

FISKERIDIREKTORATETS SKRIFTER

Serie Teknologiske undersøkelser

(*Reports on Technological Research concerning Norwegian Fish Industry*)

Vol. II. No. 5.

Published by the Director of Fisheries

Trimetylaminoxidets og urinstoffets reaksjoner
under lagring av saltvanns-bruskfisk og -benfisk

*The reactions of trimethylamineoxide and urea during storage of marine
elasmobranchs and teleosts*

Av

SVERRE HJORTH-HANSEN og KÅRE BAKKEN

(*Avdeling for Mikrobiologi,*

Fiskeridirektoratets Kjemisk-Tekniske Forskningsinstitutt)

1952

A.s John Griegs Boktrykkeri Bergen

Innledning.

Ved objektiv bedømmelse av lagret fisk som blir oppbevart ved konstant temperatur (som regel 0° C), tar man prøver av fisken til regelmessige tider, f.eks. annenhver dag og underkaster dem visse kjemiske og bakteriologiske analyser. På grunnlag av de funne resultater blir man i stand til å tegne en rekke lagringskurver av karakteristisk utseende. Man er klar over

1. at trimetylaminoksydmolekylet spaltes til trimetylamin,
2. at urinstoffmolekylet spaltes til ammoniakk,
3. at det også forekommer andre »precursors« enn urinstoff som går over til ammoniakk. Disse må antas å være f. e. kreatin, anserin og karnosin og kanskje også eggehvitestoffer.

Muligens finnes det også andre stoffer enn trimetylaminoksyd som, riktignok i liten målestokk, gir trimetylamin. Der dannes også dimetylamin, men hvilke »precursors« som gir dette stoff, er fremdeles ukjent.

Ved å bestemme bakterieantallet samt trimetylaminoksyd og urinstoff, som begge *avtar* under lagringen, og trimetylamin og ammoniakk (og eventuelt dimetylamin) som alle *tillar* under lagringen, vil man oppnå de nødvendige tall for å tegne de nevnte kurver (SHEWAN 1937—1938, HJORTH-HANSEN og BAKKEN 1947).

Saltvannsbenfisk inneholder bare spor av urinstoff, mens haier og skater inneholder mellom 1,2—2,3 g/100 g. Saltvannsfisk inneholder mellom 0,1—2,6 g/100 g trimetylaminoksyd (HJORTH-HANSEN 1945—1951, ennå ikke publisert). Forskjellen i innholdet av disse stoffer hos de forskjellige arter må antas å influere på forløpet av lagringen av dem.

Særlig vil man måtte anta at den urinstofffri benfisk-muskulatur *ikke* vil være utsatt for spaltning av urinstoffspaltende bakterier. Under lagring burde derimot haiarter og skater og rokker, da de inneholder begge stoffer i store mengder, komme til å inneholde både ammoniakk og trimetylamin. Imidlertid synes trimetylaminoksyd-spaltende bakterier å være sterkt undertrykt av de urinstoffspaltende, da fisken kan lagres meget lenge før der overhode dannes påviselige mengder trimetylamin (HJORTH-HANSEN og BAKKEN 1947).

Hvis man lagrer fisken som farse, press-saft, vannuttrekk, »jernserum» eller helt stykke av en enkel fisk, altså i mest mulig homogen tilstand, vil man, når man utfører alle de nevnte analyser, oppnå innbyrdes sammenliknbare tall. Hvis man derimot lagrer en fiskesort i flere enkelt-eksemplarer, er det for forsøket selv uten interesse å bestemme trimetylaminoksyd i hvert enkelt av dem, da innholdet av dette stoff varierer meget fra fisk til fisk av samme art (BEATTY [1939], HJORTH-HANSEN [1945—1951], ennå ikke publisert). SHEWAN [1951] har for øvrig vist at størrelsen av fisken (skater, torsk, hyse, sei, rødspette) spiller stor rolle for konsentrasjonen av trimetylaminoksyd.

