

## **Zur Frage der Bestimmung des Frischezustandes von Fischen.**

Von

**W. PARTMANN.**

Mitteilung aus der Bundesforschungsanstalt für Lebensmittel frisch-  
haltung und Konservierung, Karlsruhe.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 26. Juli 1951.)

Die Bewertung des Frischezustandes von Fischen erfolgt noch heute in der Praxis meist subjektiv. Sicher vermag eine durch ein geschultes Personal durchgeführte organoleptische Testung eine große Menge dieses wertvollen, aber leicht verderblichen Nahrungsmittels schnell zu beurteilen, wie das z. B. nach Anlandung der Fänge vor den Auktionen in unseren Fischereihäfen der Fall ist. Da aber ein solches Verfahren dann, wenn man reproduzierbare Ergebnisse erzielen will, an einen bestimmten Personenkreis von Prüfern gebunden ist, wird man bei kleineren, genauer zu untersuchenden Beständen eine wenig Zeit erfordernde, objektive Methode vorziehen.

An der Zusammensetzung von Fleisch sind Kohlenhydrate, Fette und Eiweiße beteiligt. Testmethoden werden also auf Veränderungen einer bzw. mehrerer dieser Komponenten Bezug nehmen müssen. Der mengenmäßig geringe Kohlenhydratanteil ist für die ersten, durch Messung des  $p_{\text{H}}$ -Wertes (oder elektrometrische Titration) erkennbaren postmortalen Veränderungen der Fischmuskulatur von großer Bedeutung. Fettveränderungen werden bei Magerfischen und kurzen Lagerzeiten weniger interessieren, wenngleich sie auch eine große Rolle bei der Gefrierlagerung von Fettfischen über lange Zeit spielen. Bei Lagerung oberhalb des Gefrierpunktes wird man der Proteolyse große Beachtung schenken müssen. Bewährt haben sich vor allen Dingen Testmethoden, die die niederen Eiweißabbauprodukte erfassen. In fortgeschrittenen Stadien der Eiweißzersetzung wird durch die Zunahme dieser und anderer alkalischer Produkte (Trimethylamin) der  $p_{\text{H}}$ -Wert ins alkalische Bereich verschoben.

Neben den erwähnten 3 großen Gruppen müssen wir als charakteristischen Bestandteil des Muskelfleisches — insbesondere der Seefische — das Trimethylamin-oxyd erwähnen, das bei der Lagerung zu Trimethylamin reduziert wird. Der Gehalt an Trimethylamin ist in manchen Fällen als Maßstab für den Frischezustand herangezogen worden.

Neben den Methoden, die physikalische oder biochemische Veränderungen einer der erwähnten Komponenten erfassen, würden objektive Methoden besonders interessieren, die das gesamte komplexe Geschehen während der Lagerung erkennen lassen. Möglichkeiten liegen in dieser Hinsicht auf den Gebieten der histologischen bzw. histochemischen Untersuchungsmethoden. Keine der bekannten befriedigt restlos.

In vielen Fällen wird die Auswahl der anzuwendenden Methode davon abhängig sein, ob man bakteriologische oder autolytische Veränderungen beurteilen will; in jedem Falle aber wird man stets eine solche vorziehen, die mit den organoleptischen Befunden gut übereinstimmt. Rein autolytische Vorgänge werden im allgemeinen in der Fischmuskulatur durch die bakteriellen überdeckt. Will man sie im Gewebe und nicht im Gewebebrei erfassen, so ist es zweckmäßig, zunächst festzustellen, ob die Ausgangswerte unmittelbar nach dem Tode von Fisch zu Fisch, innerhalb einer Fischart und innerhalb der Muskulatur eines Fisches konstant sind. Zur Lösung dieses normalerweise wenig beachteten Fragenkomplexes soll im folgenden beigetragen werden. Es mag damit zugleich unterstrichen werden, wie schwierig es ist, aus den Befunden an nur wenigen biologischen Objekten zu allgemein gültigen Ausgangswerten zu kommen und in wie hohem Ausmaß z. B. selbst die Vorgeschichte eines Tieres vor dem Tode für die Anfangswerte und weiteren postmortalen Veränderungen seiner Gewebe von Bedeutung sein kann.

## A. Die Ausgangswerte und ihre biologische und individuelle Streuung.

### 1. Die Wasserstoffion-Aktivität ( $p_{\text{H}}$ -Wert).

Bei wohl keiner der bisher verwandten Testmethoden hat sich die individuelle Schwankung im Anfangswert speziell in Abhängigkeit von der letzten Lebensphase der untersuchten Fische so deutlich gezeigt, wie bei der Bestimmung des  $p_{\text{H}}$ -Wertes.

