

FISKERIDIREKTORATETS KJEMISK-TEKNISKE  
FORSKNINGSINSTITUTT

Lagring av fisk i nedkjølt sjøvann  
Postmortale forandringer i fiskemuskel

Avbygning av nukleotidene

ved Jens W. Jebsen

Når en skal undersøke de første postmortale forandringer i fiskemuskel under lagring i nedkjølt sjøvann, så finner en at der ikke foreligger noen enkel metode til å måle dette. Metoder som har sammenheng med mikroorganismens nedbrytning av muskelvevet gir først utslag etter vel en uke. De prosesser som er mest fremtredende straks blodomløpet stanser, har nær tilknytning til omdannelsen av glycogen til melkesyre og avbygningen av muskelnukleotidene, særlig adenosintrifosfat (ATP), adenosindifosfat (ADP), adenosinmonofosfat eller adenylsyre (AMP) og de videre avbygningsprodukter: inosinmonofosfat eller inosinsyre (IMP), inosin og hypoxanthin.

Nukleotidene fikk øket interesse som indikator på fiskens kvalitet etter at Kuninaka et al. (1964) fant at nukleotidene ikke bare er en sterk smaksingredient, men også en smaksforsterker. Og er delvis ansvarlig for den kjøttliknende smak i fersk fisk. Fremstilling og bruk av inosinmonofosfat er underlagt japansk patent, Yoshida og Kageyama (1956). Det som i alt for liten grad er undersøkt er hva de funne verdier for nukleotidene og deres avbygningsprodukter innebærer.

Vi skal i det etterfølgende se at avbygningen av nukleotidene er en komplisert prosess. Og jo dypere en trenger inn i problemet, jo mer komplisert synes det å være. De målinger som her er utført er begrenset. Men å oppnå resultater som klart viste virkningen av hver enkelt faktor uten at de andre faktorene forstyrret, er nesten umulig. Hver enkel verdi representerer et samspill mellom en lang rekke faktorer. Det er ytterst vanskelig både ved egne forsøk og ved litteraturgranskning å finne ut med hvilken tyngde hver faktor influerer på avbygningen og på fiskens kvalitet.

#### Metodikk

Den enzymatiske metode til bestemmelse av ATP er utarbeidet av Bücher og Schuart Biochemica Test-Boehringer, TC-J artikkel nr. 15979. Ved enzymet phosphoglycerat-kinase (PGK) omdannes 3-phosphoglycerat og adenosintrifosfat (ATP) til D-1,3-difosfoglycerat og adenosin-difosfat.

Da 1,3-difosfoglycerat er proporsjonal med mengden ATP, kan en bestemme ATP ved å måle det dannede difosfoglycerat. Denne sistnevnte forbindelse måles ved reaksjonen 1,3-difosfoglycerat +

reduisert difosfopyridinnucleotid omdannes til glycerinaldehyd - 3 - fosfat + uorg. fosfor og difosforpyridin-nucleotid. En kan således måle ATP-konsentrasjonen ved å måle forandringen i DPN-H-absorbsjonen ved 340 eller 366 m $\mu$ .

Følgende oppløsninger anvendes:

- Nr. I: 0,10 M Triätanolamin-puffer pH 7,6  
4  $\cdot$  10<sup>-3</sup> M MgSO<sub>4</sub>  
6  $\cdot$  10<sup>-3</sup> M D-3-fosfoglycerat, Cyclohexylammonium-Salz (3-PG)
- Nr. II: 1,2  $\cdot$  10<sup>-2</sup> M redusert difosfopyridin-nukleotid (DPN-H) løst i 1 ml oppl. nr. 1.
- Nr. III: 4 mg Glycerinaldehydfosfatdehydrogenase (GAPDH)/ml  
1 mg fosfoglyceratkinase (PGK)/ml
- Nr. IV: 6 % perklorsyre (g/100 ml)

#### Fremgangsmåte

20 g fisk + 20 ml perklorsyre 0,6 N ble utgnidd i iskold morter og filtrett på nutsche. I en 10 mm kyvette ble følgende oppløsninger utpipettert:

2,5 ml oppl. I  
0,05 ml oppl. II  
0,20 ml muskel-ekstrakt

Ekstinksjonen ved 366 m $\mu$  ble avlest. E<sub>1</sub> ble så tilsatt 0,05 ml oppl. III. Etter 5 min. ved 20-25°C ble ekstinksjonen avlest ved 366 m $\mu$  hvert minutt og verdiene ble ekstrapolert til tidspunktet oppl. III ble tilsatt ): E<sub>2</sub>. Differansen E<sub>1</sub> - E<sub>2</sub> ble multiplisert med faktoren 398. Bestemmelsen av ADP foretas enzymatisk etter F. Lipmann, Adv. in Enzymology 1 (1941) p. 99, og Th. Bücher Adv. in Enzymology 14 (1953) s. 1.