Kurveforløpet.

Av våre mange lagringsforsøk for torsk og sild har vi funnet at når trimetylaminoksydinnholdet går tilbake, øker samtidig trimetylamininnholdet, mens ammoniakkinnholdet i de første dager går litt tilbake for igjen å stige, og summerer vi tallene for trimetylaminoksyd N og trimetylamin N og tegner et diagram, får vi en kurve som praktisk talt løper parallellt med x-aksen hvilket viser at den dannede trimetylamin må skrive seg fra det spaltete oksyd.

Diagrammet får følgende generelle utseende:

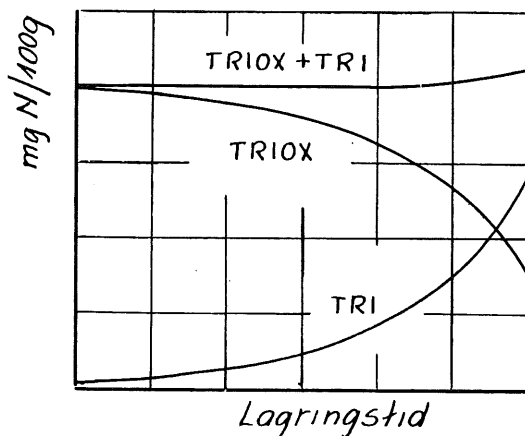


Fig. 1.

Mot slutten av lagringsperioden går gjerne summekurven *svakt* oppover, hvilket må tydes derhen at også andre stoffer enn trimetylaminoksyd spaltes til trimetylamin, sannsynligvis da av spesielle bakterier som først på dette tidspunkt kommer i virksomhet.

Tilsvarende utseende har kurver for urinstoff/ammoniak. Her synker riktignok summekurven *svakt*, vel fordi muskulaturen antar så høy pH-verdi at ammoniak tapes ved fordunsting.

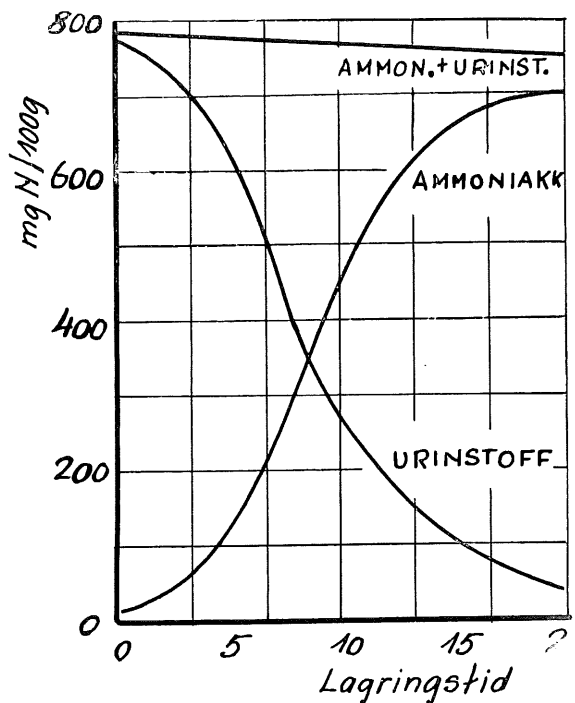


Fig. 2.

Ved undersøkelser over lagring av *håbrand* (*Lamna cornubica*) og *brugde* (*Cetorhinus maximus*) kom vi imidlertid til vesensforskjellige resultater og dem legger vi fram i dette arbeide. Det viste seg ved disse to haiarter at summekurven stadig sank. Kurvene fikk derfor følgende utseende for *brugde* (fig. 3 og 4, s. 8 og 9), et forløp som generelt også gjelder for *håbrand*.