Insbesondere BATE-SMITH<sup>1</sup> hat darauf hingewiesen, daß starke Unterschiede im Glykogenanfangsgehalt, der von der Fütterung, Training in der Muskelarbeit und Intensität der Muskelbewegungen vor dem Tode abhängig sein kann, bei Warmblütern vorliegen. Aber außerdem ist die Länge des Todeskampfes für die Menge der aus Glykogen gebildeten Milchsäure und damit für den  $p_{\text{H}}$ -Wert unmittelbar nach dem Tode von Bedeutung. Die Größe der Glykogenreserve bestimmt dann unter den postmortalen, anaeroben Verhältnissen das weitere Absinken des  $p_{\text{H}}$ -Wertes während der Totenstarre, wobei dem Zusammenbruch des Adenosintriphosphats für die Milchsäurebildung wie für das Steifwerden des Muskels während des „rigor mortis“ eine besondere Rolle zukommt<sup>1</sup>. In Anlehnung daran hat REAY<sup>2</sup> die Verhältnisse bei Fischen diskutiert und darauf hingewiesen, daß auch bei ihnen diese Abhängigkeiten vorliegen. Setzt man also voraus, daß Fische einer Art von gleichem physiologischen Anfangszustand und damit gleichem Muskelglykogengehalt einen Todeskampf von unterschiedlicher Länge durchmachen müssen, so wird auch der  $p_{\text{H}}$ -Wert gleich nach dem Tode unterschiedlich sein. Von Fischart zu Fischart treten ebenfalls deutlich meßbare Unterschiede auf. So wurde von HJORTH-HANSEN<sup>3</sup> 1943 für Heilbutte — allerdings auf dem Höhepunkt der Totenstarre — ein  $p_{\text{H}}$ -Wert von 5,5 angegeben, während er zu diesem Zeitpunkt bei normal gefangenen Schellfischen zwischen 6,2—6,6 betrug<sup>2</sup>. Aus diesen Befunden ist zu folgern, daß der  $p_{\text{H}}$ -Wert in den Anfangsstadien der Zersetzung sehr große Streuungen aufweist, daher bestenfalls als Relativ-Methode und dabei sogar nur zum Vergleich von Individuen einer Art verwandt werden kann. LÜCKE und GEIDEL<sup>4</sup> lehnen ihn zur Bestimmung des Frischezustandes vollkommen ab.

Anders ist es in fortgeschrittenen Stadien, in denen die basischen Eiweißabbauprodukte die durch den Kohlenhydratabbau bedingten Unterschiede überdecken. Dann kann der  $p_{\text{H}}$ -Wert in der Nähe der Fleischoberfläche ein guter Maßstab für den Verderbenheitsgrad sein<sup>5</sup>.

Für Veränderungen des  $p_{\text{H}}$ -Wertes spielt natürlich die Pufferfähigkeit der Probe eine Rolle.

<sup>1</sup> BATE-SMITH, E. C.: The physiology and chemistry of rigor mortis with special reference to the aging of beef. *Advances in Food Research*. Hrsg. von E. M. MRAK und G. F. STEWART, Bd. I, S. 1, New York: Academic Press Inc., Publishers 1948.

<sup>2</sup> REAY, G. A.: *Refrig. J.* (Australien) **3**, 160 (1949).

<sup>3</sup> HJORTH-HANSEN, S.: *Rep. Norweg. Fish. Res. Lab.* **1**, No. 4 (1943).

<sup>4</sup> LÜCKE, F., u. W. GEIDEL: *Diese Z.* **70**, 441 (1935).

<sup>5</sup> SIGURDSSON, G. J.: *Ind. Engng. Chem., Analyt. Edit.* **19**, 892 (1947).

STANSBY und LEMON<sup>1</sup> benutzten bei ihrer elektrometrischen Titration den Verbrauch an Säure, um in wäßrigem Fischmuskelextrakt vom Anfangs-pH auf pH 6 („B-Wert“) und von pH 6 auf pH 4,28 („A-Wert“) zu kommen, als Maßstab zur Feststellung des Frischezustandes von Seefischen. Nach diesen Verfassern und auch nach C. L. CUTTING<sup>2</sup> steigen die „B-Werte“ und fallen die „A-Werte“ mit zunehmender Lagerzeit. Bei dem Versuch einer theoretischen Klärung dieses Befundes fand neuerdings R. HACKER<sup>3</sup>, daß die „A-Werte“ bei zunehmender Zersetzung ansteigen. Diese Diskrepanz zwischen beiden Ergebnissen läßt sich u. E. möglicherweise dadurch erklären, daß nur eine der 4 von HACKER untersuchten Fischarten eine Seefischart (Kabeljau) war, deren Vorgeschichte vom Tode bis zur Verarbeitung vermutlich nicht mit der der untersuchten Süßwasserfische übereinstimmte. Nun besitzen aber nur die Seefische (vgl. weiter unten) beträchtliche Mengen an Trimethylaminoxid, das — wie HACKER auch in Modellversuchen fand — in dem betreffenden pH-Bereich als guter Puffer bekannt ist<sup>3</sup>. Das aus dem Aminoxyd entstehende Trimethylamin besitzt dagegen eine geringere Pufferfähigkeit.