Adenosin-5-difosfat blir fosforylert til ATP ved hjelp av pyruvatkinase og fosfoenol-pyruvat, samtidig dannes ekvivalente mengder pyruvat, og sistnevnte overføres så til laktat ved hjelp av redusert difosfopyridinnucleotid (DPN-H). Tilsvarende som for ATP kan en således måle ADP-kons. ved forandringer i E<sub>340</sub> eller E<sub>366</sub>.

Når det gjelder bestemmelse av AMP kan denne bestemmes i samme prøve ved å omdanne AMP og ATP til ADP ved hjelp av myokinase. Så kan en bestemme det nydannede ADP på tilsvarende måte som tidligere.

F. Lipmann, Th. Bücher.

Følgende oppløsninger anvendes:

- Oppl. 1: 1 M Triätanolamin-hydroklorid  
1,3 M  $K_2CO_3$
- Oppl. 2:  $10^{-2}$  M fosfoenolpyruvat (PEP)  
0,4 M  $MgSO_4$  løst i 3 ml bidestillert vann
- Oppl. 3:  $5 \cdot 10^{-3}$  redusert difosfopyridinnucleotid løst i 2 ml  
1 %  $NaHCO_3$ .
- Oppl. 4: Laktat-dehydrogenase (LDH) 1 mg/ml
- Oppl. 5: 1 mg/ml Pyruvatkinase (PK)
- Oppl. 6: 2 mg/ml Myokinase (MK)
- Oppl. 7: 6 % perklorsyre (g/100 ml)

#### Fremgangsmåte

20 g fiskemuskel

20 ml 0,6 N perklorsyre utgnis i iskold morter og filtreres på nutsche.

4 ml  $HClO_4$ -muskel-ekstrakt

1 ml oppl. 1

blandes og filtreres på nutsche etter 10 min. henstand i isbad.

I en 10 mm kyvette ble følgende oppløsninger utpipettert:

2,00 ml perkloratfri ekstrakt

0,15 ml Oppl. 2 (PEP/ $Mg^{++}$ ,/ $K^+$ )

0,10 ml Oppl. 3 (DPN-H)

0,02 ml Oppl. 4 (LDH)

Ekstinksjonen ved 366  $m\mu$  ble avlest etter et par minutter ):  $E_1$ . Tilsettes 0,02 oppl. 5 (PK). Etter ca. 5 min. avleses pr. 2 minutter, 3-5 ganger ekstinksjonen ved 366  $m\mu$ . Verdiene ekstrapoleres til tidspunktet oppl. 5 ble tilsatt ):  $E_2$ . Det tilsettes 0,02 ml oppl. 6 (MK). Etter ca. 15 min. avleses pr. 2 minutter, 3-5 ganger ekstinksjonen ved 366  $m\mu$ . Verdiene ekstrapoleres til tidspunktet oppl. 6 ble tilsatt ):  $E_3$ .

mg ADP pr. 100 g muskel fremkommer ved differansen  $E_1 - E_2$  multiplisert med faktoren 34,2. mg AMP pr. 100 g muskel fremkommer ved differansen  $E_2 - E_3$  multiplisert med faktoren 14,0.

Adenosin-5-trifosfat (ATP), adenosin-5-difosfat (ADP), adenosin-5-monofosfat (AMP) i torsk, sei og sild ved enzymatisk bestemmelse.  
 ATP i torsk under lagring (timer) ved 0° i sjøvann (uttrykt som mg ATP/100 g muskel).