Gjentatte analyser for et og samme forsøk med *håbrand* (*Lamna cornubica*) ga samme resultat og ved nye forsøk kunne fenomenet reproduseres. Lagringsforsøk med sjøfanget *laks* (*Salmo salar*) ga også samme resultat for trimetylaminoksyd og trimetylamin. Forsøk med *skate* (*Raja batis*), *torsk* (*Gadus morrhua*), *håkjerring* (*Somniosus microcephalus*) og *pigghå* (*Squalus acanthias*) viste *ikke* denne tilbakegang.

Metodikk.

Oppbevaring og prøvetaking.

Av *brugde* ble skåret ut stykker på ca. 1/2 kg som ble innpakket i vokset papir og dekket med is.

Laks ble lagret hel dekket med is.

Av h å b r a n d ble dels skåret ut stykker på ca. 1/2 kg, som ble emballert i vokspapir og dekket med is, dels ble fisken lagret hel i store kasser som fyltes til randen med knust is. Ved prøvetakingen ble store skiver skåret av fisken og det lag som var ytterst ble fjernet.

Av farse av sløyet og flådd p i g g h å og t o r s k ble framstillet vannekstrakt som ble lagret ved 0° C.

S k a t e [*Raja batis*] ble oppbevart som farse ved 0° C.

Tilberedelse av prøven.

Der ble framstillet et serum av 200 g farse, vann og enten kolloid jernhydroksyd eller saltsyre, ved pH 5,2, under oppvarming til 70° C og totalvolumet var 1 000 ml.

Analysemetoder.

Total flyktig N (se CONWAY og BYRNE, [1935], HJORTH-HANSEN og BAKKEN, [1947]).

Trimetylamin N (BEATTY og GIBBONS, [1937], HJORTH-HANSEN, [1951]).

Trimetylaminoksyd N (BEATTY, [1937], HJORTH-HANSEN, [1951]).

Urinstoff (CONWAY, [1947], HJORTH-HANSEN [1951]).

Egne undersøkelser.

1. Brugde.

Muskulaturen var hvit som svinespekk, men ganske fettfri (0,5 g fett/100 g). Analysene viste følgende tall:

Tabell 1. Analyser av brugde lagret ved 0° C.

Analyses of basking shark muscle stored at 0° C.

Lagrings- tid døgn	pH	Am- moni- akk (a)	Urin- stoff (b)	a + b	Omsatt på annen måte	Tri (a)	Triox (b)	a + b	Omsatt på annen måte
mg N/100 g									
0	—	23	765	788		2	294	296	
4	7,14	18	672	690	88	1	264	265	31
6	—	17	616	633	155	1	237	238	58
11	5,46	15	518	533	255	2	203	205	91
13	5,38	14	481	495	293	2	202	204	92
15	5,50	17	499	516	272	2	203	205	91
19	5,66	26	331	357	431	2	150	152	144
21	5,84	36	359	395	393	2	150	152	144
25	6,96	74	201	275	513	5	111	116	180
28	7,42	94	117	211	577	10	—	—	—

Av tabellen og av fig. 3 og 4 framgår at store mengder urinstoff N og trimetylaminoksyd N *ikke* lar seg redegjøre for ved hjelp av de tall vi finner for ammoniakk N og trimetylamin N. Etter 21 døgn er således ca. 2 % av urinstoffet omsatt til ammoniakk mens praktisk talt intet av trimetylaminoksydet er omsatt til trimetylamin, mens samtidig litt over 50 % av urinstoffet og nesten 50 % av trimetylaminoksydet er omsatt på annen måte.

2. Håbrand.

Det eksemplar som ble undersøkt var et lite dyr, som veiet ca. 30 kg i sløyet tilstand. For såvidt mulig å kunne analysere en representabel gjennomsnittsprøve ble alltid blandet prøver av »hodestykket« og av »halestykket«.

Tabell 2. Analyser av håbrand lagret ved 0° C.
Analyses of porbeagle muscle stored at 0° C.

