luftstrøm ved vanlig temperatur. Der retitreres med innstillet trimetylaminnoppløsning.

FISKEMUSKULATURENS KJEMISKE SAMMENSETNING.

a. Konvensjonelle analyser.

En inndeler de matnyttige fisk i 2 grupper, 1) mager fisk med et gjennomsnittlig fettinnhold på 0,2 g/100 g og 2/ fete fisk som kan ha et fettinnhold på opptil over 20 g/100 g.

Da de magre fisk utgjør hovedmassen av den ferskfisk som anvendes, er det særlig deres holdbarhet og hvordan den kan økes som har vært og er gjenstand for bevåkenhet fra selger og kjøpers side. De aller fleste undersøkelser har derfor vært drevet med *hyse* og *torsk*.

I enkelte land som Kanada hvor fangst av fet fisk er av stor industriell betydning, er der drevet undersøkelser av *kveite* og *laks*. Endelig har *silda* vært brukt som forsøksobjekt, således i Frankrike og Russland.

Torsk og hyse er i følge konvensjonelle analyser svært ens. Således inneholder de begge gjennomsnittlig ca. 80,3 g/100 g vann, 19,7 g/100 g tørrstoff, 18 g/100 g *protein*stoffer (total N \times 6,25), 0,2 g/100 g *fett*, 0,4 g/100 g *glykogen* og 1,1 g/100 g *askebestanddeler*.

Disse tall er underkastet variasjoner, og for tørrstoffets vedkommende kan vi etter egne analyser oppgi tall fra ca. 17—22,5 g/100 g. Av påbegynte undersøkelser framgår at proteinstoffinnholdet varierer på en lovmessig måte med fiskens tørrstoffinnhold.

Når det gjelder å skape et grunnlag for videre studier av fiske-muskulaturen, er det nødvendig å kjenne dens enkelte bestanddeler i alle detaljer. En slik konvensjonell analyse sier derfor ikke så meget og vi må holde oss til mer spesialiserte analyser for å få et innblikk i muskulaturens sammensetning.

b. Biokjemiske analyser.

Fra den komparative biokjemis arbeidsområde, som omfatter studiet av alle kjemiske individers forekomst i forskjellige dyre- og plantearter og hvis oppgave er å finne slektskapssammenhengen mellom de forskjellige arter, har vi hentet mange av de analyser som framgår av følgende tabell. Materialet er ikke meget fyldig, men dette må sees

Stoff	Molvegt	Nærvær, event. mengde mg/100 g			Anm.
		»Levende« fisk	Rigor	Bedervet fisk	
<i>Salter.</i>					
Hydrokarbonater		lite		meget	
Difosfater					
Monofosfater					
Sulfider		0		meget	
Laktater		0	400	0	
Acetater		0	0	meget	
Butyrater		0	0	»	
Propionater		0	0	en del	
Kreatinfosfater	211	opptil 500	spor	0	
Adenosinpyrofosfater	489				
<i>Ammoniakderivater.</i>					
Ammoniak	17	5—10		100—200	
Monometylamin	31	0			
Dimetylamin	45	0		3	
Trimetylamin	59	0—2		60—100	
Trimetylaminoksyd	75	150—1500		spor	
Urinstoff	60	5—2000			
Cholin	118				
<i>Basiske aminosyrer.</i>					
Lysin	146				
Arginin	174				
<i>Guanidinderivater.</i>					
Metylguanidin	73				
Kreatin	131	200			
Kreatinin	113				
<i>Heterocykliske aminosyrer.</i>					
Histidin	155				

Stoff	Molvegt	Nærvær, event. mengde mg/100 g			Anm.
		»Levende« fisk	Rigor	Bedervet fisk	
<i>Dipeptider.</i>					
Karnosin (β -alanylhistidin).....	226	ca. 250			
Anserin (β -metylalanylhistidin).....	240	ca. 250			
<i>Betainderivater</i>	117				
γ -butyrobetain	145				
Karnitin	161				
<i>Purinderivater.</i>					
Xanthin	152	ca. 60			
Guanin	151				
<i>Diverse.</i>					
Glyoksalin	68				Sild
Histamin	111				
Neurin.....	103				Hyse
Indol	117	0	0	meget	
Huminstoffer					
Monosakkarider	180			spor	0
Glykogen		opptil 500	spor		

i forbindelse med det faktum at den komparative biokjemi enda bare er i sin vorden og derfor framleis har et mer kvalitativt enn kvantitativt tilsnitt. De fleste av disse stoffer forekommer hos størsteparten av de hittil undersøkte fisk.

Se tabellen s. 30—31.

Mange av de her nevnte stoffer omdannes uten tvil i den døde muskulatur til andre stoffer som nok kunde tenkes å få betydning for påvisning av muskulaturens tilstand under lagring, men kjennskapet til de enkelte stoffers omdannelse enten den nå måtte skje ved spesielle enzymer i muskulaturen eller ved enzymer fra mikroorganismer er meget magert.

Et av stoffene i fiskemuskulaturen, nemlig trimetylaminoksyd som de senere års forskning har vist er et av de viktigste for nedbrytningsprosessen, er blitt bestemt i forskjellige fiskesorter av BEATTY (1939) etter kvantitative metoder og vi vil gjengi en del av hans resultater i følgende tabell. Vi tar da med fisk som er av interesse for våre fiskerier.

Art	Antall fisk analysert	Trimetylaminoksyd mg/100 g pressaft	
Torsk	50	590—780	gj.snittl. 670
Hyse	8	340—430	380
Lyr	7	440—500	480
Lysing	5	780—980	890
Sild	8	440—590	480
Makrell	10	220—290	260
Skrubbeflyndre	6	250—540	380
Sandflyndre	1		418
Hundetunge	6	230—560	310
Hå	6	1250—1590	1430

Da BEATTY hverken har angitt tørrstoffinnhold i pressaften eller i fisken og heller ikke fiskens alder, begrenses analysenes verdi noe herav. Interessant er dog den store forskjell mellom de 3 nær beslektete torskefisker, makrellens lave og håens høye innhold. Av særlig interesse vilde det være å få vite om et høyt vanninnhold i fisken faller sammen med et høyt innhold av trimetylaminoksyd.

2. Protein-stoffer.

FÜRTH påviste i 1895 at muskelplasmaet hos kanin består av *myosin* og *myogen*. For kaninmuskulatur har BATE SMITH (1937) angitt at den er sammensatt av minst 5 forskjellige protein-stoffer, nemlig

myogen i en mengde av 10 g/100 g, *myoalbumin* med 1 g/100 g, *myosin* med 68 g/100 g og *globulin X* med 21 g/100 g og endelig resten som utgjør stromaprotein eller bindevev.

Myosinet, som er uoppløselig i vann, foreligger ved pH 7,2 til ca. 90 % i gelform.

REAY og KUCHEL (1937) ekstraherte fersk hysemuskel med 7 g/100 g LiCl som løste ca. 85% av total protein. 67% herav besto av myosin og 18% av myogen.

Muskelpressaft som utgjør ca. 30 g/100 g av muskelen, består av sarcoplasmaet som omgir muskelfibrene og inneholder alt myogen og myoalbumin samt litt globulin. Det samme kan vi antakelig gå ut fra gjelder et vannekstrakt av fiskekjøttet såframt dette ikke er særlig fortynnet, idet, som vi senere skal komme tilbake til, jonestyrken under ekstraksjonen er avgjørende for oppløseligheten av den vannoppløselige eggehvite.

3. Fett og askebestanddeler.

Muskelfett av magre fiskesorter foreligger der svært få undersøkelser over. Om fett og de øvrige eteroppløselige stoffer kan inneholde spesielle bestanddeler som kan gi opphav til stoffer som særlig vil kvalitetsforringe fisken, vet man derfor ikke. Askebestanddelene i fiskemuskulaturen er dels fritt oppløst i muskelsaften, dels bundet til andre oppløselige eller uoppløselige stoffer. Noe nærmere kjennskap hertil for fisks vedkommende finnes ikke.

c. Fiskemuskelens oppløselighetsforhold.

Vi inndeler fiskemuskulaturens stoffer hva oppløselighet i vann angår i 2 grupper:

1. Vannoppløselige stoffer
 - a. Kolloider.
 - b. Molekyldisperse og jondisperse stoffer.
2. Vannuoppløselige stoffer.

Dette er en rent praktisk måte å karakterisere stoffene på, idet vi kommer til i det følgende å omtale pressaifter, vannekstrakter, sera, og dialysater som alle inneholder stoffer av gruppe 1, mens residuer fra ekstrakter inneholder stoffer fra gruppe 2. Av undersøkelser som vil bli publisert seinere, framgår at såvel den vannuoppløselige som den vannoppløselige del av muskelen utgjør en mengde som øker med tørrstoffinnholdet. Vi kan angi følgende gjennomsnittstall for torsk, når bestemmelsene utføres i fortynningen 250 gr fisk + 750 ml vann.

Muskulaturens oppløselighet i vann.

Vann g/100 g	Tørrstoff g/100 g	Uoppløselig fraksj. g/100 g	Oppløselig fraksj. g/100 g
83,0	17,0	11,8	5,2
81,5	19,5	13,5	6,0
78,0	22,0	15,3	6,7

Den oppløselige fraksjon kan igjen deles i tre deler, nemlig:

1. Vannoppløselige, varmekoagulable proteinstoffer,
2. Vannoppløselige stoffer som ikke er av kolloid natur.
3. Glykogen (i kolloid oppløsning).

Det framgår av undersøkelsene at også den vannoppløselige proteinfraksjon tiltar forholdsvis sterkt med økende tørrstoffinnhold i muskelen. Den vannoppløselige ikke-proteinfraksjon må da tilsvarende avta, hvilket også framgår derav at det osmotiske trykk i muskelsaften må være konstant hos de enkelte fisk. Avtagende vanninnhold må tilsvare nedsatt molar mengde av osmotisk virksomme stoffer. Vi kan utvide forrige tabell til å se slik ut.

Muskulaturens oppløselighet i vann.

Vann g/100 g	Tørrstoff g/100 g	Uoppløselig fraksj. g/100 g	Oppløselig prot. g/100 g	Opl. ikke prot. stoffer g/100 g
83,0	17,0	11,8	1,5	3,7
81,5	19,5	13,5	4,2	1,8
78,0	22,0	15,3	5,5	1,2

Der bemerkes dog at disse tall, som er ment som orienterende og er framgått av et foreløpig analysemateriale, enno er for lite til bestemmelse av sikre gjennomsnittstall for disse fraksjoner. Det er heller ikke mulig å si om de gjelder for torskemuskler i sin alminnelighet, da analysene er utført på små 1,5—2 kg rusetorsk som ble fanget i Bergensfjordene. Det er mulig at større fisk vilde vise andre forhold mellom fraksjonene, likeledes at torsk fra andre lokaliteter også vilde vise andre forhold.

Antakelig kan vi utlede rent generelt at en muskel med høyt/lavt vanninnhold inneholder lite/meget vannuoppløselig eggehvite, lite/meget vannoppløselig eggehvite og meget/lite av vannoppløselige andre stoffer.

FORANDRINGER I DEN DØDE MUSKULATUR.

Når fisken er drept, inntreer momentant prosesser i den som overfører dens muskulatur i en sådan tilstand at den byr fremmedorganismer en viss motstand og nedsatte livsbetingelser. Snart tar imidlertid andre prosesser overhånd og der skapes ideelle livsbetingelser for fremmedorganismer som bakterier og visse andre mikrober.

Så snart døden er inntrådt kommer følgende *præ-autolytiske* prosesser i gang.

1. Fosfagenolyse.
2. Glykogenolyse.
3. Syntese av traumatisk ammoniakk.

Alle disse prosesser er av meget inngripende art, men gjelder stoffer som i kvantitativ henseende dog er relativt underordnet i muskulaturen.

Fosfagenolysen består i spaltning av fosfagen, kreatinfosforsure alkalier i fosfater og fritt kreatin, en spaltning som blir fullstendig så snart glykogenolysen har brakt pH ned i 7,0.

Glykogenolysen består i omdannelse av kullhydratet *glykogen* (et stivelsesliknende stoff) til *melkesyre* som gjør muskulaturen sur og medfører en senkning av dens pH fra 7,2 til 6,3 hos torsk.

Syntesen av *traumatisk ammoniakk* skjer dels under fiskens intense muskelbevegelse mens den blir drept, dels under den mekaniske behandling fisken får under framstilling av farse. Den traumatiske ammoniakk dannes ved spaltning av adenosinfosforsure salter og andre egnete forbindelser. SCHMIDT-NIELSEN og STENE (1931) finner av et forsøksmateriale på 10 torsk verdier for NH_3 mellom 8,4—13,7 mg med gjensnt. 9,8 mg/100 g fisk, men regner med en sannsynlig maksimalverdi på 14 mg/100 g, og hva der kan bestemmes utover denne mengde, skyldes da destruksjonsprosesser.

De præautolytiske prosesser skjer raskt og den langsamste av dem, glykogenolysen, tar ikke over $1\frac{1}{2}$ døgn ved 0°C , mens den skal være fullført på en times tid ved 40°C . Når muskelens pH er sunket til sin minimale verdi (6,3 for torsk) er prosessen tilendebrakt og muskulaturen

er relativt godt beskyttet mot bakterievekst på grunn av denne lave pH som stagnerer visse bakterier der har sitt vekstoptimum ved høyere pH.

No setter autolysen inn og samtidig med denne utvikler bakteriene seg på fiskens overflate, først langsomt og etter en tid med stadig økende hastighet, deretter med jevn hastighet, for så atter å vokse langsommere og langsommere inntil der er utviklet det antall bakterier som fiskeoverflaten kan tilstede. Dette antall anghenger av mange faktorer.

Alle hittidige undersøkelser har vist at autolysen, som kjemisk sett hovedsakelig må bestå i en proteolyse, skjer så langsomt i fiskemuskulaturen at man helt kan se bort fra de mengder av autolyseprodukter som dannes, sammenliknet med dem som er resultatet av spaltninger av bakterienes enzymer. Selv i muskler av pattedyr går autolysen langsomt for seg, dog noe raskere enn i fiskekjøtt, slik at pattedyrs kjøtt etter præ-autolysen kan oppnå visse fordelaktige egenskaper i smak og konsistens (bli mørt) før bakterieveksten tar overhånd.

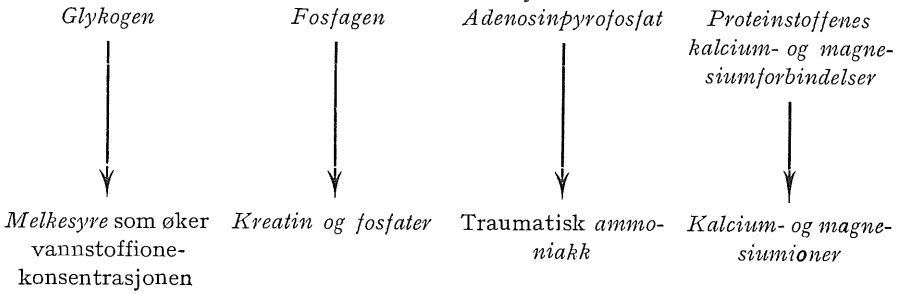
I praksis må vi derfor for fiskens vedkommende regne med en momentan start av bakterieveksten så snart præautolysen er avsluttet, en vekst som vi vel ikke kan hindre, men nok kan moderere hastigheten av ved anvendelse av lave temperaturer, desinfeksjonsmidler eller belysning med bakteriedrepende stråler og endelig i en viss målestokk ved en utpreget *aseptisk* behandlingsmåte.

Bakteriene produserer enzymer som vesentlig katalyserer de to prosesser, *spalting av trimetylaminoxid til trimetylamin og spalting av eggehvite til ammoniakk og flere andre stoffer*. Denne eggehvitespalting kan foregå ved *aerobe* og *anaerobe* bakterier og det er særlig de siste som fiskemuskulaturens egentlige *forråtnelse* skyldes.

Fiskekjøttet kan også bederves eller kvalitetforringes ved andre mikrobielle prosesser. Således danner indolproduserende og svovelvannstoffproduserende bakterier ubehagelig lukt, mens visse *actinomyces*, strålesopper, er årsak til en typisk »jordlukt». *Pseudomonas fluorescens* utvikler seg meget raskt i fiskens overflateslim og grønnfarger dette. Slimet utsender en karakteristisk skarp lukt. Det er særlig kveite som bederves på denne måte. Endelig kan fett gjennomgå visse forandringer som kvalitetsforringelser fisken. Antakelig er disse prosesser mer av kjemisk og enzymatisk enn av mikrobiologisk natur. Tabellen s. 37 gir en oversikt over de postmortale forandringer i fiskekjøttet.

Post-mortale forandringer i fiskemuskulaturen.

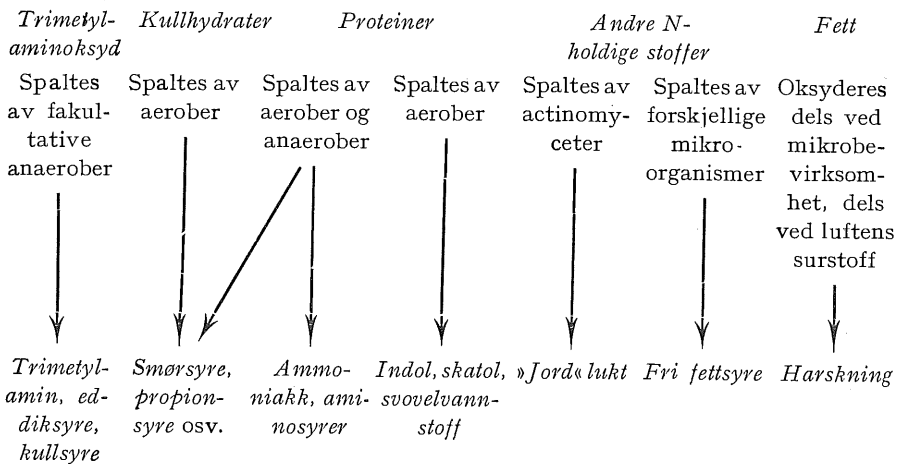
1. Præ-autolyse



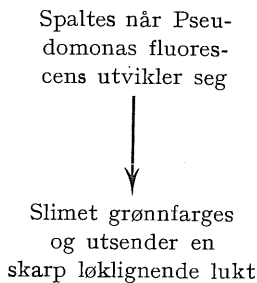
2. Autolyse.