Selbst wenn wir voraussetzen, daß bei der Proteolyse von reinem Eiweiß allgemein eine Zunahme der Pufferkapazität erfolgt, ist es durchaus möglich, daß bei Seefischen — eben im Gegensatz zu Süßwasserfischen — bis zu einem weit über die Genußtauglichkeit hinausreichenden Stadium eine Gesamtabnahme der Pufferfähigkeit resultiert. Endgültiges kann natürlich erst gesagt werden, wenn entsprechende Modellversuche das komplexe Zusammenwirken der vielen veränderlichen Faktoren geklärt haben. Vorläufig ist unseres Erachtens die elektrometrische Titration nur mit Vorbehalt als Testmethode zu verwenden. Hinzu kommt noch, daß die Ausgangswerte von Individuum zu Individuum voraussichtlich beträchtlich schwanken werden, da ja schon bei den pH-Werten bemerkenswerte Unterschiede auftreten können. Das bedeutet aber, daß auch diese Methode bei Beobachtung geringfügiger postmortalen Veränderungen nur als Relativmethode angewandt werden kann.

## 2. Der Trimethylaminoxidgehalt.

Von den Lagerveränderungen der Seefische ist die Zunahme des Trimethylamin-gehaltes besonders auffallend und geradezu charakteristisch. Man weiß, daß es hier postmortal allein oder zumindest vom überwiegend größten Teil aus dem in der Muskulatur und anderen Organen vorhandenen Trimethylaminoxid gebildet wird<sup>4</sup>.

Das Trimethylaminoxid hat möglicherweise im lebenden Seefisch eine osmoregulatorische Funktion zu erfüllen, zumal es auch in Organen anderer Meerestiere, z. B. in der Cephalopodenmuskulatur, in beträchtlichen Mengen gefunden wurde<sup>5</sup>. Da speziell Seetange einen relativ großen Gehalt an Trimethylaminoxid aufweisen, ist anzunehmen, daß es direkt oder indirekt mit der Nahrung vom Fischorganismus aufgenommen wird<sup>6</sup>. Dafür spricht auch der Befund von HATTORI und HASEBE, daß in der Fischmuskulatur der Gehalt an Trimethylaminoxid im Winter in Meeren sehr kalter Zonen abnimmt<sup>7</sup>. In Süßwasserfischen konnten nur geringe Mengen an Trimethylaminoxid gefunden werden<sup>8</sup>. Deshalb erreicht hier die Trimethylaminbildung nach dem Tode längst nicht das für die Seefische typische Ausmaß, wenn auch in ganz geringem Umfange Abbauprodukte des Lecithins, Cholins und der Betaine zusätzlich daran beteiligt sein können<sup>9</sup>.

Für die Anwendbarkeit des Trimethylaminrestes spielt in manchen Fällen auch wieder die Streuung der Ausgangswerte an Trimethylaminoxid von Tierart zu

<sup>1</sup> STANSBY, S., u. J. M. LEMON: Ind. Engng. Chem. Analyt. Edit. 5, 208 (1933).

<sup>2</sup> CUTTING, C. L.: Rep. Food Inv. Board 1937, S. 78.

<sup>3</sup> HACKER, R.: Diese Z. 90, 361 (1950).

<sup>4</sup> BEATTY, S. A.: J. Fish. Res. Board Canada 4, 63 (1938). — D. W. WATSON: J. Fish. Res. Board Canada 4, 252 (1939). — D. W. ANDERSON, u. C. R. FELLERS: Food Technol. 3, 271 (1949).

<sup>5</sup> HENZE, M.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 91, 230 (1914).

<sup>6</sup> KAPPELLER-ADLER, R., u. T. CSATÓ: Biochem. Z. 224, 378 (1903).

<sup>7</sup> HATTORI, Y., u. T. HASEBE: J. Pharmac. Soc. Japan 57, 266 (1937); ref. in Chem. Zbl. 1938, II, S. 1509.

<sup>8</sup> LINTZEL, W., H. PFEIFFER u. J. ZIPPEL: Biochem. Z. 301, 29 (1939).

<sup>9</sup> ACKERMANN, D., u. H. SCHÜTZE: Arch. f. Hyg. 73, 145 (1911). — HOPPE-SEYLER, F. A.: Verhandl. phys.-med. Ges. Würzburg 53, 24 (1928). — KAPPELLER-ADLER, R., u. J. KRAËL: Biochem. Z. 224, 364 (1930).

Tierart und von Individuum zu Individuum innerhalb einer Fischart eine große Rolle. Bisher vorliegende Untersuchungen an Seefischen zeigen, daß auch hier, ähnlich wie beim  $p_{\text{H}}$ -Wert, Ernährungszustand, Nahrung und Alter für die beträchtlichen individuellen Schwankungen verantwortlich zu machen sind<sup>1</sup>. Laichzeit und Temperaturverhältnisse spielen außerdem eine große Rolle<sup>2</sup>.

Als Testmethode für autolytische Veränderungen ist die Trimethylaminbestimmung nicht geeignet, da gezeigt werden konnte, daß die Bildung dieses Amines und ebenfalls des Dimethylamins durch Bakterientätigkeit erfolgt<sup>3</sup>. Außerdem kann der Methode auch zur Beurteilung rein mikrobieller Veränderungen bei Süßwasserfischen keine Bedeutung beigemessen werden, da hier die Trimethylaminbildung aus den oben erwähnten Gründen weit hinter den proteolytischen Erscheinungen zurückbleiben dürfte.