Dato	Start	22 tim.			
3/4	199	19			
		1 t	4 t	5 t	8 t
6/4	207	196	162	187	187
		1 t	2 t	4 t	
14/5	132	81	81	3	

ADP og AMP i torsk under lagring ved 0° i sjøvann (uttrykt som mg pr. 100 g muskel)

Dato	Start	3 t	27 t.	51
8/4	ADP 26	20	9	13
	AMP 0	0	4	5
13/4	ADP 16	11		
	AMP 2	2		

Måling av ATP - ADP - AMP i torsk

		ATP	ADP	ADP
23/5	Start	216 mg	3 mg	9 mg
23/5	4 t.	152 mg	2 mg	2 mg
2905	Start	0	18	4
	4	0	7	4
	24	0	7	6

Måling av ATP - ADP - AMP i sei (målt samtidig) (uttrykt som mg pr. 100 g muskel)

Dato	Start	3 timer	24 timer	27 timer	71 timer
28/5	ATP 216	152	0	0	0
	ADP 3	2	18	7	7
	AMP 9	2	4	4	6
22/6	ATP 188				
	ADP 19				
	AMP 1				

Måling av ATP - ADP - AMP i sild (målt samtidig)(uttrykt som mg pr. 100 g muskel)

Dato	Start	3 timer	24 timer
2/6	ATP 92	0	0
	ADP 0	15	0
	AMP 3	9	2
17/6	ATP 0		0
	ADP 0		30
	AMP 0		1

Våre tidligere undersøkelser av adenosintrifosfat (ATP) i helt fersk fisk, viste at det varierte i torsk mellom 410 og 110 mg/100 g muskel. Ved de enzymatiske målinger som vi her har utført, viser et ATP-innhold i torsk oftest rundt 200 mg/100 g. Målingene ble utført i april og mai.

Tilsvarende enzymatiske målinger ble også utført på sei i mai, juni, disse viste også rundt 200 mg/100 g. Fisken er hentet fra fiskekummer for levende fisk på torget i Bergen og ATP er målt omgående. En får på denne måten helt fersk fisk, men en har ikke oversikt over tretthetsgrad og ernæringsforhold.

Vi har også foretatt måling av ATP i sild i akvariet i Bergen. Det lave innhold av ATP som vi fant i sild: mellom 0 og 92 mg/100 g muskel, kan muligens henge sammen med at sild er en pelagisk fisk som hele tiden er i bevegelse.

I litteraturen ligger ATP-innholdet i fisk mellom 250 og 410 mg/100 g. Saito et al. 1959, Jones og Murray 1960, Fraser et al. 1961, Tomlinson et al. 1962.

De undersøkelser som ble foretatt ved Fiskerilaboratoriet 1953-54 av Ulf Rambech viste et initialinnhold på 70 mg ATP/100 g.

Fujii og Suzuki (1969) foretok en undersøkelse av årstidernes innflytelse på ATP-innholdet i karpe i akvarium, og fant at ATP + ADP-innholdet varierte mellom 255 mg/100 g muskel i februar, 356 mg i april, 455 mg i mai og 545 i juli.

Som en ser av verdiene så holder ATP-nivået seg konstant enkelte ganger opp til ca. 8 timer, andre ganger faller det allerede etter 1 time. I denne periode er det likevekt mellom avbygningen av adenosintrifosfat (ATP) ved myosin-myokinase-systemet og ATP-resyntesen ved den glykolytiske syklus.

Glykogen-innholdet i fisken kan variere sterkt alt etter ernærings situasjonen, fangstmetode og temperatur. Før mente man at glykogeninnholdet i fisk var meget lavere enn i varmblodige dyr, men ifølge Tomlinson og Geiger (1962) synes det å ligge nær verdiene for varmblodige dyr.

En har funnet at radioaktivt glykogen i muskelfarse spaltes til glucose, maltose og antakelig dextrin. Mens glykose ikke forekommer i levende fisk, finner en mellom 100 og 400  $\mu$  mol glykose pr. 100 g fiskemuskel (Tarr 1954). Burt (1961) angir 215  $\mu$  mol glykose pr. 100 g i uthvilt akvarium-fisk og så meget som 340  $\mu$  mol glykose etter 5 døgns lagring ved 0°C.