De autolytiske prosessene i fiskemuskulaturen er i fysikalsk henseende meget inngripende men går kjemisk så langsomt for seg at det ikke er nødvendig å ta hensyn til mengden av forskjellige spaltningsprodukter ved siden av mengden av de samme produkter som dannes av bakterier.

3. Spaltninger som skyldes mikro-organismer.



Stoffer i slimet på fiskens overflate



MIKROORGANISMER.

Innledning.

Når en tar hensyn til hva en ser når en fisk råtner, må en formode at mikrobene er spredt gjennom hele fisken både utenpå og inne i muskler og innvoller. Ved å undersøke organ for organ av nettopp drept fisk, har man funnet bakterier (andre arter har der ikke vært søkt systematisk etter) i overflateslimet, i muskelen, i fordøyelseskanalen, i blodet og i gjellene. Den alt overveiende mengde av bakterier finnes i alminnelighet i slimet, i innvollene og i gjellene. Bakteriemengden i blod og muskulatur er, når den i det hele tatt blir funnet, meget liten, og det forklares av GEE (1927) ved at fisken når den blir drept, øker blodsirkulasjonen meget og derved pumper bakterier inn fra snittflaten etter kniven som har infisert såret. Derved fordeles bakteriene rundt om i muskulaturen. Det er ikke alltid fordøyelseskanalen inneholder bakterier, for når fisken får gått av seg føden, vil de kraftig virkende fordøyelsesenzymer oppløse bakteriene like godt som de oppløser fiskens vanlige føde.

Overflateslimet og gjellene blir derfor de organer på fisken som *alltid* er bakterieholdige.

Siden bakteriemengden i muskulaturen og blodet på nettopp drept fisk enten mangler eller er meget liten, må vi antakelig kunne slutte at muskulaturen og blodet hos sunn, levende fisk er *sterile*. Annerledes stiller det seg for syk, levende fisk som kan være smittet av visse bakteriesykdommer, men deres årsak, visse patogene bakteriearter, skal vi ikke omtale her.

Hvor skriver nå fiskens bakterieflora seg fra? Saltvannfiskens mikrobe flora bestemmes av mikrobe floraen i havvannet og i bunnmaterialet og av floraen i biosfæren som lever pelagisk eller er knyttet til havbunnen.

Havets mikrobielflora.

Mikrobene forekommer frittlevende i vannet, adsorbent til andre store og små levende og døde organismer som likeledes svever i vannet, adsorbent til makrofloraen og -faunaen som er fastvokset på bunnen og endelig adsorbent i bunnmaterialet (benthos).

De store vannmasser langt fra kysten er temmelig bakteriefattige (en har, riktignok med gamle metoder, på sine steder bare kunnet påvise 1 bakterie pr. 15 ml sjøvann) men antallet øker når prøvene tas nærmere kystene. Kystområdene har som regel store tilførsler av ferskvann som fører med seg mikrober fra bebodde strøk og dessuten løsrives der mikrober fra biosfæren i det grunnere kystvann. Brakkvann er meget rikere på antall og arter og prøver fra havneområder og sterkt trafikerte strøk er særlig rike. Hvor kloakker rinner ut, finner man selvsagt mest, og her er antallet av typiske forråtnelsesbakterier særlig framtrekkende.

Det synes derfor som om bakteriene går til grunne når de kommer i kontakt med sjøvannet. Det kan tenkes flere grunner herfor. Klorforbindelser i sjøvannet er skadelig for mange arter, mangelen på nyttbare næringsstoffer gjør seg gjeldende, sollyset skader, hvilket er påvist såvel i tropiske farvann som i Clyde sjøen i Skottland (Lloyd 1929—30), hvor bakterietallet alltid øker om natten og avtar mot et minimum ved middagstid, nærvær av giftigvirkende stoffer i sjøvannet destruerer dem, mens mange arter koagulerer og går til bunns og absorberes av bunnmaterialet. Herved har de unndratt seg vår iakttagelse, idet der bare foreligger noen få spredte undersøkelser over bakterier i bunnmaterialet og vegetasjonen i havet.

Bakterietallet er størst i lagene under overflatevannet, men avtar så mot bunnen, hvor dog selve bunnmaterialet ofte er meget rikt på bakterier. Absorpsjonsgraden av dette er avgjørende, således absorberer slam og lerbunn langt fler bakterier enn sandbunn. Jo mer organisk materiale de inneholder, desto flere bakterier absorberes der (ZOBELL og ANDERSON, 1936).

Biosfæren inne ved kysten og på bunnen av havet er ofte meget rik på bakterier og andre mikroorganismer. Tang, tare, aktinier og særlig svamper er tilholdssted for dem. Døde organismer som synker til bunns øker bunnmaterialets innhold av mikroorganismer som danner kraftige enzymer. Det kan vi forstå derav at ikke mindre enn noen billioner tons copepoder årlig overføres til de enkleste bestanddeler (ZOBELL og RITTENBERG, 1935). Og det er jo ikke bare disse arter det dreier seg om.

Mikrobefloraen i overflateslimet.

Mikrobefloraen i fiskens overflateslim avhenger derfor kvantitativt og kvalitativt av miljøets mikrobeflora. Fisk som svømmer i de fri vannmasser ute til havs er derfor langt fattigere på organismer enn fisk som oppholder seg nær kysten, og denne har igjen en fattigere flora enn fisk som befinner seg i brakkvann av forskjellige renhetsgrader. Bunnfisk som søker sin føde nær ved og i selve bunnmaterialet får en rikere og antakelig også allsidigere mikrobeflora enn annen fisk. LÜCKE og SCHWARTZ (1937) uttaler at det er trawlerkapteinenes erfaring at fisk som fiskes på svampgrunner (Bjørnøya) holder seg dårligere og har slettere smak enn annen fisk. Svamp er meget bakterieholdig. Ved tråling rotes bunnmaterialet opp og bibringer fiskeslimets bakterieflora en sterk økning.

Fiskeslimet er en god grobunn for bakterier. Det består av mycoprotein, fosfoprotein og lipoider og litt kullhydrater og selvsagt flere salter (det står jo i direkte kontakt med sjøvannet).

Slimet er viskøst, hvorfor bevegelige bakteriearters bevegelsesevne hemmes. Derved beskyttes fiskehuden mot gjennomvandring av disse arter.

Man kunde tenke seg at bakteriene i slimet på grunn av dettes næringsverdi vilde utvikle seg til et stort antall som allerede når fisken var i live ved sine omsetninger vilde skade fiskens ferskhet. Hertil er å bemerke at slimet skifter meget ofte. På bunnfisken hyse har f. eks. vi en gang konstatert en meget ubehagelig lukt av hodet, dog var fisken ellers helt i orden, og etter opplysninger fisket et par dager før lukten ble tydelig. Hysen har et tynnere og mer delikat skinn enn torsken og vil derfor ødelegges hurtigere.

På nytrukken hvitting, torsk og småsei finner man ca. 400—ca. 10 000 aerobe bakterier pr. cm² alt etter fangstplassen.

Der foreligger noen få undersøkelser over standplassens innflytelse på mikrobefloraens kvalitative sammensetning (de enkelte arbeider refereres under tidligere undersøkelser).

Disse arbeider viser at fisken til havs bare bærer med seg én gruppe av *forrhåtnende* bakterier, de såkalte *Achromobacter*-arter som utskiller sterke proteolytiske enzymer og spalter eggehvitestoffer. Den har selvsagt også annen mikrobeflora, som består av mindre suspekterte arter. Når fangsten foregår nærmere kysten kommer også andre forråtnende arter til og i stigende mengde. *Pseudomonas fluorescens* er en av dem. Utenfor elvemunninger blir *Proteus vulgaris* en framherskende art og den er en utpreget forråtner av fisken. Av kanadiske og engelske undersøkelser framgår at *Pseudomonas* utgjør 0% av floraen i frisk sjø, 2% nær kysten

og 22% utenfor en elvemunning, mens *Proteus* tilsvarende ikke forekommer i frisk sjø, men i en mengde av 18% utenfor samme elvemunning. Når en annen bakterie, *Escherichia coli* kan påvises i fiskeslimet, gir det grunn til å formode at fisken er fanget nær kysten, hvor urent ferskvann blander seg med havvannet eller er fisket direkte innen et havneområde. Fisken kan ytterligere også komme til å oppta patogene arter. På flyndre fisket i Themsenmunningen kunde man således påvise *Eberthella typhi*, som ga opphavet til en epidemi etter at flyndren var servert i frittert tilstand.

Man har enda ikke kunnet påvise obligate anaerobe bakterier i fiskeslimet (SHEWAN, 1938), men der er funnet gjær på fisk som er fisket i noen avstand fra kysten. Sporedannende bakterier har man en sjelden gang kunnet finne i slimet.

Gjellenes mikrobeflora.

Spesielle undersøkelser herover er, såvidt oss bekjent, ikke foretatt, men vi tør gå ut fra at gjellene særlig er setet for aerobe arter og at de forekommer i meget store mengder. De finner her en utmerket grobunn, foruten i det slim som gjellene er bedekket med, også i det blod som kleber til dem når fisken blir slaktet. Artene er sikkert de samme som i overflateslimet. På grunn av gjellenes store bakterieinnhold er det på gjellene at fiskens ødeleggelsesprosess tar sitt utgangspunkt. Gjellene ødelegges raskest, muskulaturen klarer seg lengst.

Muskulaturens mikrobeflora.

Det er all grunn til å anta at muskulaturen i den levende fisk er steril likegyldig om den er fanget i frisk sjø eller i et urent farvann. De fleste som har drevet undersøkelser herover, har kommet til dette resultat. Laksekjøtt har til og med vært sterilt 24 timer etter fangsten.

Blodets mikrobeflora.

Blod uttatt sterilt av *levende* fisk er sterilt. GEE fant noen få bakterier i blod tatt sterilt fra hjertet av *slaktet* fisk.

Fordøyelseskanalens mikrobeflora.

Fisken tar til seg utviklingsdyktige bakterier, gjær og muggsporer med føden og utskiller mikroberike ekskrementer. Da fisk som har »gått føden« av seg tilslutt utskiller sterile ekskrementer og har steril fordøyelseskanal, har fisken ikke som pattedyrene en spesifikk og permanent tarmflora. En slik er sannsynligvis overflødig på grunn av fiskens kraftige fordøyelsesvæsker.

Laks som fanges i gytetiden har i langt overveiende antall tilfeller steril fordøyelseskanal.

Som i overflateslimet er akromobakterieartene de framherskende i fordøyelseskanalen når fisken er fanget i frisk sjø og *Proteus vulgaris* har ikke kunnet påvises i slik fisk. Men fanges fisken utenfor elve-munninger, blir det Proteus som kommer til å dominere. Den kan da utgjøre hele 70% av den totale flora, mens akromobakterieartene bare utgjør ca. 4%. *Pseudomonas* er ukjent fra det åpne hav, men melder seg når fangsten skjer ved kysten, og jo nærmere elveutløp dess mer av den. *Escherichia coli* forekommer i fisk som er blitt oppbevart i kummer i havne vann. *Clostridium tetanus* og andre Clostridiumarter er funnet i hyse fanget i tilsynelatende frisk sjø, men dog ikke langt fra land. Den forekom ikke i slimet. Fordøyelseskanalen inneholder derfor obligate anaerobe arter og blant dem derfor også sporedannere.

Fakultative anaerober, som trimetylaminoksydspaltende akromobacter finner man som regel i lagret fisk, men om de forekommer i fisk fanget i absolutt rent sjøvann vet man framleis ikke. HARRISON fant *Achromobacter pellucidum* på kveite. Den er tatt med i *Bergey*, men det nevnes intet om dens evne til å spalte trimetylaminoksyd. Der er såvidt oss bekjent kun utført ett arbeid (TARR 1940) over fakultative anaerober i lagret fisk, men dog uten angivelse av morfologiske eller fysiologiske data.

Av slike akromobakter-arter finnes der også en del fakultativt *aerobe* som har en særlig interesse for fisk. De forekommer både i fordøyelseskanalen og i slimet og på gjellene og forårsaker at fisken lyser i mørke. 6 arter er omtalt i *Bergey*. Der er også påvist lysende vibrioner i sjøvann. De lysende bakterier begynner å utvikle seg meget tidlig på fisken, ofte kort tid etter at den er dratt opp av vannet og altså mens fisken er dødsstiv. Sannsynligvis forekommer de i så stor mengde at der ikke skal mange delinger til før de er så mange at lyset kan iakttas. Dette forsvinner etter en tid, hvis varighet avhenger av temperaturen. Samtidig hermed øker bakteriemengden i slimet sterkt. Dette skyldes andre, ikke lysende arter hvis livsvirksomhet kan tenkes å skade fotobakterienes lysproduserende evne. En annen årsak til at fisken ikke lyser lenger kan være den at fiskemuskulaturen på dette tidspunkt ikke inneholder mer kullhydrater. Kullhydrater (glukose) er nemlig nødvendig for lysbakterienes lysproduksjon når de dyrkes i laboratoriet.

Så lenge fisk lyser i mørket, tør vi gå ut fra at den enda ikke er så gammel at forråtnelsesbakterier og trimetylaminoksyd-spaltende bakterier har begynt å utvikle seg i nevneverdig grad på den.

Av andre arter som finnes både i fordøyelseskanalen, i slimet og på gjellene må nevnes flavobakterier, mikrokokker, basiller og fungi.

Her i laboratoriet har vi således kunnet rendyrke *Bacillus mycoides* fra reker og blåskjell tatt like utenfor kysten og av *Fungi imperfecti* en *Oospora* både fra skallet og maveinnholdet i reker.

Markedsfiskens mikrobeflora.

Etter at fisken er trukket opp av sjøen og kommet i fiskernes hender, tilføres fiskens bakterieflora nye arter. Alt hva fisken kommer i berøring med, er infisert med bakterier og andre mikrober i større eller mindre grad og alle disse gjenstander blir årsak til at fiskens bakterieflora forandres. Av spesiell betydning for en rask nedbrytning av fisken er at den blir infisert med typiske forråtnelsesbakterier.

Der er utført noen undersøkelser som tydelig viser hvordan bakteriemengden forandres hos fisk fra fangsten av til den foreligger som markedsfisk hos detaljisten.

Det kjente General Seafoods Corp. i U. S. A. lot utføre en bakteriologisk undersøkelse av kolje. Resultatene framgår av tabellen.

Timer etter slakting	Nakke	Rygg	Hale	Slim
1	24.800	0	140	
48	159.000	0	0	
96	197.000	580	70	
Fisken befries for innvoller etterpå	1.035.000			
Vaskes så med klorholdig sjøvann	451.500			3.021.000
48 timer i knust is	1.240.000			778.000
Gjennom 3 vasketanker ...	700.000			1.853.000
Fileter		Overflate	I kjøttet	
Etter hurtigfrysing		1.400.000	153.000	1.040.000
		77.450	31.950	

BEDFORD (1932) deltok ombord på en fiskebåt og sikret seg helt nytrukken fisk. Den ble straks prøvetatt og senere oppbevart så aseptisk som mulig. Han sammenliknet så den aseptisk behandlede fisk med iset fisk og med på vanlig måte behandlet fisk og fikk følgende resultater.

	Ombord pr. g	9 timer pr. g	15 timer pr. g	Ca. 30 timer pr. g
Aseptisk behandling	450	125	1240	—
Oppbevaring på is etter god vasking	450	—	— 810	1040, 1820
Vanlig måte uten is	—	1.310.000	—	—

Det er innlysende at renslig behandling hjelper til å holde bakteriefloraen nede.

LÜCKE og SCHWARTZ analyserte under en fiskeekspedisjon til Bjørnøya (1937) bakterieantallet på fisk under alle stadier inntil fisken ble solgt i Karlsruhe. Da det store materiale hindrer en gjengivelse av alle resultater her (de arbeider med flere substrater blant annet), skal her kort vises ved noen tall hvordan gangen i bakterieantallet var.

Levende torsk	ca. 1 600— 8 000	pr. cm ² overflate	
Trålet torsk	ca. 25 000—400 000	—	—
Slaktet tråltorsk	80 000—500 000	—	—
Spylet tråltorsk	20 000—250 000	—	—
Etter lossing og anbringelse hos			
fiskegrosserer i Wesermünde ca.	4—250 mill.	—	—
Etter anbringelse hos detaljist			
i Karlsruhe ½—1 dag ...	200 000—30 mill.	—	—
(Fisken er da vasket) 3—3½ dag	30—125 mill.	—	—

Denne oversikt er meget illustrerende: Den viser at en vasking og spyling av fisken hjelper til med å holde bakterieinnholdet konstant eller senke det noget, og at fiskens flora hovedsakelig utvikler seg under den lange transport (14 døgn) til lossehavnen. Her blir så fisken under lossing, auksjon og kjøring til grossistens lager stående uten isavkjøling i opptil ½ døgn. Herunder øker antallet videre og først når detaljisten i innlandsbyen får fisken under behandling blir den noe befriet for bakteriene. Detaljisten er nødsaket til å presentere fisken med et friskt utseende og renser den først for det koagulerte slim, vasker den og spylar den. Men etter spylingen vokser bakteriene videre, trenger lett gjennom den slimfrie hud, og allerede etter 2—3 døgn er bakterieantallet steget enormt.

Markedsfiskens infeksjonskilder.