Der Zusammenhang mit mikrobiellen Zersetzungsprozessen bei Seefischen ist häufig untersucht worden. Besonderes Verdienst erwarben sich WATSON<sup>4</sup> und TARR<sup>5</sup>, die zeigen konnten, daß gewisse Bakterienstämme — nach TARR waren es 3 von 30 untersuchten — mit Hilfe eines von diesem Autor näher beschriebenen Enzyms, der Triaminoxidase, Trimethylaminoxid zu Trimethylamin reduzieren. Dabei spielen die während der Fischzersetzung anfallenden Kohlenhydratabbauprodukte sowie deren Phosphorsäureester und auch gewisse Aminosäuren eine wichtige Rolle als Wasserstoffdonatoren. Aus diesen Untersuchungen und den Ergebnissen von SHEWAN<sup>6</sup> geht aber auch hervor, daß ein Anstieg im Trimethylamingehalt wohl auf eine Zunahme der Bakterienzahl deutet, aber keine konstante Beziehung zwischen Bakterienzahl und Trimethylamingehalt besteht.

Eine kurze Übersicht über bisher verwandte Verfahren zur Trimethylamin- bzw. Trimethylaminoxidbestimmung findet sich bei WINTER<sup>7</sup>. Nachzutragen ist hier lediglich die von DYER<sup>8</sup> eingeführte relativ einfache colorimetrische Bestimmung dieses Amines als Pikrat.

An Stelle des Trimethylamintestes könnte für Süßwasserfische vermutlich die Bestimmung der flüchtigen Säuren gewählt werden. SIGURDSSON<sup>9</sup>, der sie nach der Methode von FRIEDEMANN<sup>10</sup> durchführte, berichtet, daß die nach beiden Verfahren ermittelten Werte im gleichen Sinne ansteigen bzw. abfallen und er sich deshalb in manchen Fällen auf eine Bestimmungsmethode beschränkt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der Trimethylamintest als Testmethode neben anderen angewandt werden kann, wenn bakterielle Veränderungen in der Muskulatur von Seefischen verfolgt werden sollen, aber nicht zur Ermittlung autolytischer Veränderungen allein geeignet ist.

### 3. Der Gesamtstickstoff.

Der Gesamtstickstoffgehalt spielt als Testmaßstab des Frischezustandes von Seefischen erwartungsgemäß keine Rolle, da er bis zu stark fortgeschrittenen Proteolysestadien praktisch konstant bleibt. Sofern ein Auswaschen der niederen Eiweißabbauprodukte (Ammoniak, Amine und Aminosäuren) etwa durch Liegen im Schmelz-

<sup>1</sup> BEATTY, S. A.: Zit. S. 343, Anm. 4. — BEATTY, S. A.: J. Fish Res. Board Canada 4, 229 (1939). — REAY, G. A., C. L. CUTTING u. J. M. SHEWAN: J. Soc. Chem. Ind. 62, 77 (1943). — RONOLD, O. A., u. F. JAKOBSEN: J. Soc. Chem. Ind. 66, 160 (1947). — NORRIS, E. R., u. G. J. BENVIT: J. Biol. Chemistry 158, 433 (1945).

<sup>2</sup> HATTORI, Y., u. T. HASEBE: Zit. S. 343, Anm. 7.

<sup>3</sup> WATSON, D. W.: Zit. S. 343, Anm. 4. — ANDERSON, D. W., u. C. R. FELLERS: Zit. S. 343, Anm. 4.

<sup>4</sup> WATSON, D. W.: J. Fish. Res. Board Canada 4, 267 (1939).

<sup>5</sup> TARR, H. L. A.: J. Fish. Res. Board Canada 4, 367 (1939). — TARR, H. L. A.: J. Fish. Res. Board Canada 5, 187 (1940).

<sup>6</sup> SHEWAN, J. M.: Nature [London] 143, 284 (1939).

<sup>7</sup> WINTER, H.: Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 47, 28 (1951).

<sup>8</sup> DYER, W. J.: J. Fish. Res. Board Canada 6, 351 (1945).

<sup>9</sup> SIGURDSSON, G. J.: Zit. S. 342, Anm. 5.

<sup>10</sup> FRIEDEMANN, T. E.: J. Biol. Chemistry 123, 161 (1938).

wasser von abtauendem Eis vermieden wird, also das bei Beisung von Fischen sich bildende Schmelzwasser sofort abfließen kann, erhält man einigermaßen reproduzierbare Werte für den Gesamtstickstoff. Gerade die Konstanz des Gesamtstickstoffes bis zur Genußuntauglichkeit des Fisches läßt seine Verwendung als Bezugsgröße für die niederen Abbauprodukte, die das Ausmaß der Eiweißspaltung kennzeichnen, ideal erscheinen. Hierbei wäre es besonders günstig, wenn keine individuellen Schwankungen im Eiweißgehalt auftreten würden, also die Gesamtstickstoffwerte innerhalb einer Fischart konstant wären. Daß bei unseren Säugetieren starke Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der Muskulatur in Abhängigkeit von Wachstum und Ernährung auftreten können, wurde in neuerer Zeit besonders von E. H. CALLOW<sup>1</sup> gezeigt.