Der synes imidlertid ikke å være parallellitet mellom avbygningen av glykogen og akkumuleringen av melkesyre, Black et al. (1961). Akkumuleringen av melkesyre har teknologisk betydning, idet det er hovedfaktoren for post mortal aciditet. Når kreatin-fosfat-nivået er under 30 % av det i uthvilt muskel, går ATP-avbygningen over fra den langsomme til den hurtige fase, hvor avbygningen ikke lenger holder tritt med resyntesen. I dette området synes adenosindifosfat (ATP)-avbygningen å sinkes idet ADP resyntetiseres ved dismutasjon av ATP og AMP med myokinase. Det stabile nivå for hvert enkelt nukleotid synes å ha sammenheng med muskelens pH som regulerer enzym-systemene (Jones og Murray 1962). Disse fant også forskjell i nucleotid-nivåene i julifanget fisk sammenliknet med februarfanget fisk.

Våre analyser av ATP-ADP og AMP i fisk under lagring i nedkjølt sjøvann, viste kun bestemte nivåer av ATP, men ikke av ADP og AMP. Muligens på grunn av at analysematerialiet var for lite. Men det synes å fremgå at ADP-innholdet er jevnt over høyere enn AMP det første døgnet etter døden er inntrådt. Små mengder adenine-nucleotider synes å holde seg lenger tid, Tomlinson og Geiger (1963) mener at dette skyldes at disse er bundet til myofibrillar protein, som beskytter dem mot enzymatisk nedbrytning.

Ser en på den strukturelle betydning nukleotidene har i muskelen, er det bemerkelsesverdig at det er under 5 % tilbake etter ett døgns lagring. Hydrolysen av adenosinmonofosfat (AMP) til inosine monofosfat (IMP) ved hjelp av AMP-deaminase skjer hurtig, men den påfølgende hydrolyse til inosin går langsommere. Det dannes derfor i den første uken relativt store mengder inosin i muskelen. (Jones og Murray 1962).

Defosforlyseringen av inosinmonofosfat IMP til inosine foregår ved hjelp av 5-nucleotidase. Aktiviteten av dette enzym og de påfølgende enzym-systemer varierer meget med fiskeslaget. (Tarr 1955-1958). Kassemarn et al. (1963). Dette er sannsynligvis årsaken til de motstridende resultater som foreligger i litteraturen, alt etter fiskeslag, årstid og fiskested.

I Kassemarns forsøk (1963) avbygges IMP i rødspette tilsvarende hurtig som i torsk og hurtigere enn i skærising (lemon sole) og hyse og langt langsommere enn i vårfanget laks og i ørret. Kassemarn fant bare spor av inosine i skærising, mens Jones og Murray (1962) fant at inosine var en dominerende bestanddel i

torsk etter 7 døgner i is. I hyse øker inosin-konsentrasjonen de første 10 dagene, deretter faller den. Omsetningen av inosin kan enten skje ved nucleosid hydrolyse til hypoxanthin og ribose, eller det kan skje ved nucleoside fosforylase og ortofosfat til ribose-I-fosfat.

Det er slett ikke klart hvilken reaksjon som er den fremherskende, men sannsynligvis er den hydrolytiske reaksjonsmekanisme den ledende, siden det dannes meget mer fri ribose enn pentosefosfat. Nå kunne det tenkes at ribose også dannes av ribonukleinsyre (RNA), fiskemuskelene inneholder 42-142 mg RNA/100 g muskel og 0,2-2,5 mg deoxyribonukleinsyre, Tarr (1966), men Tomlinson og Creelman (1960) viste at ribose hovedsakelig dannes av ATP.

I hyse øker hypoxanthin-konsentrasjonen fra dødsøyeblikket, men den øker hurtigere fra det 10. døgner og når maksimum etter 17 døgner, for skærising (lemon sole) når hypoxanthin konsentrasjonen sin maksimum etter 12-14 døgner. Hos Gadus-fiskene øker dannelsen av hypoxanthin betydelig når den bakterielle nedbrytning setter inn, Reay og Shewan (1949).

Hypoxanthin har i den senere tid blitt anvendt som et mål for hvor lang tid fisk har vært lagret ved 0°C. Det har også vært anvendt ved undersøkelse av strålingskonserverte fisk, Spinelli et al. 1965. Det er derfor av betydning å kjenne de faktorer som influerer på dannelsen og den videre avbygningen av hypoxanthin.