Mens det vil være vanskelig å rette på mangt i behandlingen av markedsfisk som medvirker til at den hurtigere går i fordervelse, er der to infeksjonskilder som vi til en viss grad har hånd over, nemlig *vaskevannet* og *isen*. Som vaskevann brukes sjøvann ute til havs, sjøvann i form av mer eller mindre bakterieholdig havnevann samt ferskvann i form av springvann. Meget rent ferskvann og friskt sjøvann kan man anvende uten betenknning hva den hygieniske side av saken angår, men der opplyses fra praktisk hold at sjøvannvask medfører at

fiskefileter kleber til hinannen. I sjøvann må vasking skje raskere enn i ferskvann, da fisken tar til seg salt fra sjøvannet.

Oktober 1941 fant vi 100 bakterier pr. ml i springvannet i Bergen og 1600 bakterier i samme volum i havnevannet i Vågen.

Isen bør fryses av springvann, men man kan også trygt bruke naturfrosset is som er lagret en viss tid ved lav temperatur (LOESER 1935, LÜCKE og SCHWARTZ 1937, HJORTH-HANSEN 1937), da største-parten av bakteriene dør ut under denne lagring. Av LOESERS og LÜCKE og SCHWARTZ undersøkelser framgår at is kan inneholde fra ca. 250—57 000 bakterier pr. ml. smeltevann og av HJORTH-HANSENS undersøkelser over dødeligheten av *Pseudomonas* at der er etter 10 døgns lagring av isen ved $\div 16^{\circ}$ bare er 0,01% tilbake i levende tilstand av denne bakterie.

Bakteriefloraen i lagret fisk.

Når fisken blir sløyet og skal lagres (deri innbefattet forsendes over lengre strekninger i is) er den infisert med en allsidig bakterieflora som no tar til å utvikle seg. Denne bakterieflora må antas å ha en viss sammensetning av arter som er tilnærmet lik i de forskjellige tilfeller, i et hvert fall i store trekk. Hvordan skulde en ellers kunne forklare seg at holdbarheten varierer lite og at man gjerne finner tall for ammoniakk og trimetylamin og bakterier som er nokså like for fisk av samme lagringstid?

Vi kan gå ut fra at markedsfiskens bakterieflora alltid inneholder trimetylaminoksyd-spaltende og eggehvitestoffspaltende arter. Ofte inneholder den bakterier som produserer lys, svovelvannstoff og indol. Sjelden arter som gir høve til »jordluft«.

Under lagring av fisken ved temperaturer ned til ca. 0° C gjennomgår denne flora en kvalitativ forandring hvis forløp framleis er lite kjent. Rent generelt er det antakelig slik at aerobe arter som indol, svovelvannstoff, ammoniakk, fettsyre og lysproduserende arter tar til å utvikle seg først. Umiddelbart etterpå, det vil si så snart de trimetylaminoksydspaltende arter har vandret inn i muskulaturen gjennomgår denne en alt mer om seg gripende forandring som egentlig ikke har noe med forråtnelse å gjøre, nemlig spaltningen av trimetylaminoksydet. Først når dette er spaltet i nevneverdig målestokk, begynner de aerobe og aerobe/anaerobe eggehvitespaltende arter å utvikle seg. Og siste fase i ødeleggelsesprosessen er utviklingen av de obligate anaerobes, som *Bac. putrificus*, som fører forråtnelsen til ende. I meget gammel, råtten *Palamys Sarda* fant MARKOFF (1939) dog praktisk talt bare mikrokokker.

Vi kan skille mellom 4 stadier i ødeleggelsen av fisk, nemlig:

1. *Inkubasjonsperioden*, som varer i ca. 2 døgn ved 0° C. Ingen vekst. Præautolyse.
2. *Kullhydratspaltningssperioden*, som varer i ca. 5 dager, fra 2.—7. dag. Vekst.
3. *Trimetylaminoxydspaltningssperioden*, som begynner omkring det 5. døgn.
4. *Eggehvitespaltningssperioden*, som begynner omkring det 10. døgn.

Disse perioder kan ikke skarpt skilles fra hinannen, men griper over i hinannen og oversikten over dem skal bare tjene som en orientering for de løpende forandringer.

EGNE UNDERSØKELSER.

På grunnlag av kjennskapet til de stoffer som forekommer i fiskemuskelen og deres omdannelsesmuligheter ved præautolyse og bakterieomsetninger, kan man som omtalt tidligere velge et eller flere av disse stoffer og forfølge dets eller deres skjebne under fiskens ødeleggelse. Øker mengden av et slikt ledestoff sterkt eller omdannes det til andre karakteristiske ledestoffer som det er forholdsvis enkelt å påvise, resp. å bestemme kvantitativt, burde bestemmelsen av disse stoffer og mengden av dem da være særlig egnet for fastsettelse av fiskens ferskhetsgrad.

Følgende analytiske metoder er kommet til anvendelse under disse undersøkelser:

Kjemiske metoder:

- a. Vanndampflyktige N-holdige baser.
 1. Total flyktig N.
 2. Ammoniakk N.
 3. Trimetylamin N.
- b. Aminosyrer.
- c. Indol.

Bakteriologiske metoder:

- a. Platekulturer av aerobe arter ved 20° C.

Biokjemiske metoder:

- a. Metylenblåttreduksjon.

Fysikalsk-kjemiske metoder (se dette arbeides 2. del):

- a. pH.
- b. Titreringskurver.

Permanganatforbruk av et destillat av fiskekjøttet og bestemmelse av fosfat er også prøvd, men disse metoder er enno ikke nærmere undersøkt.

Prøvetaking for kjemiske og biokjemiske metoder.

Ved undersøkelser av muskelen kan man enten beholde den hel eller knuse den ved å male den på kjøttkvern. Beholdes den hel, kan den enten analyseres som sådan, hva dog sjelden finner sted eller den kan befries for saften ved pressing. *Pressaft*en blir da gjenstand for analyse. I knust tilstand blir muskelen ekstrahert med vann hvorved framstilles et *vannekstrakt* som analyseres. Dette vannekstrakt filtreres fra det uoppløselige gjennom grovt filterpapir og analyseres så i filtrert tilstand. Det uoppløselige kan også vaskes ut på filtret og skjer dette grundig, får man et vannekstrakt som kvantitativt inneholder alle de oppløselige stoffer i fiskemuskel. Av den knuste muskel eller av pressaft, resp. ekstrakt kan også framstilles et *jernserum* eller *triklor-eddiksyreserum* (andre sera kan og framstilles) etter gjengse metoder. Disse *sera* inneholder alle vannoppløselige stoffer i muskelen minus eggehvitestoffene. Hvis vi ser bort fra eventuelle hydrolytiske fenomener ved fortynningen av muskelen med vann, kan et vannekstrakt oppfattes som en fortennet pressaft (dette gjelder dog ikke innholdet av koagulabel eggehvite). Vanlig er det pressaft og vannekstrakt som kommer til anvendelse hos de fleste der har undersøkt fiskemuskel under lagring. Men alle framstiller den ikke helt på samme måte. De anvender forskjellige mengdeforhold mellom fiskemuskel og vann og forskjellige ekstraksjonstider og -temperaturer. Ennvidere lar de ekstraksjonen foregå dels uten og dels med røring.

Ekstrakt.

Vi er blitt stående ved følgende framgangsmåte for ekstrakter: Den for skinn og bein befridde filet males gjennom en utkøkt kjøttkvern 2—3 ganger og oppbevares i en Esmarkskål med lokk. Av den godt blandete masse innveies 250 g som tilsettes nøyaktig 750 ml destillert vann på en vidhalset flaske (av Jenaglass til bakteriologisk bruk). Der rystes gjentagne ganger i løpet av en time, alltid ved 20° C, og massen filtreres gjennom et grovt filter (Schl. og Sch. nr. 520). Når analysen skjer straks, blir der ikke tilsatt noe desinfeksjonsmiddel.

Pressafter.

Pressafter er unntagelsesvis blitt anvendt og ble da framstillet i en bærpresse med anordning for konstant trykk, $\frac{3}{4}$ kg pr. cm², i en mengde som var nok for formålet. Regner man med et utpressbart pressaftinnhold på 10—20 g i 100 g fisk, vet man hvor meget fisk som må anvendes i pressen for å få tilstrekkelig analysemateriale. Utpressingen må alltid skje ved samme temperatur.

Sera.

Sera kan framstilles ved hjelp av en rekke forskjellige koaguleringsmidler. BOURY og SCHWINTE brukte triklor-eddiksyre, LINTZEL og HERRING brukte natriumwolframat mens vi er blitt stående ved kolloidalt jernhydroksyd i likhet med TILLMANS og OTTO (1924), TILLMANS, HIRSCH og KUHN (1927) og GLASSMANN og ROCHWARGER (1929). Kolloidalt jernhydroksyd har nemlig den egenskap ikke å etterlate noe av koagulasjonsmidlet i serumet (med unntakelse av meget små mengder saltsyre, da serumet antar en litt surere reaksjon enn oppløsningen hadde) mens de andre koagulasjonsmidler blir integrerende del av vedkommende serum.

Et serum er vesentlig enklere å gå ut fra enn kjøtt, pressaft og vannuttrekk ved de seinere analyser, hvorav til og med noen ikke kan utføres, for eksempel med kjøttet, andre vil gi gale resultater i nærvær av eggehvite og endelig har en av og til den rent tekniske fordel å få en mindre intens skumming når analysen også medfører oppvarming og kokning.

Framstilling av serum av farse.

50 g fiskefarse tilsettes 135 ml destillert vann i en veiet kolbe og varmes opp i vannbad til 60° C. Der tilsettes 15 ml kolloidalt jernhydroksyd (forvarmet til ca. 60° C) og varmes videre til 70° C. Denne temperatur holdes i 5 minutter, hvoretter kolben etter rysting avkjøles til 20° C. Under veining tilsettes den fordampete vannmengde så oppslemmingen veier 200 g. Der filtreres og filtratet inneholder nå de vannoppløselige stoffer, ekstraktstoffene i samme forhold som i fiskefarsen. Ved serieanalyser korrigeres ikke for fordampet vann, da mengden er ganske liten (under 0,5%).

Framstilling av serum av vannekstrakt.

270 g fiskefarse tilsettes 730 ml vann og ekstraheres under avbrutt rysting i 1 time ved 20° C. Der filtreres og 250 ml filtrat varmes opp i en veiet kolbe i vannbad til 60° C. Der tilsettes 20 ml jernhydroksyd og varmes videre til 70° som holdes i 5 minutter. Der avkjøles og korrigeres til totalvekt 270 g. Der filtreres og filtratet inneholder no ekstraktstoffene i samme forhold som vannekstraktet og fiskefarsen.

Disse sera er helt klare, og enten fargeløse eller svakt gule etter fiskesorten.

Dialysater.

Vi har prøvd dialysater i noen tilfeller, men ikke gjort nærmere undersøkelser over framstillingen av dem eller anvendeligheten av dem. Da vi imidlertid har brukt dem for visse øyemed som omtales i del 2 av dette arbeid, skal vi beskrive framstillingen av dem slik som vi har utført dem. Hensikten med dem er å skille høymolekylære og lavmolekylære stoffer fra hinannen, således her å skille eggehvitestoffene fra ekstraktstoffene. Man oppnår sannsynligvis oppløsninger av sammen-setning som jernsera.

Vannekstrakter framstillet av ønsket forhold mellom fiskefarse og vann pipetteres over i Schleicher og Schülls dialysehylser eller i kolloodiumhylser en selv framstiller i laboratoriet, som tilsettes et egnet desinfeksjonsmiddel og stilles i begerglass med samme volum vann ved en temperatur like over 0°. Dialyselikevekt synes å være inntrådt etter 20 timer. Da noe vann trenger inn i hylsen på grunn av osmose, må volumet i begerglasset måles og tas hensyn til under beregningen. Dialysen ble også utført ved vanlig temperatur under tilsetning av egnet desinfeksjonsmiddel.

Prøvetagning for bakteriologiske undersøkelser.

Forskjellige spørsmål melder seg når man skal bestemme bakterier fra fisk. Det gjelder prøvetakningen, substratets sammensetning og dyrkningstemperaturen for å nevne de viktigste.

Av et tidligere kapitel framgår at bakteriene er lokalisert til bestemte organer på den levende fisk. Således framkommer der alltid bakterier på gjeller og i slimlaget på skinnen, mens fordøyelseskanalen kan være steril i likhet med hva blod og muskulatur alltid er. Når fisken sløyes, øker dens overflate mot luften og fra å være steril blir den nye overflate snart like infisert som den tidligere overflate er. Etterhånden vandrer et utvalg av disse bakterier gjennom hud og hinner og muskulaturen anrikes av dem. Da der i muskulaturen ikke hersker samme surstofftrykk som i luften, får vi en spesifikk flora som blant annet består av fakultativt anaerobe arter. Når surstoffet blir oppbrukt, kan de obligate anaerobe arter utvikle seg.

Når vi skal prøveta materiale fra fisk for bakteriologiske øyemed, må vi ta hensyn til fiskens bakteriologiske tilstand. Vi kan dyrke aerobe, fakultative anaerobe eller obligate anaerobe fra den, og det blir i så tilfelle muskulaturen, gjellene og skinnen som er sete for de bakterier vi vil ha.

På helt fersk aseptisk behandlet fisk er det kun aerobe bakterier som har interesse og deres voksesteder er skinnen og den åpnete bukhule.

Etter noen tids lagring har de fakultativt anaerobe arter vandret gjennom skinnet og utvikler seg her hvor surstoffet forekommer i mindre mengde. De vandrer innover gjennom muskelen fra skinnet og buk-hulen av og i muskulaturen foregår no bakterielle omsetninger som først og fremst går ut på spaltning av trimetylaminoksyd.

Herunder forbrukes surstoff av aerobe arter, som også har vandret gjennom skinnet og skaper vekstbetingelser for de obligate anaerobes som er bevegelige og som no befinner seg inne i muskulaturen.

Vi kan for oversiktens skyld inndele fiskens mikrobeflora på følgende måte, vist i tabellen på side 52.

Når vi bestemmer de *aerobe* bakterier i overflaten finner vi et tall som varierer med fiskeplassen, årstiden osv., og vi vil finne at dette tallet øker når fisken lagres, for etter en tid å nå opp i en konstant verdi.

Hvis vi bestemmer bakteriene ved *aerobe* metoder i fiskemuskelens, vil vi i «levende» fisk få negativt resultat. Først etter noen dagers lagring kan vi påvise bakterier her og så tiltar antallet for å gro hurtigst etter det 10.—11. døgn.

Hvis vi bestemmer bakteriene ved *anaerobe* metoder i fiskemuskelens, vil vi også i levende fisk få et negativt resultat. Først etter det 10. døgn kan vi påvise anaerobes her, som så begynner å gro raskt.

Av interesse for prøvetakningen er derfor: vi kan utføre bestemmelsene som eksterne eller interne bestemmelser. Prøven taes i overflaten eller av muskelen fra hvem overflateskiktet er fjernet på steril måte.

De eksterne prøver dyrkes aerobt, mens de interne prøver bør dyrkes aerobt, halvaerobt og anaerobt.

Vi får derfor egentlig 4 bestemmelser som burde utføres, nemlig:

1. av bakterieantallet pr. cm² av fiskens overflate,
 2. av antallet av aerobe bakterier som vandrer inn i muskelen,
 3. av antallet av trimetylaminospaltende arter og
 4. av antallet av de arter som ikke tåler surstoff.
- ad 1. dyrkes i luft ved 20° C på vanlig agar,
» 2. dyrkes i luft ved 20° C på vanlig agar,
» 3. dyrkes i delvis evakuerte skåler ved 20 ° C på et agarsubstrat tilsatt trimetylaminoksyd. Kolonier av forskjellig utseende undersøkes på sin evne til å spalte trimetylaminoksyd.
» 4. dyrkes i luftfritt rom ved 37° C på et agarsubstrat tilsatt for eksempel melkesukker.

I stedet for kjøtttekstrakt har vi som regel brukt et ekstrakt av fisk og til substratet, foruten springvann, også satt sjøvann.

Surstoff-krav	Forekomst	Når utvikling skjer	Spalter	Dannes
Positivt. Aerobe, krever elementært surstoff.	Skinnet og gjellene av »levende« fisk og markedsfisk.	Under første stadium av lagring.	Kullhydrater. Eggehvite-stoffer. Aminosyrer.	NH_3
Positivt. Fakultative anaerobe krever kjemisk bundet surstoff, eller lave konsentrasjoner av elementært surstoff. Hittil er påvist trimetylaminoksyd spaltende arter.	Skin og gjeller av fersk markedsfisk, muskulatur av lagret markedsfisk.	Fra mellomste stadium av lagringen.	Trimetylaminoksyd.	$(\text{CH}_3)_3\text{N}$
Negativt. Obligate anaerobe, krever kjemisk bundet surstoff.	Skin og gjeller av fersk markedsfisk, muskulatur av lagret markedsfisk.	Under siste stadium av lagringen.	Eggehvite-stoffer.	NH_3 , aminer H_2S , indol osv.

Det er innlysende at det å skulle utføre ikke mindre enn 4 forskjellige bakteriologiske analyser for hver enkelt prøve krever megen arbeidshjelp og meget glassutstyr.

Da våre analyser som refereres senere ble utført, måtte man derfor forsøke å finne en forenkling av metodikken. Den gikk ut på å dyrke bare de aerobe arter, og prøven ble tatt av en farse som var malt av hele fisken. Dette kunde gjøres da forsøksfiskene var forholdsvis små (1—2 kg).

Vi nevner at metoden er beheftet med visse feil. Således setter fiskeskinnet, som jo er setet for langt de fleste bakterier, seg fast i kniven på kjøttkvernen og kommer ikke med i farsen. For å bøte på denne feil, ble farsen sendt 3—4 ganger gjennom kvernen, idet skinnet ble løsnet og sendt med på nytt. Derved skulde oppnåes at farsen tok med seg mest mulig av bakteriene fra skinnet, da den jo måtte passere dette før den rant ut av kvernen.

Dessuten er faren for luftinfeksjon større ved denne metoden enn ved andre, da det tar atskillig tid å male prøven så mange ganger. For å komme over et større antall prøver om gangen, trenger man mange kjøttkverner, da hver kvern må vaskes og steriliseres mellom hver prøve.