Lagrings- tid døgn	Ammo- niakk (a)	Urin- stoff (b)	a + b	Omsatt på annen måte	Tri (a)	Triox (b)	a + b	Omsatt på annen måte
mg N/100 g								
1	10	781	791		1	220	221	
4	11	703	714	77	1	205	206	15
6	9	660	669	122	1	202	203	18
9	14	663	667	114	1	197	198	23
11	14	535	549	242	1	160	161	60
14	21	415	436	355	1	126	127	94
16	32	449	481	310	3	133	136	85
21 ¹	72	307	379	412	15	102	117	104
27	180	153	333	458	55	44	99	122
39	208	10	218	572	51	9	60	161

¹ Svakt bedervet lukt.

Av tabell 2 framgår det at urinstoff og trimetylaminoksyd også i håbrand omsettes i større mengder enn hva der svarer til den mengde ammoniakk N og trimetylamin N som dannes. Etter 16 døgn er knapt 3 % av urinstoffet omsatt til ammoniakk og vel 1 % av trimetylaminoksydet til trimetylamin mens ca. 40 % av urinstoffet og nesten like meget av trimetylaminoksydet må være omsatt på annen måte.

3. Håbrand.

To relativt store eksemplarer på ca. 70 kg ble prøvetatt samtidig og prøvene blandet og analysert samlet.

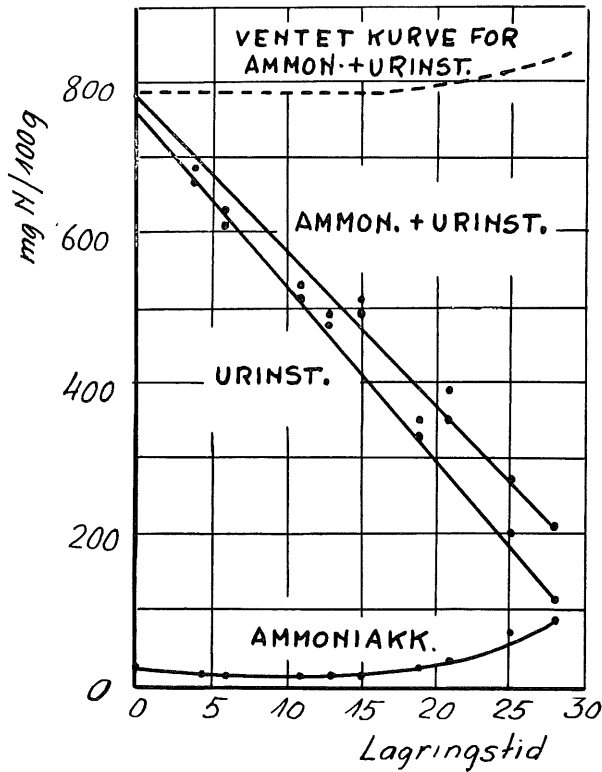


Fig. 3. Lagring av brugde. Urinstoff og ammoniakk.
Storage of basking shark. Urea and ammonia.

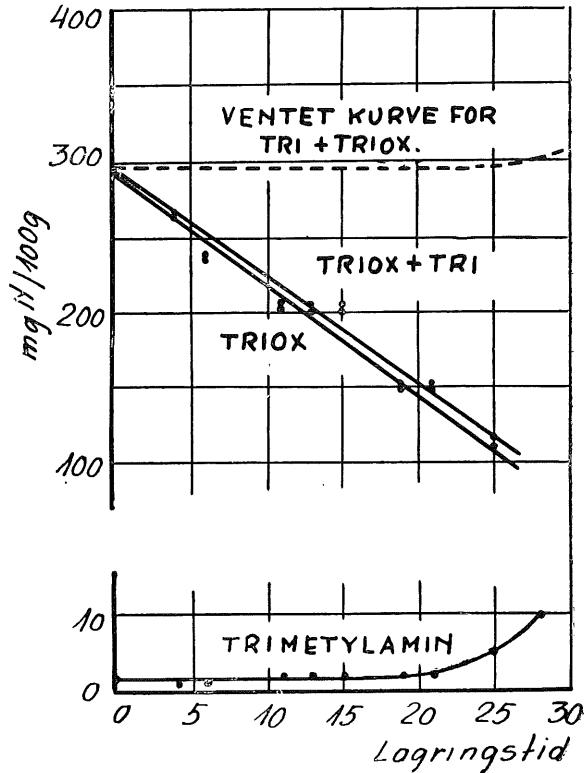
Tabell 3. Analyser av håbrand lagret ved $\div 1^{\circ}$ C.
Analyses of porbeagle muscle stored at $\div 1^{\circ}$ C.