Spinelli påpeker at mens andre metoder som trimetylamin, flyktige syrer og baser angir graden av ferskhet ved å måle bakterielle stoffskifte produkter, så angir bestemmelser av hypoxanthin den enzymatiske nedbrytning forskjellig for hvert fiskeslag. Men undersøker en reaksjonen nøyere, så påpeker Kassemsarn (1963) og Reay og Shewan 1949 at frigjøringen av hypoxanthin i torskefisker øker betraktelig under utvikling av mikroflora. For hyse øker hypoxanthin hurtigere fra den 10. dag og når maksimum etter 17 døgner, for skærising (lemon sole) når hypoxanthin sitt maksimum etter 14 døgner.

Men også den videre nedbrytningen av hypoxanthin er influert av mikroorganismer. Avery et al. (1962) har bekreftet dette i forsøk med tilsetning av kjente forråtnelsesbakterier. I torsk synes hypoxanthininnholdet å synke etter det 14.-15. døgner. For fisk lagret i nedkjølt sjøvann er dette over grensen for vanlig holdbarhet.



Men når det gjelder strålingskonservert fisk, som muligens er holdbar ca. 4 uker, så innebærer dette at i fisk med lav bakterieflora, vil der skje en langsommere økning av hypoxanthin, men også en langsommere dekomponering av stoffet enn i fisk med høyt bakterieinnhold. Dette er nær opp til det som våre undersøkelser av strålingskonservert fisk synes å antyde.

I motsetning til Spinelli's uttalelser (1965) synes disse iakttagelser å innebære at en ikke uten videre kan sammenlikne fisk med forskjellig bakterieflora og forskjellig grad av bakteriebelastning.

#### Litteratur-henvisninger

- Black, E.C., A.C. Robertson og R.R. Parker. In "Comparative physiology of carbohydrate metabolism in heterothermic animals". Ed. A.W. Martin Univ. of Washington Press, Seattle 1961, s. 89-124.
- Briskey, E.J., R.G. Cassens og J.C. Trautman. The physiology and biochemistry of muscle as food. The University of Wisconsin Press 1966.
- Busch, W.J., F.C. Parrish, D.E. Goll. J. Food Science 32 (1967).
- Buttkus, H. og H.L.A. Tarr. Food Technology 16 (1962) s. 84.
- Dannert, R.D. og A.M. Pearson. J. Food Science 32 (1967) s. 49.
- Dingle, J.R. og J.H. Hines. J. Fish Res. Board Can. 24 (1967) 1717.
- Dugal, L.C. Hypoxanthine in iced fresh water fish 24 (1967) s. 2229-2239. J. Fish. Res. Bd. Can.
- Fraser, D.I., J.R. Dingle, J.A. Hines. J. Fish. Res. Bd. Can. 24 (1967) s. 1837, 23 (1966) s. 1821.
- Fraser, D.E., D.P. Pitts og W.J. Dyer. J. Fish. Res. Bd. Can. 25 (1968) 239-253.
- Fraser, D.I., Sa. Punjamapiron og W.J. Dyer. J. Fish. Res. Bd. Can. 18 (1961) s. 641.
- Fraser, D.I., H.M. Weinstein og W.J. Dyer. J. Fish. Res. Bd. Can. 22 (1965) s. 83.
- Fujii, Y. og A. Suzuki. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab. No. 59, Aug. 1969.
- Hashimoto, Y. The technology of fish utilization. Ed. R. Kreuzer, Fishing News (Books) s. 57, 1965.
- Jones, N.R. Proc. 11th Intern. Congr. Refrig. Munich 1963, 917-922.
- Jones, N.R. og J. Murray. Biochem. Journ. 66 (1957) s. 5.
- Jones, N.R. og J. Murray. Biochem. J. 77 (1960) s. 567.
- Jones, N.R. og J. Murray. J. Sci. Food Agr. 162 (in press).
- Kassemsarn, B., B. Sanz Perez, J. Murray og N.R. Jones. J. Food Sci. 28 (1963) 28.