Prøvetakning i fiskens overflate er langt raskere å utføre og tillater samtidig undersøkelser av mange prøver.

Den vesentligste ulempe ved metoden synes å være den at lagret fisk som ikke lenger har jevnt overtrekk av slim, må vise kimtall som avhenger av hvor på overflaten prøven er tatt.

Overflateprøver har vært anvendt av de fleste som har drevet slike undersøkelser, således av LÜCKE og SCHWARTZ (1937), SCHWARTZ og ZEISER (1939), SHEWAN (1937), STEWART (1932), NOTEVARP og HJORTH-HANSEN (1933) og av HAYNES (1937). HAYNES beskriver metodikken og angir at der bør tas gjennomsnitt av flere prøver for å trykke de eksperimentelle feil mot et minimum.

Metodikk for lagringsforsøk.

Ved lagringsforsøk med fisk ved 0° C har vi gått fram på forskjellige måter som skal omtales nærmere. Felles for dem alle er imidlertid den behandling fisken får når den blir brakt til laboratoriet. Den kommer hit i sløyet eller usløyet tilstand, og i siste fall blir den straks sløyet etter å være drept ved nakkeslag og bløgget. Hodet beholdes, mens gjellene gjerne fjernes. Den vaskes fri for blod i rinnende springvann og legges derpå over i en balje med springvann tilsatt rikelig med

isstykker. Dette blir gjort for at alle fisk skal få en såvidt mulig ens behandling før lagringen og for om mulig å bibringe den en ens og om mulig jevnt fordelt bakterieflora. Denne består no av fiskens primære (opprinnelige) overflateflora og dens sekundære flora som dels skriver seg fra alt den har vært i berøring med dels fra isvannet den ligger i tilslutt.

Fisken røres om av og til med en stokk og etter $\frac{1}{2}$ —1 times opphold i isvannet blir den tatt opp og får renne av seg på et brett. Den gjennomgår deretter en av følgende behandlingsmåter.

1. Fisken legges i is.
2. Fisken legges på bretter i kjølerom ved 0° C.
3. Fisken henges fritt i kjølerom ved 0° C.
4. Fisken pakkes enkeltvis inn i pergamynpapir og legges i is eller på bretter i kjølerom.
5. Fisken fileres og lagres som filet innpakket i pergamynpapir.
6. Fisken fileres, filetene males på steril kvern og av farsen innveies prøver á 100 gr, som bringes over i sterile literkolber som stilles i kjølerom ved 0° C.
7. Der framstilles pressaft av filetene. Saften oppbevares på steriliserte kolber i kjølerom ved 0° C.

Da ledestoffene ikke forekommer i nøyaktig samme mengde i de forskjellige fisk i et fiskeparti kan en ikke ved analyse av en enkelt fisk få et pålitelig uttrykk for hele partiets godhet. Hvor store variasjonene er, har en ikke noen oversikt over enno, men en kommer tilbake hertil i et senere arbeid som omfatter en statistisk undersøkelse over flyktige baser i fiskemuskulatur. Av amerikanske undersøkelser over hyse framgår imidlertid at gjennomsnittsprøver framstillet av 5—6 fisk gir representative resultater (STANSBY og LEMON 1933).

Når en oppbevarer fisken som farse, oppnår en den store fordel å få en god gjennomsnittsprøve å arbeide med (i enno høyere grad gjelder dette naturligvis pressaften eller et vannekstrakt), men i alle disse tilstandsformer foreligger jo fisken på en sånn måte at bakterieveksten må bli forskjellig fra den som vilde ha funnet sted på den hele fisk. Visse bakteriearter vil begunstiges, andre skades.

Øvrige metoder.

De øvrige metoder har vi anvendt som de er angitt i litteraturen uten nærmere å undersøke metodikken.

Analysemetoder.

Farse av mager fisk.

Tørrstoff. 10 g innveies i en jenaglasskål av kjent vekt. Prøven stilles i tørreskap ved ca. 60° C i 1½—2 timer, deretter økes temperaturen til 105°—110° C, hvor prøven får stå i 4 timer. Den tørker ubetydelig ved lenger henstand. Prøven avkjøles i eksikator og veies. Der utføres paralleller.

Total N. 2 g oppsluttes etter A. C. ANDERSEN og NORMAN JENSENS eller etter SARUDIS (v. Stetina) metode (se ekstrakter etc.).

Ekstrakter, pressaffer, sera og dialysater.

Tørrstoff. 2—10 ml pipetteres over i aluminiumskåler, jenaglasskåler eller rustfri stålskåler (f. eks. med angitt vekt 10,000 g fra Microessentials Lab. Roch. N. Y. U. S. A.), som stilles ved 60° C i 1 time og seinere ved 105—110° C i 4—5 timer. Veies etter avkjøling i eksikator.

Total N. 1. 2—10 ml pipetteres over i 50 ml kjeldahlkolber og oppsluttes etter en modifikasjon av LEVYS (1936) mikrometode. For semi-mikrobestemmelser av total N går vi fram slik:

2,5 g rent selen tilsettes i en kjeldahlkolbe 80 ml konc. svovelsyre og 25 g kaliumsulfat p. a. Den varmes opp og kokes til smelten blir fargeløs. Før smelten blir kald og krystalliserer, heldes den forsiktig ned i ca. 240 ml dest. vann. Etter avkjøling krystalliserer intet ut etter slik fortykning. Til 5 ml ekstrakt eller 2 ml pressaft pipetteres 2 ml oppslutningsveske i en 50 ml kjeldahlkolbe eller stort reagensrør og der varmes forsiktig til vannet er dampet bort. Residuet blir da svart. Flammen økes, hvoretter innholdet blir fargeløst på noen minutter. Fra da av kokes videre i 10 minutter hvoretter ammoniakken frigjøres og destilleres over i et forlag med kjent mengde svovelsyre. Ved denne modifikasjon kan analyser og blindprøver utføres med stor presisjon.

2. 5—20 ml pipetteres over i 250 ml kjeldahlkolber og oppsluttes som angitt av SARUDI (v. Stetina) (1941). Vi går fram slik: Der tilsettes 5 ml konsentrert svovelsyre og varmes litt opp til blandingen er homogen. Da tilsettes 2 ml 30 g/100 g vannstoffperoksyd, som, hvis kolbeinnholdet ikke er altfor varmt, reagerer forholdsvis mildt med dette. Innholdet blir straks helt vannklart og fargeløst. Vannet kokes bort og oppløsningen antar no en brun farge. Der tilsettes på ny 2 ml vannstoffperoksyd og oppløsningen blir igjen fargeløs. Dette gjentas inntil oppløsningen etter 5 minutters kokning forblir fargeløs. Som regel klarer det seg med 3—5 tilsetninger av oksydasjonsmidlet og hele

oppslutningen gjennomføres som regel uten vanskelighet på ca. 15—20 minutter. Kolbeinnholdet tilsettes vann og bringes over i destillasjonskolbe hvor der tilsettes noen dråper thymolblått og 40 g/100g karbonatfri natronlut til omslag. Ammoniakken bestemmes på vanlig måte. Framgangsmåten er den samme ved fiskefarse, også av fete fisk, dog bør en her bruke noe mer vannstoffperoksyd.

Aminosyrer.

Der gåes fram vesentlig etter SØRENSENS formolmetode. 20 ml serum tilsettes 20 dråper fenolftalein (1 g/100 g) og titreres med 0,1 n natronlut til rosafarge. Det er hensiktsmessig å innstille en prøve av samme elektrometrisk til $\text{pH} = 8,5$ og bruke den til fargesammenlikning. Forbruket noteres. Der tilsettes 10 ml nøytralisert formol, hvorved oppløsningen avfarges. Der tilsettes 1 dråpe fenolftalein for hver ml ialt tilsatt lut + formol og titreres til samme farge som sammenlikningsprøven etterat denne også er tilsatt samme mengde indikator og samme totale fortynningsmengde med dest. vann. Dette forbruk omregnes på *aminosyre + ammoniakk-kvelstoff*.

Totale flyktige baser.

Totale flyktige kvelstoffbaser er summen av ammoniakk og mono-, di- og trimetylamin samt andre aminer som dog forekommer i mengder vi ikke behøver å regne med i denne forbindelse.

Totale flyktige kvelstoffbaser *kan* bestemmes ved destillasjon av fiskefarse, men det er dels av teoretiske, dels av praktiske grunner å foretrekke å destillere dem av et vannekstrakt eller aller helst av et serum.

1. *Vanlig metode.*

200 ml ekstrakt eller serum tilsettes 1 g magnesia (frisk brent) og basene destilleres i løpet av 50 min. etterat innholdet i destillasjonskolben koker, over i kjent mengde svovelsyre. Forbrukt svovelsyre omregnes på N.

2. *Vacuummetode.*

Da eggehvitestoffer i ekstraktet (og visstnok noen aminosyrer) delvis spaltes til flyktig N under destillasjonen, kan man nedsette graden av denne spaltning til et minimum ved å foreta ovennevnte destillasjon i vacuum ved et trykk av ca. 20—30 mm og en temperatur av høyest 50° C.

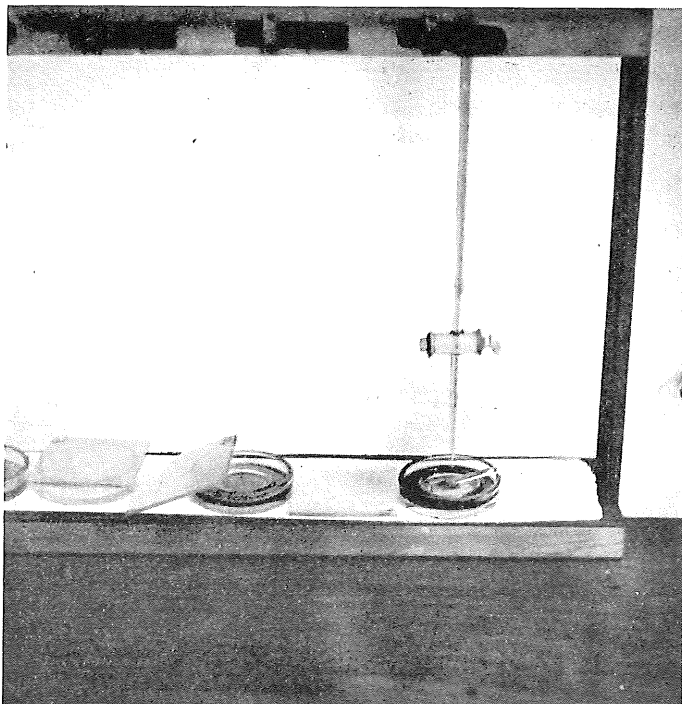


Fig. 1. Conway og Byrne skåler.

3. Absorpsjonsmetode etter Conway og Byrne.

Denne metode er særlig skånsom da den foregår ved vanlig temperatur.

1—2 ml av et vannekstrakt, serum eller dialysat pipetteres over i en Conway og Byrne-skål, se fig. 1, i det ytre rom. 1—2 ml $n/20$ — $n/70$ saltsyre eller svovelsyre tappes av en mikrobyrette i det indre rom. Glasslokket, som er påsmurt en ring med vaselin, legges på plass og skyves tilside så man kan pipettere til det ytre rom 1 ml konc. potaskeoppløsning. Lokket skyves straks på plass og skålen beveges meget forsiktig idet innholdet i det ytre rom blandes godt. Skålen får en henstand ved 37° C på ca. 2 timer. Lokket taes av, der tilsettes forlaget 1 dråpe bromkresolgrønt, 1 dråpe metylrødt eller 1 dråpe av en blanding av metylrødt og metylenblått (Tashiros indikator) hvorpå ubundet syre titreres med $n/20$ — $n/70$ natronlut. Differansen mellom forbruket ved blindprøven og forbruket ved retitreringen omregnes på N. Conway og Byrnes metode kan ikke brukes ved farse.

Trimetylammin.

Ved tilsetning av formol til en oppløsning eller en oppslemming som inneholder ammoniakk og metylbasene, reagerer formolen med ammoniakken og monometylammin 100 % til ikke flyktige forbindelser som er stabile under kokning i nærvær av brent magnesia. Dimetylammin reagerer tilsvarende ca. 50 % med formol.

1. *Vanlig metode.*

Som ved totale flyktige kvelstoffbaser, men med tilsetning av 40 ml formol i destillasjonskolben.

2. *Vacuummetode.*

Som ved totale flyktige kvelstoffbaser, men med tilsetning av 20 ml formol i destillasjonskolben.

3. *Absorpsjonsmetode etter Conway og Byrne.*

Som ved totale flyktige kvelstoffbaser, men etter pipetteringen av ekstraktet, pipetteres også 1 ml nøytral formol ned i det ytre rom.

Differansen mellom forbruket ved blindprøven og forbruket ved analysen omregnes på N. Dette N kaller vi *trimetylammin N* og det N vi får når vi subtraherer trimetylammin N fra total flyktig N kaller vi *ammoniakk N*. Mengden av monometylammin N er alltid meget liten og som regel forekommer også dimetylammin N i små mengder sammenlignet med mengden av ammoniakk- og trimetylammin N.

Bestemmelser av dimetylammin N har vi enno ikke foretatt, men Shewan (1937) angir å ha funnet et samsvar mellom aerobt bakterietall og mengden av dette N.

Indol.

Vi har ved bestemmelse av indol meget nær fulgt CLOUGHS (1923) anvisninger og brukt et vanddampdestillasjons-apparat som vises på fig. 2. I den dobbelt tubulerte 2 liters kolbe innveies 200 g fersk eller 100 g bedervet fiskefarse og tilsettes 200 ml kaldt vann. Der innledes vanddamp og vannbadet som kolben står i, holdes kokende. Der destilleres i alt 500 ml over. Man er ofte utsatt for en ubehagelig skumming. Man er antakelig avskåret fra å kunne framstille et vannekstrakt eller

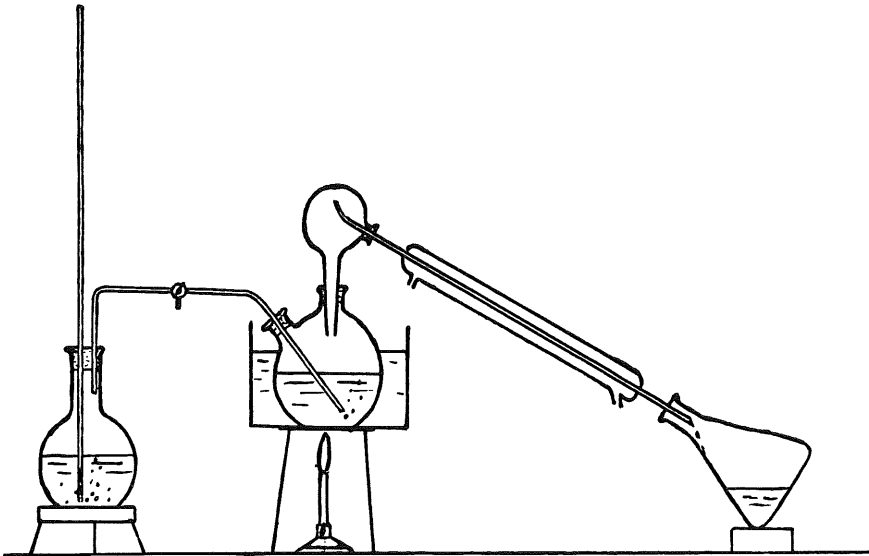


Fig. 2. Indoldestillasjon.

serum til dette bruk, da indol er for lite oppløselig i vann ved vanlig temperatur. Destillatet ekstraheres med 120 ml ren eter i en rystekolbe under tilsetning av 10 ml ren konc. saltsyre 1 gang. Etter henstand fjernes vannskiktet og eterskiktet vaskes 2 ganger med 20 ml natronlut 2,5 g/100 g og tilslutt med 20 ml 5 g/100 g saltsyre. Eterskiktet heldes ned i en liten destillasjonskolbe og tilsettes 5 ml vann, hvorefter eteren destilleres forsiktig av på vannbad hvis temperatur ikke overstiger 35° C.

Innholdet i kolben blir så kolorimetrert, hvortil trengs følgende reagenser:

1. Ren kloroform,
2. Ren saltsyre, ca. 9 normal,
3. p-dimetylaminobenzaldehyd, 2 g/100 ml ren alkohol.

Først framstilles en sammenlikningsskala eller en enkelt sammenlikningsprøve med 1 mg indol pr. liter, idet man sammenlikner i et kolorimeter. Skalaen eller prøven er bare holdbare i noen få dager og bør lages friske i et hvert fall hver 4. dag.

4. Standoppløsning av indol.
20 mg rent indol løses i 100 ml ren alkohol (meget holdbar oppløsning).
5 ml av denne oppløsning = 1 mg indol.

25 ml av destillatet tilsettes i en kolbe 2,5 ml av oppløsning 3 og 5 ml av oppløsning 2. Der rystes kraftig, kolben stikkes ned i et kokende vannbad i 20 sek., avkjøles under springen og stikkes ned i et isbad. Derpå tilsettes 5 ml kloroform og rystes.

Kloroformen farges ikke, blir gul, svakt rosa, sterkere rosa eller rød alt etter innholdet av indol.

Sammenlikningsskalaen kan man lage av 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 og 20 ml av oppløsning 4, idet alle fortynnes til 25 ml. med dest. vann, og ellers får samme tilsetninger som prøvene. Skalaen tilsvarer da 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,5, 2, 3 og 4 mikrogram ($1 \mu\text{g} = 10^{-6} \text{ g} = 10^{-3} \text{ mg}$) indol.

Ved høyere indoltall må man enten pipettere ut mindre mengde av destillatet eller innveie mindre mengde farse.

Metylenblåttavfarging.