Bei eigenen Untersuchungen, in denen es angestrebt wurde, geringfügige Veränderungen im Frischzustand zu erfassen, wurden die Schwankungen im Gesamtstickstoffgehalt der dorsalen Seitenrumpfmuskulatur von Fisch zu Fisch genauer verfolgt.

Die Bestimmung erfolgte nach der bekannten Methode von KJELDAHL und PARNAS-WAGNER. Bei Gesamtstickstoffwerten von 30 mg N/g Fischfleisch betragen die Abweichungen vom Mittelwert im Homogenat

Tabelle 1. Schwankungen im Gesamtstickstoffgehalt von Seefischen innerhalb eines Jahres (nach F. LÜCKE, umgerechnet).

Fischart	Fanggrund	Gesamtstickstoff (mg N/g Einwaage)	
		niedrigster Wert	höchster Wert
Kabeljau . . . .	unter Island	26,6	33,3
Kabeljau . . . .	vom Barentsmeer	27,4	30,7
Schellfisch . . . .	unter Island	28,3	35,0
Schellfisch . . . .	vom Barentsmeer	26,9	31,7
Köhler . . . . .	unter Island	25,3	33,9

maximal  $\pm 1\%$ . Von Tier zu Tier fanden wir bei 1–2pfündigen Schleien Schwankungen von 23,8–30,8 mg N/g Einwaage. Der Mittelwert von 30 untersuchten Tieren lag bei 27,9 mg N/g. Zum Vergleich dazu seien die von LÜCKE festgestellten Schwankungen im Eiweißgehalt von Seefischen innerhalb eines Jahres angeführt<sup>2</sup>, die von uns auf Gesamtstickstoff umgerechnet wurden (Tab. 1). Eine eindeutige Abhängigkeit von der Laichzeit und anderen Einflüssen konnten wir bei Eigenversuchen — wohl wegen der relativ geringen Anzahl von Fischen — nicht feststellen.

LÜCKE konnte dagegen an seinem größeren Seefischmaterial zeigen, daß ein deutliches Absinken der Eiweißwerte des Fleisches im Anschluß an die Laichzeit erfolgt.

Die starke physiologische Beanspruchung des Fischkörpers durch die enorme Ausbildung der Keimdrüsen drückt sich auch, wie neuerdings z. B. MEYER an Dorschen zeigte<sup>3</sup>, im parallel dazu erfolgenden Absinken der Gewichtsanteile von Filet, Leber und Fettgehalt der Leber aus. Mit diesen Befunden stimmt die Erfahrungstatsache überein, daß das Fischfleisch im allgemeinen vor der Laichzeit schmackhafter ist als unmittelbar danach.

Die außerordentlich hohen Schwankungen von Tier zu Tier ließen es wünschenswert erscheinen nachzuprüfen, ob in der dorsalen Seitenrumpfmuskulatur der Einzelindividuen Unterschiede im Eiweißgehalt auftreten. Dieses ist auch deshalb wichtig, da bei Verfolgung der Lagerungsveränderungen ja nicht die Anfangswerte in den Gewebestücken bestimmt werden können, die gelagert werden. Bei der Lagerung

<sup>1</sup> CALLOW, E. H.: J. Agric. Sci. **37**, 113 (1947). — CALLOW, E. H.: J. Agric. Sci. **38**, 174 (1948).

<sup>2</sup> LÜCKE, F.: Fischereiwelt **1**, 57 (1949).

<sup>3</sup> MEYER, P. F.: Allg. Fischwirtsch. Z. **2**, Nr. 26 (1950).

eines Homogenates oder Gewebebreies liegen aber keine mit den bei der Lagerung von intaktem Gewebe vergleichbaren Bedingungen vor.

Im einzelnen wurde bei der Probenahme für die Feststellung der Streuung des Gesamtstickstoffs und auch der weiter unten zu besprechenden basischen, Amino- und Tyrosin-Stickstoffwerte folgendermaßen verfahren:

Die am Abend vor der Analyseung getöteten Schleien wurden entschuppt, vorsichtig enthäutet und über Nacht bei  $-23^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Probenahme erfolgte am nächsten Morgen bei  $0^{\circ}\text{C}$ , wozu die dorsale Längsmuskulatur beider Seiten in senkrecht zur Seitenlinie und parallel zueinander verlaufende Streifen, wie es Abb. 1 zeigt, zerlegt wurde.

Beim Gesamtstickstoff wurde zwischen den Extremwerten maximal eine Abweichung von 5% innerhalb eines Fisches gefunden. So lagen z. B. bei einem Exemplar die Werte zwischen 28,3 und 29,6 mg N/g Einwaage. Eine Gesetzmäßigkeit über die Verteilung der Länge nach konnte nicht ermittelt werden.