- Kuninaka, A., M. Kibi og K. Sakaguchi. Food Technol. 18 (1964) 287.
- Needham, D.M. Adv. in enzymology, 13 (1952) 151.
- Nazio, D.J. og N.G. Magar. J. Food Science 28 (1963) s. 3.
- Partmann, W. Arch. für Fischereiwissenschaft 5 (1954) s. 159.
- Partmann, W. Z. für Lebensmittel-Untersuch. 99 (1954) s. 341.
- Reay, G.A. og J.M. Shewan. Advances Food Research 2 (1949) 344.
- Saito, T. og K. Arai. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 22 (1957) 569.
- Saito, T., K. Arai og T. Yajima. Nature 184 (1959) s. 1415.
- Shewan, J.M. og N.R. Jones. J. Sci. Food Agr. 8 (1957) 491.
- Shimazono, H. Food Technol. 18 (1964) s. 294.
- Spinelli, J., M. Eklund, N. Stoll og D. Miyanchi. Food Technol. (1965) 19, s126.
- Spinelli, J., M. Eklund og D. Miyachi. J. Food Sci. 29 (1964) 710.
- Spinelli, J. J. Food Sci. 32 (1967) s. 38.
- Szentkiralyi, E.M. Arch. Biochim. Biophys. 67 (1957) s. 298.
- Tarr, H.L.A. Food Technol. 8 (1954) s. 15.
- Tarr, H.L.A. Fish muscle riboside hydrolases. Biochem. J. 59 (1955) 386.
- Tarr, H.L.A. Lingcod muscle purine nucleoside phosphorylase. Can. J. Biochem. Physiol. 36 (1958) s. 517.
- Tarr, H.L.A. og M. Leroux. Can J. Biochem. Physiol. 40 (1962) 571.
- Tarr, H.L. A. J. Food Science 31 (1966) s. 846.
- Tarr, H.L.A. J. Fish. Res. Bd. Can. 25 (1968) 1539.
- Tomlinson, N. og S.E. Geiger. The technology of fish utilization. s. 21.
- Tomlinson, N., V.M. Creelman, K.G. King. J. Fish. Res. Bd. Can. 17 (1960) s. 371.
- Tomlinson, N., V.M. Creelman, K.G. Reid. J. Fish. Res. Bd. Can. 17 (1960) s. 371.
- Tomlinson, N. og S.E. Geiger. J. Fish. Res. Bd. Can. 19 (1962) 997.
- Tomlinson, N. og S.E. Geiger. J. Fish. Res. Bd. Can. 20 (1963) 187.
- Wagner, J.R., D.S. Titus og J.E. Schade, Food Technol. 17 (1962) 730.
- Varga, S. og C.M. Blackwood, J. Fish. Res. Bd. Can. 26 (1969) 2523.
- Yoshida, T. og H. Kageyama. Japansk patent 732, 1956.

Måling av adenosinetrifosfat ved lagring av fisk i nedkjølt sjøvann

Metodikk: R.J.L. Allen, Biochem. J. 34 (1940) 858-865.

Følgende reagenser ble brukt:

I:	HClO <sub>4</sub> , ren kons. (60 %)	2 ml
II:	Amidol (1 g amidol + 18,3 g Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> natrium-metabisulfit)	2 ml
III:	8,3 % NH <sub>4</sub> -molybdat + 4H <sub>2</sub> O	1 ml

0,7-1,3 g kanin-muskel gnis ut i morter med 25 ml 10 % CCl<sub>3</sub>COOH. Morterne er på forhånd kjølt ned til ca. -20°C og syreoppløsningen er så kald som mulig uten å fryse. (Ved arbeider med frosk anvendes 6 ml syre til 0,1-0,15 g muskel). Ekstraktet filtreres og en tar ut 1 ml i 3 glass A, B og C.

I A bestemmes fritt fosfor etter Lowry og Lopez's metode (J. Biol. Chem. 162 (1946) 421-428). B og C tilsettes begge 1 ml 1,8 n HCl slik at de blir tilnærmelsesvis normal med hensyn til HCl. B settes i kokende vannbad i nøyaktig 7 min. og C i 15 min. Begge kjøles raskt i kaldt vann. Reagensene tilsettes og det fortynnes med vann til 25 ml. Avlesning etter 25 min. i spektrofotometer (dyp rødt filter Zeiss S 72).

Ved utregningen tas volumet av prøven med, slik at en ikke regner med 25 ml men med f.eks. 26,3 ml. Om der er noen forskjell på P-7 min. og P-15 min. trekkes dette fra P-7 min., idet hydrolysen av de langsomt spaltende fosfater som gir høyere P-15 min. antas å være lineær. Ved å trekke fritt fosfat A fra P-7 fås ATP-fosforet. Dette multipliseres med 8,4 som gir vekten av ATP. Antall γ ATP dividert med antall mg muskel/mg ekstrakt gir antall mg ATP/g muskel.