40 ml vannekstrakt (250 g farse + 750 g vann) fylles i et reduktaserør med merke for 40 ml og tilsettes 1 ml av BARTHEL og ORLA JENSENS metylenblåttoppløsning (1 tablett fra Blauenfeldt og Tvede, Kjøbenhavn, oppløst i 200 ml dest. utkøkt vann). Røret lukkes med et $\frac{1}{2}$ cm tykt lag av flytende sterilisert parafin og stilles i et vannbad av 40° C. Rørene sees over fra tid til annen.

Bestemmelse av aerobe bakteriekolonier.

1. *Muskulaturen.* Et stykke fiskemuskel skjæres ut sterilt ved hjelp av en skarp kniv, etter at skinnet er skrapet, vasket med vann og alkohol og alkoholen avbrent. Muskelstykket males på sterilisert kjøttkvern eller mases i steril morter. Der innveies 1—5 g som bringes over i 99—95 ml sterilt springvann og rystes kraftig i noen tid. Med sterile pipetter (1 ml) fortynnes til kulturrør med 9 ml sterilt vann. Fra disse fortynnes videre til nye kulturrør med 9 ml sterilt vann det nødvendige antall ganger (6—7 fortynninger).

1 ml fra hver av disse fortynninger pipetteres sterilt over i kulturrør med smeltet agarsubstrat. Der blandes godt og innholdet heldes over i sterile Esmarck skåler (9 cm). Skålene oppbevares ved 20° og 37° i 4 døgn, hvoretter koloniene telles. Antall kolonier omregnes på 1 g fiskemuskulatur.

2. *Overflaten.* Med et skarpslepet korkbor av kjent diameter og sterilisert ved flambering stanses ut et stykke av huden som skjæres løs i den tykkelse som ønskes ved hjelp av en meget skarp kniv. Det runde hudstykke bringes straks over i 50 eller 100 ml sterilt

vann eller saltvann (0,5 g i 100) og rystes kraftig. Videre arbeides etter 1.

Antall kolonier omregnes på 1 cm² overflate.

3. *Hele fisken eller del av samme med skinnet på.* Den sløyete fisk eller fileten med skinnet på males på steril kjøttkvern. Farsen blandes godt og der innveies 1—5 g som bringes over i kolber med 99—95 ml sterilt vann eller fortynnet koksaltoppløsning eller sjøvann fortynnet med dest. vann (1 del + 5 deler). Den videre framgangsmåte er beskrevet under 1. Antall kolonier omregnes på 1 g fisk.

Dyrkningssubstrater.

Vi har brukt forskjellige agarsubstrater uten at vi på det nåværende tidspunkt kan si sikkert hvilket som er å foretrekke. På forhånd skulde man anta at bakterier på fisk burde dyrkes på substrater som inneholdt ekstrakt eller serum av fisk og dessuten sjøvann. Vi har brukt følgende tre substrater, hvorav det første er alminnelig buljongagar med fosfat.

Substrat 1.

Liebig kjøttekstrakt ..	3 g
Pepton Witte	5 »
K ₂ HPO ₄	2 »
Koksalt	5 »
Springvann	q. s.
Agar	15 »
pH	7
Totalvolum	1000 ml

Substrat 2.

Fiskeekstrakt av 500 g fisk	
Pepton Witte	5 g
K ₂ HPO ₄	2 »
Sjøvann	200 ml
Springvann.....	q. s.
Agar	15 »
pH	7
Totalvolum	1000 ml

Substrat 3.

Fiskeekstrakt av 500 g fisk	
Pepton Witte	5 g
Glycerin	8 ml
K ₂ HPO ₄	2 g
Sjøvann	200 ml
Springvann.....	q. s.
Agar	15 g
pH	7
Totalvolum	1000 ml

Præliminære undersøkelser.

Bidrag til metodikken.

Når en står overfor å skulle utføre analyser på et nytt undersøkelsesfelt, kan en ikke alltid uten videre overføre metoder fra andre felter. Metodene må ofte tilpasses så de blir adekvate, men det er også av betydning at de er raske og enkle å utføre og medfører bruk av kjemikalier som faller billig i anskaffelse.

Hva angår analysemetodikken for kjemiske og mikro-biologiske undersøkelser av fisk og dens forandringer under lagring, later den nok atskillig tilbake å ønske. Det er ytterst få som har ofret studiet av selve grunnlaget for slike undersøkelser særlig oppmerksomhet, hvorfor en i litteraturen finner angitt de forskjelligste metoder for en og samme undersøkelse. At de forskjellige forskere kommer til motstridende konklusjoner blir derfor forståelig.

Vi har, sålangt tiden har tillatt det, undersøkt metodikken ved prøvetakningen og analysene og skal i det følgende meddele resultatene herav.

1. *Volum av fiskefarse tilsatt vann.*

Ved blanding av samme mengde vann med stigende mengde fiskefarse av mager, *nydrept* fisk som torsk, hyse, sei og lyr får en suspensjoner hvis volum meget nær er identisk med summen av vann- og farsevektene. Ved målinger fant vi således:

Tabell 1.

Vekt av farse g	Vekt av vann g	Totalvolum ml
5	200	205
10	200	210
25	200	225
50	200	250
100	200	300

Dette gjelder som nevnt for nydrept mager fisk, og må ikke generaliseres, således stemmer det ikke for fiskemel.

2. *Framstilling av sera.*

Et serum kan framstilles ved hjelp av eggehvite-feldningsmidler, som det finnes mange av. De fleste av dem blir igjen i serumet etter at noe av dem har forbundet seg med egghviten. Et av dem, kolloidalt

jernhydroksyd, har den behagelige egenskap foruten å koagulere eggehvitestoffene, selv å koagulere kvantitativt. Derved kommer serumet til å bestå bare av nettopp de stoffer i fiskekjøttet som vi vil underkaste en nærmere undersøkelse.

RONA og MICHAELIS (1907) fant at det kolloidale jernhydroksyd (Liquor Ferri oxydati dialysati, 5% Fe_2O_3) var et utmerket eggehvitefeldningsmiddel ved sukkeranalyser av blod, da det ikke absorberte druesukkeret.

TILLMANS, HIRSCH og KUHN (1927) brukte jernhydroksydet ved framstilling av sera av muskulatur, særlig av husdyrkjøtt. De angir en framgangsmåte, som vi dog ikke har funnet fullt så anvendelig ved fiskekjøtt. De vasker nemlig ut det uoppløselige i fiskekjøttet på filter før serumet framstilles. Vår erfaring er at en slik utvaskning tar lang tid og her gjelder det jo å arbeide raskt da fiskekjøttet langt lettere ødelegges enn husdyrkjøtt. Vi har funnet det forsvarlig og nyttig å øke konsentrasjonsforholdet til 1 : 4. TILLMANS og medarb. bruker forholdet 1 : 10. Den av dem anvendte mengde feldningsmiddel, 100 ml 5% Fe_2O_3 på 110 g farse, synes oss noe høy for fiskefarse, da vi gjentatte ganger, selv med halve mengden, har oppnådd et serum som har vært sterkt brunfarget av ikke koagulert feldningsmiddel.

For å finne den rette tilsetningsmengde pr. 100 g fiskemuskulatur, gikk vi fram på følgende måte: 600 g fersk farse av torsk og av sei ble tilsatt 1400 ml destillert vann og rystet av og til i løpet av en time. Suspensjonen ble filtrert gjennom filterpapir Schl. & Schüll nr. 597. Av ekstraktet (filtratet) ble innveiet 5 porsjoner á 200 g i Erlenmeyerkolber på 300 ml. Kolbene ble stillet i vannbad og oppvarmet til 60° C og tilsatt stigende mengder kolloidalt jernhydroksyd. Total volum var i alle tilfeller 250 ml. Oppvarmingen fortsattes til 70° C og kolbene fikk stå ved denne temperatur i 5 minutter. Innholdet ble avkjølt til værelsestemperatur og filtrert. Under alle disse operasjoner fordamper ca. 1 ml vann. Vi fant det her unødvendig å korrigere for dette lille tap og har derfor ikke gjort det.

I filtratene ble bestemt tørrstoff, total N og aminosyrer etter SØRENSENS formolmetode.

Det synes å framgå av tabell 2 at ca. 20—30 ml kolloidalt jernhydroksyd pr. 100 g farse er tilstrekkelig til å felle eggehvitestoffene i torsk totalt. Ved seiefarse kan tilsettes litt mer. Nærvær av litt eggehvite har lite å si for aminosyrebestemmelsen, men den kan ikke utføres i ekstraktet.

Det skulde kanskje være unødvendig å påpeke ytterligere betydningen av å bruke tilstrekkelig av fellningsmidlet. Tabell 3 viser imidlertid resultatet av å bruke dette i underskudd. Ved 150 g

Tabell 2.

Tørrstoff, total N og aminosyrer i jernsera. 300 g farse i 1000 ml. 200 ml fort. til 250 ml ved serum. Analyser i 20 ml.

Tilsatt kolloid ml	Tørrstoff			Total N			Aminosyre N	
	Torsk	Torsk	Sei	Torsk	Torsk	Sei	Torsk	Sei
	mg i 20 ml serum							
0	275,8	304,0	392,7	35,8	40,8	44,7		7,2
2		202,0					3,0	
3	185,5			21,5				
5	183,8	194,0	259,5	21,6			2,6	5,5
10	178,0	175,6	256,1	21,4	21,6		2,4	
15		168,7			21,8		2,4	5,4
17,5	176,0			21,2				
20		174,9	252,8		21,9	24,3	2,4	5,4
30	*245,8	*179,0	248,0	*24,8			2,4	5,4
40	Sterk brunfarget			Sterk brunfarget.				
50	—»—			—»—				

* Ufullstendig koagulasjon (litt brunfarget).

er der brukt nok, ved 350 g og 550 g samme mengde som ved 150 g. På grunnlag av at serumtørrstoffet og aminosyremengden ved 150 g er korrekt, kan beregnes størrelsen av dem ved 350 g og 550 g. For aminosyrene finner vi som i forrige serie at nærvær av litt eggehvite spiller meget liten rolle.

Tabell 3.

Sera av sei. Farsetørrstoff 21,1 g/100 g. Total N 2,90 g/100 g.

Innveid farse	Tørrstoff i serum		Aminosyrer i serum		Tilsatt Fe(OH) ₃
	Funnet	Beregnet	Funnet	Beregnet	
	mg i 20 ml		mg i 20 ml		
150	93,5		2,4		37,5
350	231,0	210	5,5	5,6	37,5
550	393,0	312	8,9	8,8	37,5

For tørrstoffet finner vi derimot at det øker når mengden av fellingsmiddel forholdsvis avtar.

Endelig er der utført en serie som viser at en får samme resultat ved analyse av serum enten det framstilles av 100 eller 350 g, mens så meget som 600 g farse i totalvolum 1000 ml gir litt lavere resultater når der ved framstillingen anvendes proporsjonale mengder av det kolloidale fellingsmiddel.

Tabell 4

Sera av torsk. 200 ml ekstrakt. Til serum 25 ml $\text{Fe}(\text{OH})_3/100\text{g}$.

Fortynningsgrad	Total N		Tørrstoff	
	Funnet	Beregnet	Funnet	Beregnet
	mg i 20 ml		mg i 20 ml	
10	7,0		66,2	
2,8	24,9	24,5	232,4	231,7
1,7	40,5	42,0	370,0	397,2

I et serum kan altså de vannoppløselige ekstraktstoffer som ikke har proteinnatur, gjenfinnes kvantitativt mellom visse grenser som oppad nærmest fastsettes av bekvemmeligheten ved framstillingen av ekstraktet og nedad ved det at analysen utføres med avtakende nøyaktighet ved små innveininger. Det er ubekvem å blande for eksempel 500 g farse med 500 ml vann, men under 100 g bør en ikke gå. Vi har derfor gått over til å veie inn mellom 200—400 g ved våre analyser og bruker for det meste 250 g (fortynningsgrad 4).

Blandingsforholdets innflytelse på tørrstoffinnholdet og total N innholdet i vannekstraktene.

En del orienterende undersøkelser viste at ekstraktene inneholdt forholdsvis mer tørrstoff når ekstraksjonen ble foretatt under tilsetning av lite vann. Torsk, sei og lyr farse ble ekstrahert med forskjellige mengder vann og ekstraktene ble så analysert m. h. p. tørrstoff. Dette er i tabellen omregnet på 100 g farse.

Tabell 5.

Innveid farse	Fortynningsgrad	Tørrstoff g/100 g farse				
		Ekstrakt			Serum Sei	Opl.protein Sei
		Torsk	Lyr	Sei		
48	20,8	5,42				
75	13,4			6,00	3,78	2,22
111	9	6,12				
125	8			6,48	3,82	2,66
150	6,7		5,46			
200	5	6,65				
250	4			6,88	3,84	3,04
300	3,3		6,00			
333	3	7,06				
400	2,5			8,06	3,87	4,19
500	2	7,45	6,56			
600	1,7			9,37	3,88	5,49
*1000	1			12,85		

* Pressaft.

Det framgår av tabellen at ekstrakttørrstoffet tiltar når fortynningsgraden avtar. Serumtørrstoffet holder seg meget nær konstant. Herav følger at den del av tørrstoffet som utgjøres av eggehvitestoffene i ekstraktet må tilta meget sterkt og i eksemplet med seiefarsen ser vi det mer enn fordobles under de givne omstendigheter, mens fortynningsgraden avtar fra 13,4 til 1,7. Myogen og myoalbumin er lettoppløselige i vann, mens oppløseligheten av globulin X og myosin er avhengig av jonestyrken som endrer seg proporsjonalt med farsekonsentrasjonen. Jo mer en derfor fortynner ekstraktet desto mer globulin X og myosin koagulerer der ut og tørrstoffet avtar og omvendt.

Da det er eggehvitestoffenes økete oppløselighet som medfører høyere tørrstoffinnhold i ekstraktene, må dette manifestere seg i øket total N i ekstraktene, konstant total N i de tilsvarende sera og dermed en kraftig økning i total N som skriver seg fra eggehvitestoffene. At så er tilfelle framgår av tabell 6.

Tabell 6.

Seiefarse. 2,95 g total N/100 g.

Fortynningsgrad	Total N Ekstrakt g/100g	Total N Serum g/100g	Vannoppløselig Protein N g/100g
13,4	0,769	0,417	0,352
8	0,825		(0,408)
4	0,884	0,417	0,467
2,5	1,020		(0,613)
1,7	1,240		(0,824)

Enten en arbeider med fortynningsgraden 4 eller 13,4 får en altså samme resultat for total N i serumet (se også tabell 4). Frå fortynningsgrad 13,4 til 1,7 øker total N som svarer til protein N i ekstraktene med godt og vel 130%.

Blandingsforholdets innflytelse på aminosyreinnholdet i sera.

Ikke-proteintørrstoffet og total N i dette kan bestemmes ved analyse av serumet og som det framgår av tidligere tabeller er det likegyldig innen visse grenser hvilken fortynningsgrad som anvendes. Det framgår også av DROZDOV, MINKOWSKAJA og DREILINGS undersøkelser (1941). En av komponentene i fiskemuskel-saften er aminosyre N som kan bestemmes for eksempel etter SØRENSENS formolmetode. Av tabell 2 framgår at dette N kan bestemmes i et serum uavhengig

av det kolloidale fellingsmiddels konsentrasjon, da nærvær av i et hvert fall inntil 80 mg eggehvite N i 20 ml ikke influerer på analyseresultatet. Tabell 7 viser at aminosyre N kan bestemmes i sera uavhengig av for-
tynningsgraden i det minste når denne ligger mellom 10 og 1,7.

Tabell 7.
Aminosyrer i sera.

Fortynnings- grad	Sei	Torsk	Torsk
	g/100g	g/100g	g/100g
20,8		0,103	
10			0,056
9		0,090	
6,7	0,056		
5		0,092	
3		0,091	
2,9	0,056		0,056
2		0,093	
1,8	0,057		
1,7			0,055

5. Totale flyktige N-baser, ammoniakk og trimetylamin.

a. Conway og Byrnes metodikk.

For undersøkelse av CONWAY og BYRNES metodikk ble en 1/50 normal ammoniumkloridoppløsning framstillet av tørket NH_4Cl p. a. og dest. vann. 1 ml ble pipettert over og tilsatt mettet pottaskeoppløsning i en rekke Conway og Byrnes skåler som stod i termostat ved 37°C . Fra tid til annen ble to og to skåler titrert.

Tabell 8.
CONWAY og BYRNES metode. Ammoniumklorid.

Henstand ved 37°	Bundet NH_3
min	%
5	43
10	84
20	88
40	91,5
60	98,3
90	99,2
120	100
150	100

En henstand av 2 timer ved 37° C er derfor tilstrekkelig ved rene oppløsninger.

Av en i 7 døgn lagret torsk ble framstillet farse og vannekstrakt (250 + 750) og serum. 2 ml ekstrakt ble pipettert over i Conway og Byrne skåler og totale flyktige N baser ble bestemt ved 37° C.

Tabell 9.

CONWAY og BYRNES metode. Torsk. Totale flyktige baser.

Henstand	Ekstrakt	Serum
timer	mg/100g	mg/100g
2	17,9	—
12	18,0	—
48	17,9	17,6

I samme farse ble også bestemt trimetylamin.

Tabell 10.

CONWAY og BYRNES metode. Torsk. Trimetylamin.

Henstand	Ekstrakt	Serum
timer	mg/100g	mg/100g
2	8,1	—
12	8,1	—
48	8,1	8,2

Herav framgår også at 2 timer er tilstrekkelig tid ved 37° og at analyseresultatene forblir de samme om man av en eller annen grunn ikke kan utføre dem før seinere.

Et par tilfeldig valgte analyser viser total flyktig N, ammoniakk-N og trimetylamin-N i en torsk som har vært lagret i 12 døgn ved 0° C.

Tabell 11.

Sammenlikning mellom ekstrakt og serum.