Lagrings- tid døgn	Ammo- niakk (a)	Urin- stoff (b)	a + b	Omsatt på annen måte	Tri (a)	Triox (b)	a + b	Omsatt på annen måte
mg N/100 g								
4	10	789	799	—	1	229	230	—
6	15	791	806	—	2	221	223	7
9	16	745	761	38	2	214	216	14
12	23	735	758	41	3	204	207	23
17	38	710	748	51	5	182	187	43
20	58	640	698	101	8	181	189	41
26	104	542	646	135	11	173	184	46
29	181	390	571	228	9	145	154	76

Etter 17 døgn ved $\div 1^{\circ}$ C (hvor forandringene skjer langsommere enn ved 0° C) er ca. 10 % av urinstoffet og ca. 20 % av trimetylaminoksydet omdannet i det det er dannet ca. 3,5 % ammoniakk og ca. 2 % trimetylamin. Også her er omdannet betydelige mengder på annen måte, nemlig ca. 6 % av urinstoffet og 18 % av trimetylaminoksydet.

Fig. 4. Lagring av brukde.
Triox og trimetylamin.

*Storage of basking shark.
Trimethylamineoxide and
trimethylamine.*



4. Laks.

Laksen fanget i sjøvann ble lagret i hel tilstand ved 0° C.

*Tabell 4. Analyser av laks lagret ved 0° C.
Analyses of salmon muscle stored at 0° C.*

Lagringstid døgn	Total flyktig N	Trime- tylamin N (a)	Triox N (b)	a + b
	mg/100 g			
4	14,5	0,8	10,1	10,9
7	13,9	0,5	8,3	8,8
10	18,1	2,2	3,5	5,7

Hos denne fisk er riktignok konsentrasjonen av trimetylaminoksyd meget lav, men der synes å være en tilbakegang i trimetylaminoksyd som er større enn hva der framgår av trimetylaminmengden etter 7 og 10 døgn. Laksen er urinstoffri.

5. Håkjerring.

En håkjerring på ca. 80 kg, fanget knapt et døgn før forsøket kom i gang, ble sendt i iset tilstand hit. Bare den helt hvite muskulatur ble analysert, idet all rød muskulatur ble skåret bort.

Tabell 5. Analyser av håkjerring lagret ved 0° C.
Analyses of greenland shark muscle stored at 0° C.

Lagrings- tid døgn	pH	Ammono- niakk (a)	Urin- stoff (b)	a + b	Tri (a)	Triox (b)	a + b
mg /100 g							
1	6,54	5	723	728	1	231	232
3	6,23	5	740	745	1	227	228
6	6,03	5	739	744	1	229	230
9	6,20	6	705	711	1	229	230
11	6,23	6	733	739	1	239	240
13	6,36	10	739	749	1	245	246
15	6,54	13	724	737	2	232	234
18	6,62	14	756	770	4	256	260
22	7,35	72	697	769	11	239	250
27	7,22	39	742	781	29	220	249

En tilbakegang i urinstoff og trimetylaminosyd kunne *ikke* påvises.