O.H. Lowry og J.S. Lopez. The determination of inorganic phosphorus in the presence of labile phosphor-esters. J. Biol. Chem. 162 (1946) 421-428.

Følgende forandringer er gjort fra Fiske og Subbarow's metode: pH forandres fra 0,65 til 4,0-4,2. NH<sub>4</sub>-molybdat-konsentrasjonen senkes fra 0,25 % til 0,1 % og 1-4 amino-naphtol-sulfonsyre erstattes med ascorbinsyre. Substansen som skal undersøkes deproteiniseres f.eks. i kald 0,3 N (5 %) CCl<sub>3</sub>COOH eller i 0,3 N (0,3 %) HClO<sub>4</sub>, eller om det dreier seg om særlig labile estere med mettet (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> inneholdende 0,1 N CH<sub>3</sub>COOH og 0,025 N CH<sub>3</sub>COONa, pH 4. Ved bruken av en av disse sure fellingsmåter bringes pH raskt til pH 4-4,2 med 4 vol 0,1 N Na-acetat. De fleste estere

er stabile tilstrekkelig lenge under disse betingelser. Ekstraktet fortynnes med puffer pH 4 til et P-innhold på 0,015-0,1 M-Mol (0,05-0,3 mg % P).

NH<sub>4</sub>-sulfat-uttrekket fortynnes minst 5 ganger. Til én volumdel ekstrakt tas 0,1 volum 1 % ascorbinsyre og 0,1 volumdel 1 % NH<sub>4</sub>-molybdat i 0,05 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Avlesning etter 5 og 10 min., bølglengde 700 mμ utføres samtidig under samme betingelser. Hvis der er forskjell mellom avlesning etter 5 og 10 min. ekstrapoleres til to. For å unngå innflytelse av enkelte inhibitorer bør vev fortynnes omtrent slik:

Hjerne og muskel: 150-250 ganger  
Lever: 300-500 ganger

Molybdat-oppl. kan eventuelt heves til 0,1 volumdel 1,5 %.

Beregning av adenosintrifosfat (ATP): ATP som mg P/100 g fisk:  $B - A - (C - B) f$  (25 + innveiet fisk), hvor A er verdien av fritt fosfor uten opphetning, B er verdien av fritt fosfor etter 7 min. ved 100°C, C er fritt fosfor etter 15 min. ved 100°C.

A: Uorganisk fosfor: f.eks.  $\frac{56(25+1,12)100}{1,12} = 130,3$  mg P/100 g fisk

B: ATP-fosfor:  $\frac{70(25+1,12)100}{1,12} = 163,0$       "-

C: Ribose-fosfor:  $\frac{71,6(25+1,12)100}{1,12} = 166,8$       "-

ATP-fosfor =  $163 - 130,3 - (166,8 - 163) = 28,9$       -

Adenosintrifosfat:  $28,9 \cdot 8,4 = 243$  mg ATP/100 g fisk

Ved omregning skal man teoretisk multiplisere med 8,16, i stedet multipliserer man med 8,4.

Måling av adenosintrifosfat ved lagring av fisk i nedkjølt sjøvann, mg ATP/100 g fisk.

Nr.	Prøve	Antall minutter lagret post mortem:												
		45	80	90	105	135	150	215	270	305	390	730	1440	1590
1	Torsk nydrept	243												0
2	"	111												0
3	"	141												0
4	"	204												0
5	"	413		192			211		200		228			
6	"	412	416			328			270		286	164	22	
7	"	255	254		135			61			14			

Diskusjon:

Sammenhengen mellom avbygningen av ATP og forandringen i muskel-proteinenes egenskaper er innviklet, således influerer hvilke andre ioner som er til stede, videre temperatur og pH.

Når saltkonsentrasjonen i fiskemuskel er over 0,5 Molar kan en måle forandringene ved å måle dobbelt-lysbryt, viskositet, lys-spredning og sedimentasjonsdiagrammet med ultra sentrifuge. Er saltkonsentrasjonen under 0,5 molar og de kontraktile muskel-proteiner ikke foreligger i løsning, da er undersøkelsesmetodene av grovere slag, f.eks. måling av forandringene i fiber- og partikkelstørrelsen i mikroskop, eller variasjoner i stivhet av geler, måling av sedimentasjonshastighet og pakningstetthet av partikler.