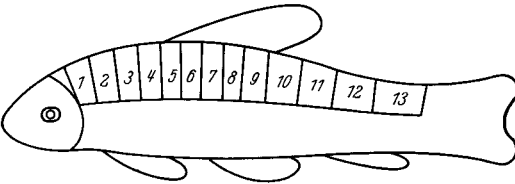


Abb. 1. Schema unserer Probeentnahme zur Feststellung der Streuung der Analysenwerte in der dorsalen Seitenrumpfmuskulatur eines Tieres.

So ist deutlich geworden, daß die beachtliche biologische Streuung des Gesamtstickstoffgehaltes bei den einzelnen Individuen es nicht gestattet, für jede Fischart einen konstanten Wert als Bezugsgröße für

die zu messenden Eiweißabbauprodukte zugrunde zu legen. Für einen einzelnen Fisch können diese aber, dank der relativ guten Konstanz der Gesamtstickstoffwerte in der gesamten Muskulatur, unabhängig von dem Ort der Probeentnahme, unbedenklich in Prozent des nach KJELDAHL erhaltenen Wertes für den Gesamtstickstoffgehalt des Fisches angegeben werden.

#### 4. Der basische Stickstoff.

Eine wegen ihrer Einfachheit gerne benutzte Methode<sup>1</sup> zur Beurteilung des Frischezustandes von Fischen ist die Bestimmung des basischen Stickstoffes durch Rücktitration des in Säure aufgefundenen basischen Destillates, das durch Destillation der Fleischprobe mit MgO bei Atmosphärendruck erhalten wurde. Neben dem freien  $\text{NH}_3$  werden bei dieser Methode durch das MgO auch das gebundene Ammoniak und alle übrigen flüchtigen basischen Verbindungen, z. B. Amine mitbestimmt. Außerdem werden durch die Destillation vermutlich Eiweißstoffe und Eiweißabbauprodukte langsam zersetzt, so daß noch weitere, wenn auch geringe Mengen flüchtiger basischer Stoffe entstehen, wie sich bei einer Nachprüfung im chemischen Laboratorium unseres Institutes ergab.

LÜCKE und GEIDEL<sup>1</sup>, die sich um die Einführung und Vereinfachung dieser Methode große Verdienste erwarben, haben ausdrücklich darauf hingewiesen, daß stets unter den gleichen Bedingungen gearbeitet werden muß, um gut vergleichbare Werte zu erhalten. Hieraus kann abgeleitet werden, daß man von verschiedenen Autoren erhaltene Analyseergebnisse nicht ohne weiteres miteinander vergleichen kann. Die analytisch exaktere Bestimmung des Ammoniaks für sich allein erfordert mehr Zeit und Aufwand als die Bestimmung des gesamten flüchtigen basischen Stickstoffs, weshalb auch wir dieser für vergleichende Untersuchungen den Vorzug gaben. Es muß aber unbedingt betont werden, daß die Destillation mit MgO nur dann bei Atmosphärendruck erfolgen darf, wenn es sich um Muskelproben von harnstofffreien

<sup>1</sup> LÜCKE, F., u. W. GEIDEL: Zit. S. 342, Anm. 4.

Fischen handelt, da sonst aus Harnstoff zusätzlich Ammoniak abgespalten wird, worauf auch HJORTH-HANSEN und BAKKEN hinweisen<sup>1</sup>.

Bei unseren Untersuchungen war zunächst der methodische Fehler aus Parallelanalysen desselben Homogenats zu ermitteln. Er betrug bei einem Mittelwert von 20 mg basischem Stickstoff/100 g Einwaage etwa 5%. Innerhalb einer Schleie konnte kein Gradient in der Verteilung längs der Körperhauptachse nachgewiesen werden. Wir erhielten bei der gleichen Schleie über den ganzen Körper hinweg maximale Unterschiede von 2 mg/100 g Einwaage. Auch nach LÜCKE und GEIDEL ist bei Seefischen unmittelbar nach dem Tode der Gehalt an flüchtigem basischem Stickstoff in der gesamten Muskulatur etwa gleich<sup>2</sup>.

Ähnlich wie bei den bisher besprochenen Methoden sind aber auch hier die Anfangswerte von Individuum zu Individuum außerordentlich schwankend. Bei 25 Tieren lagen die Analysenergebnisse zwischen 13,8 und 27,4 mg bas. N/100 g Fischfleisch. Der Mittelwert betrug 18,5 mg bas. N/100 g Einwaage und würde bei einer graphischen Darstellung der Häufigkeiten zugleich ein Maximum anzeigen.

Die starke biologische Streuung der Anfangswerte für den basischen Stickstoff wird auf ähnliche Ursachen zurückzuführen sein wie bei den übrigen Testmethoden. Vermutlich spielen hier — wenn wir die von K. ELIAS und H. ELIAS<sup>3</sup> an menschlichem Blut ermittelten Ergebnisse über den Gehalt an basischen Aminen in Parallele setzen dürfen — der Ernährungs- und Gesundheitszustand der Tiere eine so wesentliche Rolle, daß sogar Schwankungen im Tagesablauf deutlich registriert werden.