6. Pigghå.

Denne fisk var ca. 1 uke gammel ved ankomsten hit. Pigghåen ble oppbevart som en suspensjon av farsen i destillert, sterilt vann.

Tabell 6. Analyser av pigghåsuspensjon ved 0° C.
Analyses of a waterextract of dogfish muscle stored at 0° C.

Lagrings- tid døgn	pH	Ammono- niakk (a)	Urin- stoff (b)	a + b	Tri (a)	Triox (b)	a + b
mg N/100 g							
0	6,58	17	721	738	2	143	145
3	6,55	24	749	773	2	150	152
6	7,14	44	755	799	53	100	153
8	7,57	69	729	798	149	0	149

Heller ikke ved pigghå er der noen tilbakegang av urinstoff og trimetylaminosyd som ikke kan redegjøres for ved ammoniakk- og trimetylamin-analyse.¹ Interessant er å legge merke til at trimetylamin-

¹ *Elliot* (1952, under trykning) finner også at summen av trimetylamin N og trimetylaminosyd N er konstant under lagring av pigghå.

oksydet etter 8 døgn er spaltet totalt under de givne lagringsbetingelser mens urinstoffet ikke er angrepet. Da urinstoffspaltende bakterier må antas hovedsakelig å være å finne på fiskens skinn og da vi i dette tilfelle har flådd den, er antallet av slike bakterier meget sterkt nedsatt. Forholdet mellom urinstoffspaltende og trimetylaminoksydspaltende bakterier må antas å være sterkt forrykket. Trimetylaminoksydspalterne må være kommet med på grunn av kontakt-infeksjon og dessuten ved infeksjon fra kvernen. Muligens kan dette forklare lagringsforløpet.

7. Skate.

Ett døgn etter fangsten ble vingene av en ca. 3 kg glattrokke malt til farse som ble lagret i is under forsøket.

Tabell 7. Analyser av skatefarse lagret ved 0° C.
Analyses of minced skatewings stored at 0° C.

Lagrings- tid døgn	pH	Ammo- niakk (a)	Urin- stoff (b)	a + b	Tri (a)	Triox (b)	a + b
mg N/100 g							
1	6,55	10	775	785	1	197	198
4	7,95	92	690	782	1	195	196
7	8,95	360	385	745	1	194	195
9	8,95	375	350	725	1	195	196
15	9,10	670	95	765	10	186	196
20	8,83	700	45	745	16	186	202

Heller ikke denne fisk viser en tilbakegang i urinstoff eller trimetylaminoksyd som ikke kan redegjøres for ved de tall man finner ved analysene av ammoniakk og trimetylamin.

8. Torsk.

Torsken var slaktet samme dag som forsøket ble satt i gang. Den ble oppbevart i form av sterilt »jern-serum« (HJORTH-HANSEN 1943) og dette ble tilsatt NaOH (se tabell 8.) til pH = 6,4 og en blandingskultur av fiskebakterier fra torskeslim.

9. Torsk.

Torsken var drept samme dag forsøket kom i gang. Den ble oppbevart i form av homogenisert vannekstrakt av 700 g farse og 4 liter H₂O. 4 liter ekstrakt ble fordelt likt på 2 ståkolber. Til den ene ble satt 20 g urinstoff pro analysi. Oppbevaringstemperaturen var 0° C.

Tabell 8. Analyser av jernserum av torsk.
Analyses of an iron »serum« of cod stored at 0° C. Inoculation with bacteria from cod slime.

Lagringstid døgn	Total flyktig N	Ammo- niakk	Tri (a)	Triox (b)	a + b
mg/100 g					
0	15	11	4	65	69
2	13	8	5	65	70
5	25	16	9	61	70
7	28	11	17	53	70
10	54	15	39	33	72

Der skjer ingen tilbakegang av trioxmengden som ikke kan redegjøres for ved hjelp av trimetylaminanalysene.