Det er bevist av Erdős i Szeged i 1943 at muskeldødsstivheten følger parallelt med nedgangen i ATP. Den inntreer når ATP synker under en kritisk verdi, ca. 20-30 % av det opprinnelige.

Bate-Smith og Bindel viste i tiden 1946-49 at dødsstivheten var avhengig av dyrets ernæringstilstand og konkluderte med at avbygningshastigheten ble bestemt av ATP-avbygningen.

Som det fremgår av våre målinger kan den tiden det tar før den hurtige ATP-avbygning tar til, være forskjellig etter som hvilken glycogen-reserve fisken har. I det så lenge det er glycogen for hånden, er ATP-avbygningen i balanse med resyntesen av ATP fra glycogen. Når så rigor for alvor inntreer holder resyntesen av ATP ikke lenger tritt med nedbrytningen på grunn av at glycogen reserven er uttørret. Den nøyaktige forandring inntreer når diffusjon av ATP til actomyosin-fiberen ikke holder tritt med fibrill-ATP-ases defosforylering.

Bendall hevder at dødsstivheten skyldes nye kryssbindinger mellom actomyosin-kjedene. Han hevder at når dette ikke inntreer ved vanlig muskelkontraksjon hvor det også er et fall i ATP, så skyldes det at i dette tilfelle skjer en tilførsel av ATP.

Når det gjelder muskelkontraksjonen har det hersket uenighet hvorvidt ATP-avbygningen inntreer under kontraksjonen eller relaksjonen. Mens tidligere arbeider anså relaksjonen som en ATP-ase aktiv prosess, hevder senere arbeider at relaksjonen er en passiv prosess.

Szent-Györgyi forklarer virkningen av temperaturen på utviklingen av rigor mortis ved at temperaturen senker ATP-ase aktiviteten, mens den influerer lite på diffusjons-hastigheten.

De funne verdier for ATP like etter at fisken er drept, tilsvarer det som er angitt av Mommarts in "Muscular contraction" (1950) som tilnærmete verdier pr. 100 g muskel: 250 mg ATP til 375 mg ATP (0,5  $\mu$  Mol.).

De målinger som er foretatt av Ulf Rambech viser lavere verdier, nemlig rundt 83 mg ATP/100 g torskemuskel, dette kan muligens skyldes at målingene er utført på en annen årstid.

Som tidligere nevnt varierer nedbrytningshastigheten av ATP for de enkelte fisk av samme fiskeslag, dels på grunn av ernæring, temperatur, tid og oksygeninnhold i fiskekummene, dels på grunn av muskeltretthet, men 24 timer etter at fisken var drept, deretter lagret i nedkjølt sjøvann, var all ATP spaltet.

Bergen, 1.9.1970

Måling av adenosinetriphosphat (ATP) i en ampulle med 10 mg ATP/ml

Kontroll av Allen's metode. Biochem. J. 34 (1940) s. 858.

0,5 ml av ampullen fylt opp med  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  10 % til 10 ml.

	Skala	$E_{660}$	p-kalibreringskurve
0 min.	7,08	0,1503	16
0 "	7,08	0,1503	16
7 "	2,23	0,653	68,5
7 "	2,08	0,683	71,25
15 "	2,00	0,699	73,5
15 "	1,88	0,727	76,25

$$A. \text{ Uorg. p: } \frac{16,0 \cdot 10 \cdot 1}{1,0 \cdot 0,5} = 320 \quad \gamma \text{ P}$$

$$B. \text{ ATP-P: } \frac{69,875 \cdot 10 \cdot 1}{1,0 \cdot 0,5} = 1397,5 \quad \gamma \text{ P}$$

$$C. \text{ Ribose-P: } \frac{74,875 \cdot 10 \cdot 1}{1,0 \cdot 0,5} = 1497,5 \quad \gamma \text{ P/ml ATP}$$

$$\text{ATP} = (B - A - (C - B)) \cdot 8,4$$

$$(1397 - 320 - (1497,5 - 1397,5)) \cdot 8,4 = 9,211 \text{ mg ATP/ml}$$

Resultatet stemmer bra med det oppgitte ATP-innhold i ampullen. På grunn av at ampullen er lagret ved  $0^\circ\text{C}$  i ca. 1 år er ATP-innholdet sunket fra 10 mg til 9,21 mg.