	Total flyktig N baser	Ammoniakk-N	Trime- tylamin-N
	mg/100g	mg/100g	mg/100g
Ekstrakt	33,3	12,2	21,1
Serum	32,7	11,9	20,8

Av tabell 11 framgår det at serumet viser et resultat som ligger ubetydelig under ekstraktets. Forskjellen spiller ingen rolle for slike undersøkelser som metoden her skal brukes til.

b. *Destillasjon ved vanlig trykk.*

100 ml n/50 ammoniumklorid-oppløsning ble pipettert over i kokekolber, som etter tilsetning av 0,5 g frisk brent magnesia og 150 ml dest. vann, ble forbundet med luftkjøler. I forlaget var 5 ml 0,038 normal svovelsyre.

Tabell 12.

Destillasjon ved vanlig trykk.

Koketid etter at væsken er i kok	Bundet NH ₃
min	%
0	1,9
10	77,8
20	95,2
30	97,5
40	100
50	100

En destillasjonstid på 45 minutter skulde derfor være tilstrekkelig.

Der ble framstillet farse av en torsk som var blitt lagret i 10 døgn ved 0° C. Av denne ble framstillet ekstrakt og serum i fortynningsgraden 5 (200 g farse + 800 ml dest. vann). Farse, ekstrakt og serum i ekvivalente mengder ble destillert i volumet 250 ml med tilsetning av 0,5 g MgO. I forlaget var en kjent mengde svovelsyre. Der ble retirert med 0,1 normal NaOH. I tabellen er angitt mg flyktig N i 100 g fiskefarse.

Tabell 13.

Seiemuskulatur. Totale flyktige baser. Destillasjon ved vanlig trykk.

Koketid etter at væsken er i kok	Farse	Ekstrakt	Serum
min	mg/100g	mg/100g	mg/100g
10	36,9	34,5	38,3
20	45,9	39,9	44,0
30	49,7	42,4	44,6
45	56,3	43,5	44,9
60	60,6	44,5	45,4
75	63,8	45,9	45,7

Mens farse og ekstrakt stadig gir høyere og høyere verdier, nærmer serumet seg etter ca. 30 minutters kokning mot en meget tilnærmet konstant verdi, som må ansees som den korrekte under de gitte forhold. Herav framgår at eggehviten i ekstrakt og farse hydrolyseres og avgir flyktig kvelstoff. I følge BOURY og SCHWINTES og en del egne undersøkelser avspaltes der lite eller intet trimetylamin N under denne hydrolyse ved sei- og torskemuskulatur. Vi vil komme tilbake hertil seinere og også til destillasjoner i vacuum.

Av tabell 12 kan vi utlede at flyktig N tiltar med ca. 28% fra koke-tid 45 minutter til 75 minutter ved farse, med ca. 8% ved ekstrakt og med 2,5% ved serum. Derfor kan analysen ikke foretas i nærvær av farse eller i ekstrakt da resultatene blir helt misvisende. I serum må der foreligge visse stoffer som i likhet med eggehviten spaltes og avgir flyktig N.

c. *Sammenlikning mellom destillasjon ved vanlig trykk og Conway og Byrne metoden.*

Av en sildefarse ble framstillet et serum hvori ble bestemt total flyktig N, ammoniakk N og trimetylamin N både ved destillasjon ved vanlig trykk og etter CONWAY og BYRNE.

Tabell 14.

Flyktig N i sild. Analysene er utført i serum.

Metode	Total N	Ammoniakk N	Trimetylamin N
	mg/100g	mg/100g	mg/100g
Destillasjon ved vanlig trykk	16,6	14,3	2,3
	16,5	14,6	1,9
	16,2	13,9	2,3
	16,2	13,9	2,3
Conway og Byrne	15,7	12,3	3,4
	15,7	12,3	3,4
	15,9	12,4	3,5
	15,9	12,2	3,6
	15,9	12,2	3,6

Begge metoder gir reproducerbare resultater, men CONWAY og BYRNE metoden gir svært høyt resultat for trimetylamin i forhold til den annen metode. Overenstemmelsen mellom metodene for total flyktig N er tilfredsstillende.

Av en seiefarse ble framstillet et serum hvori ble bestemt de samme stoffer som ved sildefarsen.

Tabell 15.

Flyktig N i sei. Analysene er utført i serum.

Metode	Total N	Ammoniakk N	Trimetylamen N
	mg N/100 g	mg N/100 g	mg N/100 g
Destillasjon ved vanlig trykk	51,6 } 51,7	42,6 } 42,7	9,0 } 9,0
	51,8 }	42,8 }	9,0 }
Conway og Byrne	51,2 } 51,2	42,0 } 42,3	9,2 } 8,9
	51,2 }	42,6 }	8,6 }

For sei gir begge metoder samme resultater. Reproduerbare tall får en enten en bruker den ene eller annen metode. Når en får høyere tall for trimetylamen ved sild kan dette tenkes å skrive seg fra at silda inneholder et eller flere stoffer i langt større konsentrasjon enn torsken, stoffer som under de givne forsøksbetingelser er istand til å avgi trimetylamen. Det har ikke vært mulig nærmere å undersøke dette ved dette høve, men en vil komme tilbake til det seinere. CONWAY og BYRNE metoden som setter en istand til å kunne utføre mange analyser på kort tid, har som regel kommet til anvendelse under de senere i arbeidet omtalte lagringsforsøk.

Bestemmelser i farse, pressaft, ekstrakt og serum av forskjellige kjemiske stoffer.

Der ble utført en rekke orienterende analyser av total N, tørrstoff, aminosyre-N og flyktige baser i forskjellige fiskesorter.

Tabell 16.

Tørrstoff i farse, pressaft, ekstrakt og serum.

Fisk	Innveining	Farse g/100g	Pressaft g/100ml	Ekstrakt g/100ml	Serum g/100ml
Torsk	250/1000	17,50	—	1,20	0,83
		18,70	8,3	1,36	—
		19,70	7,9	1,36	—
		20,00	—	1,55	0,84
		20,20	8,4	1,44	—
		21,35	—	1,68	0,70
		21,70	8,4	1,34	—
Kveite		22,35	—	1,47	—
		22,60	—	1,53	0,65
Sei	600/1000	20,70	12,9	1,70	0,98
		20,70	12,9	5,66	2,35
Rødspette	250/1000	20,20	—	1,04	—

a. *Tørrstoff.*

Tabell 16 viser tørrstoffinnholdet i alle fire former som fiske-muskulaturen var overført i. Forsøkfiskene var torsk, kveite, sei og flyndre. Sei utmerker seg ved et høyt tørrstoffinnhold i pressaft, ekstrakt og serum.

b. *Tørrstoff og total N.*

Tabell 17 viser tørrstoff i farse og ekstrakt og total N i ekstrakt av torsk, kveite, rødspette og hval med angivelse av alle parallellbestemmelser. 250 g farse ble oppslemmet i 750 ml dest. vann.

Tabell 17.

Tørrstoff og total N i ekstrakter.

Torsk	Tørrstoff farse	Ekstrakt tørrstoff i farse	Total N i ekstrakt tørrstoffet i farsen	Total N i ekstrakt tørrstoffet
	g/100 g	g/100 g	g/100 g	g/100 g
Torsk.....	17,5	5,0	0,693	
»	18,1	5,6	0,694	13,9
			0,814	
»	18,5	6,52	0,803	14,4
			0,806	
			1,052	
			1,059	
Kveite	22,6	5,84	1,069	16,3
			0,760	
			0,764	
			0,773	
»	22,6	5,88	0,771	13,1
			0,766	
			0,765	
			0,770	
Rødspette	20,2	4,16	0,769	13,0
			0,628	
			0,624	
Hval	29,0	10,64	1,510	15,0
(fettholdig)			1,490	13,9

Overensstemmelsen mellom parallellene er meget god. Interessant er å legge merke til at det relative innhold i ekstrakt tørrstoffet øker når tørrstoffet i fiskefarsen øker. Dette stemmer med tidligere iakttagelser (se side 66).

c. *Aminosyre-N*. (formoltitrerbar N ÷ ammoniakk-N).

NOTEVARP og HJORTH-HANSEN (1932) fant at det formoltitrerbare N øket svært lite i løpet av 15 døgn i sei som ble lagret ved 0°. Analysene som ble utført i pressaft, viste en økning fra 14 mg til 19 mg pr. ml. Vi fant derfor at det var lite formålstjenlig å bruke bestemmelsen av dette N for karakterisering av fiskens forandringer under lagring. Imidlertid ble der også denne gang utført en serie med torsk som ble lagret ved + 4°. Den ga heller ikke brukbare resultater, hverken ved bestemmelser i pressafter eller i vannekstrakter.

I fersk torsk ble utført en del bestemmelser av aminosyreinnholdet.

Tabell 18.

Aminosyre-N i fersk torsk.

Formoltitrerbar N ÷ NH ₃ N
g/100 g
0,069
0,072
0,072
0,084
0,096
0,098

BOURY og SCHWINTE angir for forskjellige fisk i fersk tilstand 0,068—0,120 g i 100 g.

Totale flyktige N-baser, ammoniakk og trimetylamin.

Der ble utført en rekke spredte analyser med CONWAY og BYRNES metode i fisk hvis behandlingsmåte etter slaktningen var kjent.

Av tabellen framgår at lagring ved høy temperatur og i lang tid medfører høye tall for flyktig N.

Dette er i overensstemmelse med hva andre har funnet tidligere og det kvalifiserer de forskjellige former for flyktig N som ledestoffer ved bestemmelser av fiskens tilstand under lagring. Senere i dette arbeid er angitt en del serier lagringsforsøk, særlig av torsk, hvor total flyktig N, ammoniakk N og trimetylamin N er blitt bestemt.

4 torsk fra ett og samme parti ble undersøkt på total flyktig N, ammoniakk N og trimetylamin N. Analysene ble utført i ekstrakt av farsen med CONWAY og BYRNES metode. Resultatene viser stor overensstemmelse mellom de forskjellige torsk. Variasjonene kan ofte være en del større.

Tabell 19.

Flyktig N i fisk.

Fiskesort.	Behandling.	Total flyktig N	Ammon- iakk N	Trimetyl- amin N
		mg/100g	mg/100g	mg/100g
Torsk, blodfersk		9,9	8,1	1,8
»		13,5	11,0	2,5
» 20 timer ved $\div 2^{\circ}$ C		12,3	8,8	3,5
» 70 —»		15,0	10,0	5,0
» 24 timer ved 20° C		26,0	17,1	8,9
» 70 —»		70,0	40,0	30,0
Flyndre, 7 døgn ved 0° C		29,2	14,6	14,6
Kveite, fersk		7,9	3,2	4,7
Sild, frossen blodfersk, opptinet etter 3 mnd.		11,8	10,7	1,1
Sild, frossen etter 11 døgn opptinet etter 3 mnd.		26,2	14,9	11,3
Samme sild, 3 døgn etter opptining, værelsestemperatur		168,1	93,8	74,3

Tabell 20.

Flyktig N i fersk torsk.

Prøve	Total flyktig N	Ammoniakk N	Trimetylamin N
	mg/100 g farse		
Torsk 1	14,6	9,6	5,0
» 2	14,9	9,6	5,3
» 3	15,2	9,8	5,4
» 4	15,5	9,9	5,6

Trimetylamininnholdet i den ferske fisk ligger meget høyt sammenliknet med det innhold som er funnet ved kanadiske undersøkelser. Årsaken kan kanskje søkes i biologiske forhold da også andre undersøkelser, for eksempel BOURY og SCHWINTES, gir liknende resultater som våre.

Metylenblåttavfarging av ekstrakter og pressafter.

Reduktaseprøven, som går ut på å måle avfargingstiden av metylenblått i melk, kan erstatte en bakteriebestemmelse i melken da avfargingstiden står i et visst forhold til bakterieantallet. Denne prøve har da også blitt forsøkt anvendt for fisk oppslemmet i vann som et kriterium på dennes friskhet, uten at man har oppnådd tilfredsstillende resultater

(BOURY og SCHWINTE, 1935). VAN DE VELDE (1937) som oppslemmer fiskekjøttet i *melk* og bruker andre fargestoffer, formoder å kunne komme fram til brukbar metode, men hans resultater er visstnok framleis ikke publisert. Ved noen spredte undersøkelser fant vi for torsk:

Behandling	Ikke avfarget på	Avfarget på
Nyslaktet	8 timer	20 timer
3 døgn ved $\div 1,5^{\circ} \text{C}$	7 timer	20 timer
3 døgn ved 20°C		mindre enn 10 min.
Nyslaktet, ekstrahert, ekstraktet		
15 timer ved 20°C		7—8 min.

Ovenstående resultater tyder på at jo eldre fisken blir og jo høyere temperatur den lagres ved, desto relativt hurtigere avfarger den metylenblått.

Bakteriologiske analyser.

Aerobe bakterier.

I fisk, dels helt fersk, dels lagret i kortere og lengre tid, ble bestemt det antall bakterier som lot seg dyrke på fiske-ekstraktagar ved 20° i løpet av 4 døgn. Som regel var det hvite, men også typiske grønne fluoreserende kolonier som grodde.

Tabell 21.
Bakterier på torsk etter lagring ved 0°C .

Fisk	Lagringstid i døgn	Antall pr. g	log antall
Torsk	0	3.600	3,56
	0	4.000	3,60
	0	9.500	3,98
	0	24.000	4,38
	0	26.000	4,42
	0	28.000	4,45
	0	68.000	4,83
	5	60.000	4,78
	5	220.000	5,34
	10	10.600.000	7,03
	10	11.200.000	7,05
	12	1.300.000	6,11
	12	7.500.000	6,88
	14	6.000.000	6,78
	14	20.000.000	7,30
	16	5.000.000.000	9,70
18	3.000.000.000	9,48	

Bakterieantallet stiger enormt under lagring og når i råttene fisk opp i milliarder pr. g. Fisk lagret i samme tid har som regel stor forskjell i kimtall. Jo høyere kimtallet er ved starten, desto raskere øker det og jo hurtigere blir fisken ødelagt. Bare når tallet er kjent for den fisk vi skal lagre, kan bestemmelsen av kimtallet i den lagrete fisk settes i relasjon til fiskens tilstand til en hver tid.

Lagringsforsøk.

Forsøk 1.

En del 2 kg torsk ble sløyet og vasket og oppbevart ved + 4° C. Ved prøvetakningen ble en vilkårlig valgt fisk malt på kjøttkvern og av farsen ble veiet inn til analyser av totale flyktige baser, ammoniakk og trimetylamin.

Tabell 22.

Torsk lagret ved + 4° C.

Lagringstid	Total flyktig N	Ammoniakk N	Trimetylamin N
timer	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g
6	9,9	8,1	1,8
20	12,2	8,7	3,5
46	13,4	9,8	3,6
115	21,0	14,0	7,0

Mens ammoniakkmengden knapt fordobles, øker trimetylaminmengden til omtrent det 4-dobbelte. Bestemmelsen av trimetylamin gir derfor et langt større utslag hvilket er heldig i analytisk henseende.

Forsøk 2.

Der ble framstillet en stor mengde farse av flere torsk under en så aseptisk framgangsmåte som mulig. Farsen ble innveid med 100 g i hver av flere sterile kolber lukket med vatt. Kolbene sto i kjølerom ved 0° C. Resultatene er gjengitt i tabell 23.

Ammoniakk-N gjennomgår et minimum, stiger så igjen og når etter ca. 10 døgn opp i samme mengde som fisken inneholder opprinnelig og deretter stiger mengden meget sterkt.

Trimetylamin-N øker meget langsomt til det 11—12 døgn, fra da stiger mengden meget kraftig i likhet med ammoniakk-N. Bakterietvillingen skjer raskest mellom det 5. og 8. døgn.

Tabell 23.

Flyktig N i torskefarse lagret ved 0° C.

Lagrings- tid	Total flyktig N	Ammon- iakk N	Trimetyl- amin N	Aerobe bakterier	
				antall pr. g	log a
døgn	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g		
1/4	15,7	11,0	4,7	4.000	3,6
2	10,2	4,2	5,5	3.800	3,6
5	13,3	6,7	6,6	—	
8	15,7	9,4	6,3	33.000.000	7,5
11	22,0	14,1	7,9	390.000.000	8,6
15	97,4	29,9	67,5	1.750.000.000	9,2
18	149,1	70,6	78,5	2.800.000.000	9,4

Forsøk 3.

Dette forsøk ble utført nøyaktig på samme måte som forsøk 2.

Tabell 24.

Flyktig N i torskefarse lagret ved 0° C.

Lagringstid	Total flyktig N	Ammon- iakk N	Trimetyl- amin N	Aerobe bakterier	
				antall pr. g	log a
døgn	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g		
1	16,3	13,3	3,0	24.000	4,4
2	15,3	12,1	3,2	19.000	4,3
5	13,1	8,7	4,4	58.500	4,8
7	18,7	10,2	8,5	10.800.000	7,0
11	24,5	9,1	15,4	1.400.000.000	9,2
13	34,6	17,3	17,3	4.000.000.000	9,6
16	93,9	42,8	51,1	5.300.000.000	9,7

Også her ser man at ammoniakk-N gjennomløper et minimum for etter ca. 10 døgn å komme opp igjen i den opprinnelige verdi. Trimetyla-
minmengden øker kraftig etter det 11. døgn, mens bakterievekst-
hastigheten er størst mellom det 5. og 8. døgn.

Forsøk 4.

Et parti torsk ble lagret i hel tilstand, dels innpakket i pergamyn-
papir, dels i is, idet halvparten av fisken var innsurt med et pulver-
formet stoff som etter sigende skulde kunne gjøre fisken holdbar i
lengre tid enn vanlig. Fisken befant seg i kjølerom av 0° C.

Tabell 25.

Flyktig N i torsk lagret ved 0° C.

Behandlingsmåte	Total flyktig N			Ammoniakk N			Trimetylamin N		
	0	døgn 9	14	0	døgn 9	14	0	døgn 9	14
	mg flyktig N/100 g								
Innpakket i papir tilsatt stoffet	11,7	21,6	42,1	6,2	10,8	24,2	5,5	10,8	17,9
Innpakket i papir uten stoffet	11,7	21,7	42,1	6,2	10,1	20,3	5,5	11,6	21,8
Nedlagt i is med stoffet	11,7	23,4	49,9	6,2	10,8	28,1	5,5	12,6	21,8
Nedlagt i is uten stoffet	11,7	20,4	43,7	6,2	11,7	26,5	5,5	8,7	17,2

Stoffet synes ikke å ha hatt noen som helst preserverende virkning.