Insgesamt ergibt sich aus diesen Untersuchungen, daß man für verschiedene Exemplare einer Fischart keinen konstanten Ausgangswert für den Gehalt an basischem Stickstoff angeben kann. Günstig ist zu werten, daß innerhalb eines Fisches örtlich auseinander liegende Proben wie beim Gesamtstickstoff relativ gut übereinstimmende Ergebnisse liefern. Man kann daher sicher sein, daß der Anfangsgehalt an basischem Stickstoff in einer lagernden Muskelprobe mit dem einer anderen vom gleichen Fisch stammenden und analysierten ausreichend gut übereinstimmt.

### 5. Der Amino-Stickstoff.

Zu den besonders markanten, während der Proteolyse auftretenden Eiweißabbauprodukten gehören auch die freien Aminosäuren. Nun weisen die bisher üblichen Aminosäurebestimmungsmethoden, z. B. die Formoltitration nach SÖRENSEN<sup>4</sup>, das acidimetrische Verfahren nach TILLMANS und KIESGEN<sup>5</sup> und das gern gebrauchte Verfahren nach VAN SLYKE<sup>6</sup> den Nachteil auf, daß  $\text{NH}_3$  bzw. Ammoniumsalze mit den Reagentien ebenfalls reagieren und daher vorher entfernt werden müssen. Da bei der Fischzersetzung ja erhebliche Mengen an diesen Stoffen auftreten, benutzten wir die Methode von POPE und STEVENS<sup>7</sup>, bei der Ammoniak und Ammoniumsalze und, wie wir darüberhinaus selbst feststellen konnten, auch Amine, im Fett anwesende Peroxyde und Glucose in den im Muskel maximal vorkommenden Mengen nicht stören<sup>8</sup>. Auch von MARTIN und MITTELMANN<sup>9</sup> wird betont, daß diese Methode gute Resultate ergibt, da hierbei wesentliche Störquellen nicht in Betracht kommen.

<sup>1</sup> HJORTH-HANSEN, S., u. K. BAKKEN: Fiskeridirektoratets Skrifter 1, Nr. 6 (1947).

<sup>2</sup> LÜCKE, F., u. W. GEIDEL: Zit. S. 342, Anm. 4.

<sup>3</sup> ELIAS, K., u. H. ELIAS: Exper. Med. a. Surg. 8, 89 (1950).

<sup>4</sup> SÖRENSEN, S. P. L.: Biochem. Z. 7, 45 (1909). — HENRIQUES, V., u. S. P. L. SÖRENSEN: Z. physiol. Chem. 63, 27 (1909).

<sup>5</sup> TILLMANS, J., u. J. KIESGEN: Diese Z. 53, 126 (1927).

<sup>6</sup> VAN SLYKE, D. D.: Ber. dtsch. chem. Ges. 43, 3170 (1910); 44, 1684 (1911).

<sup>7</sup> POPE, C. G., u. M. F. STEVENS: Biochem. J. 33, 1070 (1939).

<sup>8</sup> Die Nachprüfung der Methode für unsere Zwecke wurde zum großen Teil von Dr. E. WINTER (Chemische Abt. der Bundesanstalt) durchgeführt, der auch vorschlug, das Kupfer der aminosäuren Kupfersalze colorimetrisch mit Hilfe von Natriumdiäthylthiocarbamat zu bestimmen.

<sup>9</sup> MARTIN, A. J. P., u. R. MITTELMANN: Biochem. J. 43, 353 (1948).

Wie bei den übrigen Methoden, so gibt es auch bei dieser systematische Fehler. So reagiert z. B. bei der Methode nach VAN SLYKE wohl der Stickstoff der Monoaminomonocarbonsäuren vollkommen mit salpetriger Säure, während bei den Aminosäuren mit 2 N-Atomen (z. B. Tryptophan) schon Einschränkungen zu machen sind; erst recht trifft das für Histidin und Arginin zu. Bei der Methode von POPE und STEVENS können nach RAUEN und Mitarbeitern Monoaminomonocarbonsäuren und Monoamindicarbonsäuren einwandfrei bestimmt werden<sup>3</sup>. Bei Histidin liegen die Werte zu hoch und müssen, wenn Histidin allein vorliegt, mit 0,75 multipliziert werden. Lysin und Arginin reagieren nur mit dem  $\alpha$ -Aminostickstoff<sup>1</sup>. Cystin, Methionin, Tryptophan, Leucin und Phenylalanin bilden schwer lösliche Kupfersalze. Diese Aminosäuren entziehen sich daher der Bestimmung, wenn sie allein anwesend sind<sup>2</sup>. In Mischung mit anderen Aminosäuren, wie sie in tierischen Geweben vorkommen, werden ihre Kupfersalze jedoch ebenfalls gelöst.

Sollen also in einem eiweißhaltigen Medium Veränderungen des Gesamt-Aminosäuregehaltes festgestellt werden, so muß man bei allen Bestimmungsmethoden die stillschweigende Voraussetzung machen können, daß sich der relative Gehalt an einzelnen Aminosäuren nicht oder nur geringfügig ändert. Wie wir weiter unten sehen werden, ist bei der Proteolyse von Eiweißstoffen allgemein mit kleinen Veränderungen in der relativen Aminosäuren-Zusammensetzung zu rechnen.