Tabell 9. Analyser av lagret torskefarsesuspensjon med og uten tilsetning av urinstoff.
Analyses of suspensions of minced cod muscle with and without addition of urea. Stored at 0° C.

Lagringstid døgn	Ammoniakk (a)	Urin- stoff (b)	a + b	Tri (a)	Triox (b)	a + b
mg N/100 g						
0	uten 1,6	0		0,2	9,7	9,9
	med 1,6	454	456	0,2	9,7	9,9
3	uten 1,6	0		0,2	9,7	9,9
	med 1,6	454	456	0,2	9,7	9,9
6	uten 1,6	0		0,2	9,7	9,9
	med 1,8	454	456	0,2	9,7	9,9
10	uten 1,8	0		0,4	9,4	9,8
	med 4,0	454	458	0,4	8,8	9,2
13	uten 2,3	0		1,1	9,4	10,5
	med 8,1	454	462	1,4	9,8	10,2
17	uten 5,8	0		5,3	4,9	10,2
	med 35,6	426	462	7,5	3,5	11,0
20	uten 11,5	0		10,6	0,0	10,6
	med 70,0	392	462	11,5	0,0	11,5

Også her er summen av ammoniakk N og urinstoff N og summen av tri N og triox N konstant, bortsett fra en svak stigning mot slutten av lagringstiden. Som før nevnt må det være andre stoffer tilstede som også kan spaltes til trimetylamin. De bakterier som dette må antas å skyldes, kommer derfor i virksomhet på et meget sent stadium i lagringsperioden.

Videre framgår av tabellen at urinstoffet, i et hvert fall i den konsentrasjon som her er brukt, virker initierende på dannelsen av ammoniakk og også, riktignok i mindre grad, på dannelsen av trimetylamin.

Resumé.

Ved undersøkelser over holdbarheten av brukte, håbrand og laks ved temperaturer like ved 0°C ($\div 1^{\circ}\text{C}$ og den temperatur som oppnås ved dekking med is) kunne påvises at der omsettes større mengder urinstoff og trimetylaminoksyd enn der kan redegjøres for ved den mengde ammoniakk og trimetylamin som dannes.

Ved pigghå, håkjerring, skate og torsk kunne slike omsetninger *ikke* påvises.

Årsaken til disse omsetninger hos brukte og håbrand og laks er foreløpig ukjent, men vi vil gjøre oppmerksom på fenomenet, da det såvidt oss bekjent, ikke er iaktatt tidligere.

Summary.

Storage experiments performed with muscles of porbeagle, basking shark and salmon at temperatures near 0°C indicated that more urea and more trimethylamineoxide were splitted than could be estimated by analyses of ammonia and trimethylamine. The same phenomenon did *not* take place with muscles of cod, greenland shark, skatewings and dogfish.

Litteratur.

- 1937 BEATTY, S. A., Prog. Rep. Biol. Bd. Canada, no. 20. 3.
— og GIBBONS, N. E., J. Biol. Bd. Can. **3**. 77.
- 1938 — Journ. Fish. Res. Bd. Canada. **IV**. 63.
- 1939 — Journ. Fish. Res. Bd. Canada. **IV**. 229.
- 1947 CONWAY, E. J., *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*, London.
- 1952 ELLIOT, R. P., Food Research (under trykning.)
- 1943 HJORTH-HANSEN, S., Fiskeridirektoratets Skrifter, Serie Und. St. F., **1**. 4.
- 1947 — og BAKKEN, K., Fiskeridirektoratets Skrifter. Serie Und. St. F. **1**. 6.
- 1951 — Fiskeridirektoratets Skrifter, Serie Tekn. Und. **2**. 2.
— Analytica Chimica Acta (under trykning):
- 1938 SHEWAN, J. M., Rep. Food Invest. Bd. London 1937. 75.
- 1939 — Rep. Food Invest. Bd. London 1938. 79.
- 1951 — Biochemical Society Symposia no. 6. 1951.