Forsøk 5.

En liten *kveite* som var fisket utenfor Måløy ble iset straks ombord og deretter omiset og sendt oss fra *Kvalheim & Co.* Den hadde vært død i ca. 40 timer ved ankomsten til laboratoriet. Den ble lagret på kjølelageret ved 0° C.

Tabell 26.

Kveite lagret ved 0° C.

Lagringstid døgn	Total flyktig N	Ammoniakk N	Trimetylamin N
	mg/100g	mg/100g	mg/100g
1¾	24,4	18,9	5,5
11	13,3	10,2	3,1
15	19,6	11,9	7,7
24	45,6	22,8	22,8

Også ved kveite gjennomløper ammoniakk-N et minimum, men først etter det 15. døgn blir der utpreget økning i trimetylaminmengden. Dette stemmer med den erfaring at kveiten er en mer holdbar fisk enn torskefiskene.

HINARD (1930) anbefalte å nytte forholdet mellom total-ekstrakt-N og flyktig ammoniakk-N som et kriterium på fiskens friskhetsgrad. Av tabell 27 framgår hvordan dette forhold, som vi har kalt f_a , forandrer seg når *kveite* lagres ved 0° C. I tabellen er også angitt forholdet mellom total ekstrakt N og total flyktig N og mellom total ekstrakt N og trimetylamin N, betegnet resp. med f og f_t .

Tabell 27.

Kveite lagret ved 0° C.

Lagrings- tid døgn	Total ekstrakt N omregnet på tørrestoff	g total N i 100 g ek- strakt tørr- stoff	Total flyktig N	NH ₃ N	(CH ₃) ₃ N N	f	f _a	f _t
0	0,760	—	mg/100g 24,4	mg/100g 18	mg/100g 5,5	31,0	42,0	137
11	0,760	13,0	16,4	10,2	6,2	46,2	76,0	122
15	0,725	14,2	19,6	11,9	7,7	36,9	61,0	94,5
20	0,761	15,1	45,6	22,8	22,8	16,6	33,3	33,3

Da total ekstrakt N holder seg noenlunde konstant når proteinet nedbrytes, og på den annen side trimetylaminmengden stadig stiger (den kan teoretisk gjennomsnittlig nå opp i minst 300 mg pr. 100 g) må størrelsen f_t stadig avta og nærme seg mot en verdi som ligger et steds mellom 1 og 10 i helt råttene kveite. f_t avtar hele tiden mens Hinards forhold gjennomløper et maksimum. f_t er derfor mer karakteristisk enn Hinards forhold.

Forsøk 6.

En del torsk ble lagret opphengt i kjølerom ved 0° i 8 døgn. Hensikten var å finde hvor snart *indoldannelsen* kunde påvises i denne fisk. Fisk ble prøvetatt til forskjellige tider. Tallene framgår av tabellen.

Tabell 28.

Indol i torsk.

Lagringstid døgn	Indol, mikrogram pr. 100 g fisk
0	0
3	0
4	svak gulfarge
5	0,8, 1,0
8	7, 8, 10

Der går med andre ord 4—5 døgn før små mengder indol kan påvises i torsk. Tallene stemmer bra med BOURYS tall for sild som finner ca. 0,1 mikrogram i sild av god kvalitet (antakelig 2 dager gammel), 1,6—3,2 mikrogram i middels god og 9—12,5 mikrogram i sild som står på grensen til bedervelse. Metoden kunde ikke brukes for friskhetsbestemmelse av makrell (BOURY 1935).

Sammenfatning av resultatene fra lagringsforsøkene.

I den ferske, »levende« fisk forekommer der små mengder av trimetylamin og ammoniakk som samlet neppe overstiger ca. 14 mg N/100 g. Herav er ca. 1/7—2/7 trimetylamin-N og 5/7—6/7 ammoniakk-N. Denne ammoniakk består av opprinnelig og traumatisk NH_3 , mens alt trimetylamin må oppfattes som opprinnelig, da det ikke er kjent at stoffer i fiskekjøttet blir spaltet til $(\text{CH}_3)_3\text{N}$ av enzymer som forekommer i muskulaturen selv.

Når fisken lagres ved 0° øker trimetylamin-N meget langsomt inntil det 10—11 døgnet (se tab. 23 og 24). Mengden stiger med ca. 150—200% og når opp i en mengde av ca. 10 mg/100 g. Samtidig er bakterieantallet nådd meget høyt opp og dermed også antallet av trimetylaminoksydspaltere, hvorfor trimetylamin dannelsen fra dette øyeblikk av foregår med sterkt øket intensitet. Den mengde som tidligere ble dannet på 11 døgnet, dannes nå på ca. $1\frac{1}{2}$ døgnet og seinere går spaltningen av oksydet ennå raskere.

Ammoniakk-N forsvinner delvis fra prøvene etter et par dagers lagring (se tab. 23 og 24) og etter ca. 4—6 døgn lagring ved 0° finnes 30—45% mindre NH_3 enn opprinnelig. På dette tidspunkt er bakterieveksten kommet over i det logaritmiske utviklingsstadium (se fig. 3), og bakterieantallet er øket i et hvert fall ca. 5—15 dobbelt. Antakelig kan dette lave NH_3 innhold forklares ved at bakteriene til å begynne med nyttegjør ammoniumforbindelser som N-næring, da denne er lettere absorberbar enn andre N-forbindelser for visse arter. Etter ca. 10 døgnet finner man samme mengde igjen som i den opprinnelige friske prøve, og senere øker ammoniakkdannelsen meget sterkt om ikke fullt så sterkt som trimetylamin dannelsen. I løpet av det 11—12. døgnet øker NH_3 -N med ca. 30%.

Vi kan antakelig regne med en samlet mengde av disse stoffer i fersk fisk på maksimum 14 mg/100 g og etter 11 døgn lagring på ca. 26 mg/100 g. Tidligere undersøkelser (hvor summen av disse stoffer er kalt ammoniakk, da der ikke ble tatt hensyn til spaltningen av trimetylaminoksyd, en prosess som først er blitt undersøkt i den seinere tid), viser at man ved sammenlikninger mellom organoleptiske prøver og kjemiske analyser av totale flyktige baser (ammoniakk) er kommet til det resultat at fisk som inneholder mer enn 25—30 mg flyktig N/100 g er å betrakte som bedervet. Dette inntreffer etter våre undersøkelser omtrent ved det 11. døgnet og er i godt samsvar med BEATTY og GIBBONS og SHEWANS målinger som angir grensen til ca. 10 døgnet. BEATTY og GIBBONS angir 4 mg/100 g trimetylamin som største mengde som kan tillates i enno ubedervet fisk. Men deres ferske fisk inneholder i motsetning til vår, bare spor av stoffet. Vår inneholder allerede 1—5 mg/100 g i frisk tilstand og vi bør vel heller oppfatte deres angivelser slik at der

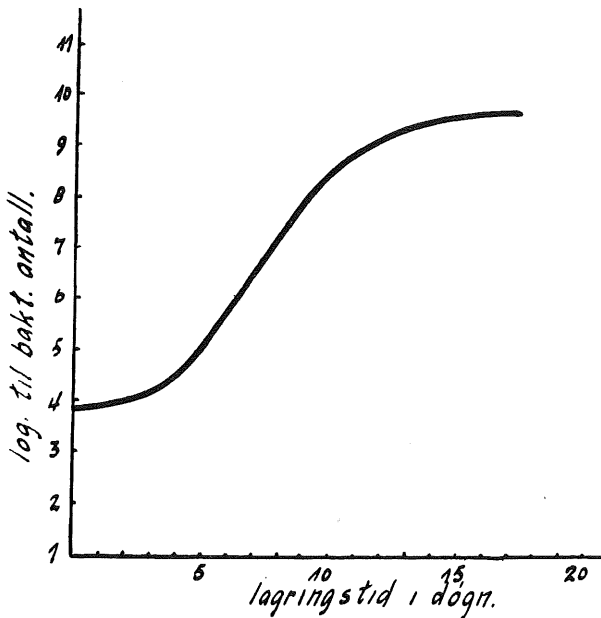


Fig. 3:
Vekstkurve for aerobe bakterier i små torsk lagret ved 0° C.

ikke må dannes mer trimetylammin i fisken enn 4 mg N/100 g for at den framleis kan passere som ikke bedervet. Betrakter man SHEWANS tall etter dette prinsipp, kan fisken lagres i 10 døgn i is og våre tall viser 10—11 døgn ved 0° C. Større fisk enn den vi har eksperimentert med (1—2 kg) vil selvsagt vise noe bedre holdbarhet i is og antakelig kan en sette grensen for stor (4—8 kg) torsk som skal forsendes ved isens temperatur (0°, + 1° C) til 12—14 døgn.

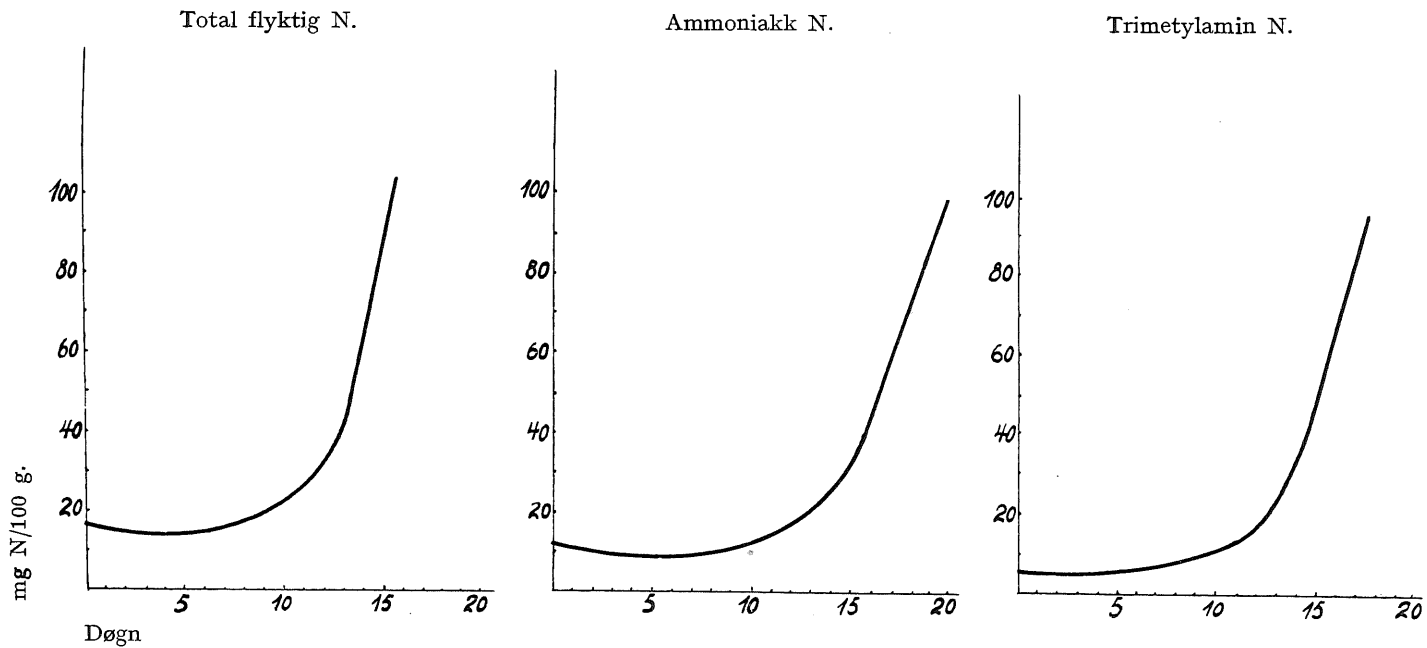


Fig. 4-6. Flyktige baser i småtorsk lagret ved 0° C.

RESYMÉ.

Der er gitt en oversikt over tidligere undersøkelser av fisk og dens holdbarhet under lagring, over fiskens sammensetning og dens bakteriologi, fiskemuskulaturens oppløselighetsforhold i vann og de prosesser som foregår i muskulaturen når fisken blir drept og etter at den er drept. Der er angitt kjemiske, bakteriologiske og biokjemiske analysemetoder som anvendes under studier av lagret fisk i dette laboratorium.

Der er foretatt undersøkelser over: 1. framstilling av jernsera, 2. eggehvitestoffenes oppløselighet i avhengighet av jonestyrken, 3. aminosyrer etter SØRENSENS formolmetode, 4. CONWAY og BYRNES bestemmelsesmetode for flyktig N idet den er prøvet foruten for ammoniakk også for trimetylamin, 5. destillasjon av samme flyktige baser ved vanlig trykk, 6. innhold av forskjellige kjemiske stoffer i fersk og lagret fisk i form av farse, pressaft, ekstrakt og serum, 7. bakterieinnhold i fersk og lagret fisk, 8. metylenblåttavfarging, 9. indolbestemmelser i fersk og lagret fisk og tilslutt 10. er der utført en rekke lagringsforsøk av sløyet råfisk og fiskefarse hvori er bestemt totale flyktige baser, ammoniakk og trimetylamin.

Der ble funnet følgende resultater:

1. Sera framstilles av mager fisk under tilsetning av 30 ml kolloidalt jernhydroksyd pr. 100 g farse.

2. Jo mindre farsen fortynnes med vann desto relativt mer eggehvite går i oppløsning i ekstraktet. Mengden av de andre stoffer i ekstraktet er proporsjonal med farsekonsentrasjonen innen vide grenser.

3. Aminosyrebestemmelser kan bare utføres i sera, men opptil 80 mg eggehvite pr. 20 ml serum influerer ikke på resultatet.

4. CONWAY og BYRNE metodikken som også anvendes av BEATTY og GIBBONS (1937) gir for mager fisk samme resultater som en får ved destillasjon ved vanlig trykk av sera. For sild faller trimetylamintallene noe høyere ut. Metodens fordel er å være meget tidsbesparende.

5. Destillasjon ved vanlig trykk gir en kontinuerlig avspaltning av flyktig N fortrinsvis fra eggehvite men også fra andre stoffer i farse, ekstrakt og serum. Avspaltningen av N fra sera av mager fisk

er imidlertid meget liten. Analyseresultatene ved destillasjon av farse og ekstrakt faller derfor stadig høyere og høyere ut jo lenger en destillerer og kan tildels bli meget misvisende. Vi finner derfor at en kun kan bruke sera ved disse bestemmelser. Vi kommer senere tilbake til event. anvendelse av farse til samme øyemed under bruk av *vakuum* og *lav temperatur*.

6. Når ekstraktet framstilles av 250 g farse i 1000 ml, ligger det totale N i ekstrakttørrestoffet mellom 13—16,3 g/100 g. Aminosyreinnholdet i torsk ligger mellom 69—98 mg/100 g. Total flyktig N, ammoniakk N og trimetylaminn N øker i fisk som lagres, særlig ved høy temperatur, og dette forhold kvalifiserer disse stoffer som *ledestoffer* ved bestemmelse av fiskens friskhetstilstand til en hver tid. Fra våre hittidige undersøkelser framgår at bestemmelse av ett av disse stoffer, trimetylaminn, er særlig egnet for øyemedet.

7. Det aerobe bakterieantall på fisken karakteriserer ikke fiskens tilstand helt pålitelig til en hver tid under lagringen. Det er ikke alltid de samme bakteriesamfunn som gror på fisken, hvorfor der vil inntreffe visse forandringer i vekstkurvene da de forskjellige bakterier har forskjellige veksthastigheter. Dessuten er startantallet av bakterier på den fisk som legges til lagring avgjørende for hvor hurtig fisken ødelegges. Dyrkning av spesielle bakteriegrupper ville langt sikrere gi et bilde av fiskens tilstand.

8. Metylenblåttavfarging som er meget bra ved melkeundersøkelser, har i sin noværende metodikkform på grunn av den lange avfargingstid når fisken enno må betegnes som brukbar, ikke gitt anvendbare data.

9. Indol kunde påvises i torsk etter 5 døgns lagring ved 0° C. Senere økte mengden stadig. Den kvantitative bestemmelse egner seg som et kriterium på fiskens tilstand når man kan påvise indoldannende bakterier på den.

10. Lagringsforsøkene, hvorunder ble bestemt total flyktig N, ammoniakk N og trimetylaminn N etter Conway og Byrne, viste at total flyktig N og ammoniakkmengden først avtok for så å stige. Særlig kraftig skjedde stigningen etter det 10.—11. døgn. Tilbakegangen i ammoniakkmengden som også er påvist av SHEWAN (1938), skyldes antagelig at ammoniakken nyttiggjøres av bakterier som lett assimilerbar kvelstoffnæring. Trimetylaminnmengden øker derimot helt fra begynnelsen av, men økningen går meget langsomt inntil det 9.—10. døgn. Fra dette tidspunkt av tiltar trimetylaminnmengden sterkt og når raskt opp i høie verdier. Dette knekkpunkt på kurven ved det 9.—10. døgn, faller temmelig nøie sammen med de organoleptiske prøver vi foretok.

Etter 9. døgn kunde vi fremdeles anvende fisken, men det 11. døgn var fisken helt skjemt, og det 12. døgn måtte den bøteignes som råttten.

Trimetylammininnholdet i lagret fisk er derfor et utmerket kriterium på fiskens friskhetstilstand og da bestemmelsen av dette stoff er enkel og kan utføres med stor presisjon, er det meget som taler for å anvende bestemmelsen herav til kontroll av råfiskens friskhetstilstand.

*

Vi takker herved Fru HJØRDIS HJORTH-HANSEN som har renskrevet manuskriptet og Herr ing. KAARE BAKKEN som har utført flere av analysene.

SUMMARY AND CONCLUSION.

This paper is intended partly to be an introduction to the biochemistry and bacteriology of fish with special reference to advanced spoilage during storage and partly to present various experiments made in order to decide some doubtful points in analysis and biochemistry of fish.

The processes in the muscles of the dead fish immediately after death and later on are largely of a chemical and bacteriological nature and it would be wasted effort to try to understand the complicated reactions unless the best methods were to be used for their analysis and interpretation. Comparison can not be drawn with much of previous work, based on different methods of sampling and different methods of analysis. Minced muscles, press juice made at different pressures, water extract prepared at different temperatures, shaking times and concentrations, buffer solution extracts at different pH and ionic strengths and sera prepared by means of precipitants of various kinds have been used as samples for the chemical analyses. The analytical methods are also of different kinds and very often the investigators have forgotten to compare their new methods or their modifications of the old ones to the most suitable of those known.

Determination of volatile N is now thought to be the best method in detecting incipient spoilage in fish and in following the sequence of breakdown of the muscle. Our attention has therefore especially been confined to these substances. As ammonia N is produced particularly from proteins during prolonged distillation at ordinary pressure due to presence of salts and high pH values at the boiling temperature, we made attempts to use water extracts and sera of the tissue as samples. Extracts, like minced muscles, failed to give constant values of volatile N, but sera prepared by adding 30 cc colloidal iron hydroxide per 100 g of minced muscle gave values of volatile N, which after a distilling time of 35—40 minutes remained practically constant.

The time-consuming nature of the distillation method outlined made it desirable to use a micromethod which we found in CONWAY and BYRNES method for determination of small amounts of ammonia N.

Simultaneously with BEATTY and GIBBONS (1937), who used the method in fish spoilage investigations, we made a modification of this method, also for trimethylamine N determinations. It is very rapid of manipulation and can easily be applied to press juice, water extract and sera.

By comparing the two methods for *coalfish* we found close agreement, but for *herring* the Conway and Byrne method showed some higher value in trimethylamine N.

The non protein fraction of fresh fish muscle is proportional to the concentration of the extracts, this not being the case with the protein fraction thereof, owing to the relative greater solubility of the proteins as the ionic strength of the extracts increases.

The determination of the amino acid N after the SØRENSEN method is not influenced by small amounts of protein in not completely coagulated sera (= 80 mg in 20 cc). The amino acid N of cod muscle is 68—98 mg/100 g.

The determination of the number of *aerobic* bacteria only is not absolutely reliable for characterisation of the condition of neither a fresh nor a stored fish as the sequence of the growth curve of the aerobic bacteria does not follow the same sequence as the chemical products formed during the storage. Fresh fish, highly contaminated from unclean handling is broken down much sooner than fish protected against such contamination. The same bacteria societies do not always multiply on the stored fish. The bacterial growth curves from different fish-batches are not identical. The bacteria which spoil the fish are also of a facultative and of an obligat anaerobic nature and especially the facultative anaerobic species or the reducing achromobacter are very important because they produce trimethylamin. It is highly desirable to improve the bacteriological methods of testing fish.

The methylenblue reduction method, so valuable and so rapidly performed with milk analyses, is somewhat troublesome in its present form in view of the long reduction time of extracts of fresh and still sound fish.

It is possible to show the presense of small amounts of indol many days before we should class the fish as almost spoiled. Later on this content increases more or less, due to the presence of various indole producing bacteria.

Storage experiments with whole gutted cod and minced cod muscle at 0° C show a slow increase of trimethylamine till about the 9.—10. day. From the 10.—11. day there develop distinct signs of incipient spoilage, as the amount of trimethylamine increases very rapidly. Volatile N and ammonia decreases during the first 4—5 days and then slowly in-

creases till about the 8.—9. day. From the 10.—11. day the increase is very great. As to the decrease of ammonia, it might be probable that it serves to begin with as an easily available source of nitrogen for the bacteria. The organoleptic examinations on the 9. day proved the fish to be still sound, on the 11. day it was definitely stale, and on the 12. day it had become obviously spoiled.

The content of trimethylamine of fish is therefore very useful as an indication of its freshness during storage. As the determination is very easy and may be performed with great precision, much speaks for its applicability in testing stored fish until a more adequate method can be found.

LITTERATUR.

- ALMY, FIELD og HILL 1923. The Amer. Food J., no. 1.
- ANDERSEN og JENSEN 1925. Zeitschr. Anal. Chemie, 67, 427.
- ANDERSON 1908. 26. Ann. Rep. Fish. Board Scot. III. 13.
- ASCHEHOUG og VESTERHUS 1940. Tidsskr. f. Hermetikind. 26, 49.
- BALDWIN 1937. An introduction to comparative Biochemistry. At the University Press. Cambridge.
- BARTHEL 1925. Svensk Kem. Tidsskr. 37, 157.
- BATE SMITH 1937. Proc. Roy. Soc. London Ser. B. 136.
- BEATTY 1937. Prog. Rep. Biol. Board Canada no. 20, 3.
- 1938. Journ. Fish. Res. Board Canada IV. 63.
- 1939. Sammesteds. IV. 229.
- BEATTY og COLLINS 1940. Sammesteds. IV. 412.
- BEATTY og GIBBONS 1935. Prog. Rep. Biol. Board Canada no. 15, 4.
- 1937. Journ. Biol. Board Canada III. 77.
- BERGFORD 1932. Ann. Rep. Biol. Board Canada. 19. °
- 1933. Cont. Canad. Biol. N. S. 7, 427.
- 1934. Proc. 5. Pac. Sci. Cong. 5. 3715.
- 1937. Prog. Rep. Biol. Board Canada, no. 33, 23.
- BERGEY 1934. Manual of Determinative Bacteriology. Baillière, Tindall & Cox, London.
- BLAKE 1935. Fin. Rep. Fur. Comm. H. M. State Off. Edinburgh. App. B. 60.
- BOHART 1928. Pub. Puget Sound. Biol. Sta. Univ. Wash. 5, 309.
- BOURY 1936. Rev. Trav. Office Pêches Mar. 9, 401.
- BOURY og SCHWINTE 1935. Sammesteds. 8, 282.
- BRADLEY og BAILEY 1940. Food Res. 5, 487.
- BROCKLESBY og RIDDELL 1937. Prog. Rep. Biol. Board Canada, no. 33, 17.
- BROWNE 1918. Abstr. Bact. 2, 6.
- BRUNS 1908. Arch. f. Hyg. 67, 209.
- BUDJACJAN 1932. Z. Unters. Lebensm. 64, 226.
- CAMPBELL 1934. Journ. Biol. Board Canada I. 179.
- 1934. Prog. Rep. Biol. Board Canada, no. 9.
- CLOUGH 1922. Publ. Puget Sound Biol. Sta. Univ. Wash. 3, 195.
- COLE 1928. Practical Physiological Chemistry. Heffer, Cambridge.
- COLLINS 1938. Prog. Rep. Fish. Res. Board Canada, no. 23, 6.
- CONWAY og BYRNE 1933. Biochem. J. 27, 419.
- CHAPMAN CROOKS og RITCHIE 1938. Food Res. 3, 589.
- CHEN og BRADLEY 1924. J. Biol. Chem. 59, 151.
- COOK 1931. Canad. Chem. Met. 15, 22.
- CROSS 1919. Hon. Adv. Council Sci, Ind. Res. Canada.
- DROZDOV, MINKOWSKAJA og DREILING 1941. Biochem. Z. 308, 116.

- EGGLETON og EGGLETON 1927. *Biochem. J.* 21, 190.
EMBDEN 1927. *Klin. Wochenschr.* 6.
FELLERS 1921. *Univ. Wash. Publ. Fish.* 1, 157.
FIRSSOW 1937. *Probl. Nutrition* 6, 74.
FISKE og SUBBAROW 1927. *Science* 65, 401.
FÜRTH 1895. *Arch. exper. Path. u. Pharm.* 36, 231.
GEE 1927. *Contr. Canad. Biol. Fish. N. S.* 3, 347.
— 1930. *Sammesteds.* 5, 433.
GIBBONS og REED 1930. *J. Bact.* 19, 73.
GIBBONS 1934. *Contr. Canad. Biol. Fish. N. S.* 8, 301.
GLASSMANN og ROCHWARGER 1929. *Z. Unters. Lebensm.* 58, 585.
GRIFFITHS 1937. *Food Res.* 2, 121.
GRIFFITHS og STANSBY 1934. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 64, 401.
HARRISON 1917—1918. *Contr. Canad. Biol. Fish.* 1918. 179.
— 1929. *Bull Nat. Res. Council Canada.*
HARRISON 1926, PERRY og SMITH. *Rep. Nat. Res. Council Canada.* No. 19, 1.
HARRISON og Sadler 1929. *Bull. Biol. Board Canada.* 12.
HAYNES 1937. *Microbiology in the preservation of animal tissues.* Sp. rep. *Food Invest. Dept. Sci. Ind. Res.*, no. 45.
HESS 1932. *Contr. Canad. Biol. Fish. N. S.* 7. 147.
HINARD 1932. *Rev. Trav. Office. Peches Mar.* 5, 453.
HJORTH-HANSEN 1936. *Årsberetn. vedk. Norges. Fiskerier* 1935. 60.
HOPPE-SEYLER 1930. *Z. f. Biologie* 90, 433.
HOLMOV 1937. *Probl. Nutrition* 6, 79.
HUNTER, A. C. a. 1920. *J. Bact.* 5, 353.
— b. 1920 *Sammesteds* 5, 543.
HUNTER, A. 1928. *Creatine and Creatinine*, London.
— 1929. *J. Biol. Chem.* 81, 513.
KIMURA og KUMAKURA 1934. *Proc. 5. Pac. Sci. Congr.* 5, 3709.
LABRIE og GIBBONS 1937. *J. Biol. Board Canada* 3, 439.
LACHNO 1935. *Ukrain. Biochem. Zhurn.* 8, 61.
LEIM, McLEOD og SIMPSON 1927. *Contr. Canad. Biol. Fish.* 3, 457.
LEVY 1936. *C. R. de Lab. Carlsberg. Ser. Chim. Vol.* 21, 101.
LINTZEL og HERRING 1939. *Z. Unters. Lebensmittel* 80, 147.
LINTZEL 1934. *Biochem. Z.* 273, 243.
LLOYD 1929—30. *J. Mar. Biol. Assoc.* 16, 879, I.
LOESER 1935. *Beihefte Z. Ges. Kälteind. Reihe* 3,1.
LOGAN 1930. *Contr. Canad. Biol. N. S.* 6, 6.
LUMLEY, PIQUE og REAY 1929. *Dpt. Sci. Ind. Res. Food. Invest. Sp. rep.* no. 37.
LÜCKE og FRERCK 1940s. *Vorratspfl. u. Lebensm. Forschung.* 3, 130.
LÜCKE og GEIDEL 1935. *Z. Unters. Lebensm.* 70, 441.
LÜCKE og SCHWARTZ 1937. *Arch. f. Mikrobiologie* 8, 207.
MACPHERSON 1931. *Rep. Food Invest. Board.* 1930. 134.
— 1932. *Biochem. J.* 26, 80.
MALIN 1937. *Probl. Nutrition* 6, 66.
MARKOFF 1939. *Centralbl. f. Bakt. II.* 101, 151.
McLEOD og Simpson 1927. *Contr. Canad. Biol. Fish.* 3, 437.
MEYERHOF og LOHMANN 1928. *Biochem. Z.* 196, 22,44.
MICHAELIS og RONA 1907. *Biochem. Z.* 2. 219.
MÜLLER 1903. *Arch. f. Hygiene* 47, 127.

- NEWTON 1924. *Contr. Canad. Biol. Fish. N. S.* 1, 19.
NICKERSON og PROCTOR 1935. *J. Bact.* 30, 383.
NICOL 1936. *Food Manuf.* 11, 133.
NOTEVARP og HJORTH-HANSEN 1933. *Årsberetn. vedk. Norges Fiskerier* 1932.
OBST 1919. *Journ. Infect. Dis.* 24, 158.
OKOLOFF 1932. *Z. Unters. Lebensm.* 63, 129.
PALLADIN og SIGALOWA 1935. *Ukrain. Biochem. Zhurn.* 7, 29.
PARNASS 1932. *Ann. Rev. Biochem.* 1, 450.
PISTELLI 1933. *Chimie Industrie* 30, 181.
POLLER og LINNEWEH 1926. *Berichte d. chem. Ges.* 59, 1362.
POLOEKTOFF 1933. *Z. Fleisch u. Milchhyg.* 43, 121.
PROCTOR og NICKERSON 1935. *J. Bact.* 30, 377.
REAY 1935. *J. Soc. Chem. Ind.* 54, 96 T.
REAY 1938. *Rep. Food. Invest. Board. Gr. Br.* 1937. 69.
REAY og KUCHEL 1937. *Rep. Food Invest. Board. Gr. Br.* 1936.
REED, RICE og SINCLAIR 1929. *Contr. Canad. Biol. Fish. N. S.* 7, 147.
REED og SPENCE 1929. *Canad. Biol. and Fish.* IV. 257.
RIDDELL, BROCKLESBY og PUGSLEY 1937. *Prog. Rep. Biol. Board Canada*
no. 33, 13.

RITCHIE 1927. *Brit. J. Exptl. Biol.* 4, 327.
SANBORN 1930. *J. Bact.* 19, 375.
SANBORN 1932. *J. Bact.* 23, 349.
SARUDI 1941 (v. Stetina). *Z. Unters. Lebensm.* 82, 451.
SARUYA 1932. *J. Imp. Fish. Inst. Tokyo* 27, 25.
SCHLIE 1934. *Die Kälteindustri.* XXXI. 115.
SCHMIDT-NIELSEN 1903. *Beitr. Chem. Phys. und Pathol.* 4, 183.
SCHMIDT-NIELSEN og STENE 1931. *Det kgl. Norske Vidensk. Sels. Forh.* IV. 74.
— 1932. *Sammesteds* IV. 198.
— 1933. *Sammesteds* VI. 42.
SCHWARTZ 1936. *Bull. Inst. Intern. Froid* 17, 221.
SCHWARTZ og BENDER 1936. *Centralbl. f. Bakteriologie* II. 95, 33.
SCHWARTZ og ZEISER 1939. *Arch. f. Mikrobiologie* 10, 322.
SCHØNBERG 1939. *Z. f. Ges. Kälteind.* 46, 155.
SCHØNBERG og DEBELIC 1933. *Berliner tierärztl. Wochenschrift.*
SHARP 1934. *Proc. Roy. Soc. London.* 114 B, 506.
— 1932. *Rep. Food. Invest. Board. Gr. Br.* 1931. 202.
— 1933. *Sammesteds.* 1932. 201.
— 1935. *Sammesteds.* 1934. 96.
— 1935. *Biochem. J.* 29, 850.
SHEWAN 1937. *Rep. Food Invest. Board. Gr. Br.* 1936. 99.
— 1938. *J. Bact.* 35, 397.
— 1938. *Rep. Food Invest. Board. Gr. Br.* 1937. 75.
SHTENBERG, ROCKLINA og SHILLINGER 1938. *Probl. Nutrition.* 7, 137.
SKAR 1922. *Centralbl. f. Bakteriologie* II. 57, 326.
SMITH 1934. *Proc. Roy. Soc. London* 114 B.
— 1934. *J. Soc. Chem. Ind. London.* 103, 351 T.
— 1932. *Rep. Food Invest. Board. Gr. Br.* 1931, 23.
SNOW og BEARD 1939. *Food Research.* 4, 563.
STANSBY og LEMON 1933. *Ind. and Eng. Chem. (Anal. Ed.)* 5, 208.
STEWART 1930. *Rep. Food Invest. Board. Gr. Br.* 1929. 137.

- STEWART 1932. J. Mar. Biol. Assoc. 18, 35.
— 1934. Rep. Food Invest. Board. Gr. Br. 1933. 93.
— 1935. J. Soc. Chem. Ind. London 54, 92 T.
- STROHECKER, VAUBEL og KIRCHBERG 1937. Z. Anal. Chemie. 110, 1.
- SUWA 1909. Pflügers Arch. Ges. Physiol. 128, 421.
— 1909. Sammesteds 129, 231.
- SØRENSEN 1908. Biochem. Z. 7, 45.
- SØRENSEN og HENRIQUES 1909. Z. physiol. Chemie 63, 27.
- TANIKAWA 1935. J. Soc. Ind. Fish. Japan. 3, 267.
— 1938 Bull. Soc. Sci. Hyg. Aliment. 26, 149.
- TARR 1938. Nature 142, 1078.
— 1940. J. Fish. Res. Board Canada 4, 367.
- TARR og BAILEY 1939. J. Fish. Res. Board Canada 4, 327.
- TARR og SUNDERLAND 1938. Prog. Rep. Biol. Board Canada 37, 7.
- TILLMANS og OTTO 1924. Z. Nahr. u. Genussm. 47, 25.
- TILLMANS, HIRSCH og KUHN 1927. Z. Unters. Lebensm. 53, 44.
- TJØTTA og SØMME 1938. Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl. XXXVII. 514.
- TOWER 1899. U. S. Fish. Com. Bull. 19, 231.
- ULRICH 1906. Z. f. Hygiene, 53, 176.
- VAN DEURS og HOFF-JØRGENSEN 1936. Ingeniøren 45. I. Avd. Kemoteknik.
- VAN DE VELDE 1937. Natuurvet. Tijdschrift 19, 41.
- VAN DRIEST 1913. Proc. 3. Internat. Cong. Refrig. Chicago 19.
- WALL 1913. Centralbl. f. Bakteriologie I. 56, 701.
- WATSON 1939. a. J. Fish. Res. Board Canada IV. 252.
— 1939. b. Sammesteds IV. 267.
- YAMAMURA 1933. Bull. Jap. Soc. Sc. Fish. 2, 118.
— 1933. J. Imp. Fish. Inst. Tokyo 27, 45.
- ZOBELL og RITTENBERG 1936. J. Bact. 35, 275.
- ZOBELL og ANDERSON 1936. Sammesteds 36, 253. Abs.
-