Zur Methode selber ist noch zu bemerken, daß man nach Möglichkeit optimal etwa 2 mg Aminostickstoff im Versuchsansatz haben soll, da in diesem Bereich die auf 100 g Einwaage zu berechnenden Ergebnisse am besten zu reproduzieren sind<sup>3</sup>.

Zunächst war auch hier wieder zu überprüfen, welche Methodenfehler bei unseren Versuchen auftreten können. Als Abweichungen vom Mittelwert fanden wir im Homogenat bei 40 mg freiem Amino-N/100 g Fischfleisch  $\pm 2\%$ . Von Tier zu Tier lagen die Mittelwerte — es wurden 20 Tiere untersucht — zwischen 30,4 und 67,0 mg Amino-N/100 g Einwaage. Der gesamte Mittelwert betrug 45,7 mg Amino-N je 100 g.

Diese außerordentlich große biologische Streuung wird vermutlich z. T. auf ähnliche Ursachen zurückzuführen sein wie beim basischen Stickstoff. Besonders wesentlich scheint auch hier der Gesundheitszustand zu sein. Über den Einfluß der Ernährung auf den Gehalt an freien Aminosäuren im Gewebe von Ratten berichten THOMPSON und Mitarbeiter<sup>4</sup>. Für den Menschen liegen ähnliche Untersuchungen vor<sup>5</sup>, die besagen, daß, wenn auch für die einzelnen Aminosäuren in Abhängigkeit von Ernährung oder Ernährungszustand unterschiedliche Abhängigkeiten bestehen, doch bei Eiweißmangel (nicht unbedingt bei Hunger!) insgesamt eine Herabsetzung der freien Aminosäuren im Blutserum und Gewebe erfolgt. Hinzu kommt, daß wahrscheinlich wie beim Menschen der Gehalt an freien Aminosäuren im Blut und Serum durch den Hormonspiegel verändert wird<sup>6</sup>.

Unbequemeres als der Methodenfehler und die Schwankungen der Mittelwerte von Fisch zu Fisch war die Tatsache, daß wir innerhalb der dorsalen Seitenrumpfmuskulatur eines Fisches ganz beträchtliche Schwankungen der Aminosäurenwerte erhielten. Bei dieser Untersuchung erwies sich die Art der Probeentnahme bei den Schleien, die wir oben beschrieben haben, als außerordentlich günstig. Da diese bei niedriger Temperatur erfolgte, konnte ein sonst möglicher Autolyseeffekt ausgeschaltet werden. Bei der kurvenmäßigen Darstellung der ermittelten Analysenwerte in Abhängigkeit von der Lage der Proben im Fischkörper — wobei die Proben hinter den Kiemendeckeln angefangen laufend nummeriert wurden (siehe Abb. I) — zeigte sich, daß von einem kurz vor oder zu Anfang der Rückenflosse gelegenen Minimum

<sup>1</sup> MARTIN, A. J. P., u. R. MITTELMANN: Zit. S. 347, Anm. 9.

<sup>2</sup> POPE, C. G., u. M. F. STEVENS: Zit. S. 347, Anm. 7.

<sup>3</sup> RAUEN, H. M., G. LEONHARDI, u. M. BUCHTA: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **284**, 178 (1949).

<sup>4</sup> THOMPSON, H. T., P. E. SCHURR, L. M. HENDERSON u. C. A. ELVEHJEM: J. Biol. Chemistry **182**, 47 (1950).

<sup>5</sup> HERRNRING, G., u. S. BORELLI: Klin. Wschr. **26**, 420 (1948). — WISS, O., u. R. KRUEGER: Helvet. chim. Acta **32**, 527 (1949).

<sup>6</sup> SCHREIER, K., u. H. PLÜCKTHUN: Biochem. Z. **320**, 447 (1950).



ein deutlicher Anstieg bis zu einem am Ende der Rückenflosse gelegenen Maximum vorlag. Lediglich bei einem von den 5 näher untersuchten Exemplaren, bei dem es sich um ein relativ großes, mehr als 1 kg schweres Weibchen handelte, war dieser Anstieg so unendlich, daß er im Bereich des Methodenfehlers liegen könnte. Die übrigen Kurvenbilder lehren, daß innerhalb der Seitenrumpfmuskulatur eines Tieres Differenzen bis zu fast 22 mg Amino-N/100 g Einwaage auftreten können. (Im einzelnen betragen sie 16,4, 17,1, 19,2 und 21,6 mg Amino-N/100 g). Wie aus diesen Ergebnissen zu ersehen ist, ist es mit einigen Schwierigkeiten verbunden, aus dem Anfangsaminosäuregehalt eines Gewebesblockes auf den eines anderen im gleichen Tier zu schließen. Wir beabsichtigen, an anderer Stelle zu zeigen, daß man bei richtiger Probeentnahme diese Fehlerquelle doch weitgehendst ausschalten kann.

### 6. Der Tyrosingehalt.

Schon 1903 fanden FISCHER und ABDERHALDEN<sup>1</sup>, daß bei der Einwirkung von Pankreatin auf Proteine die einzelnen Aminosäuren mit ganz unterschiedlicher Geschwindigkeit in Freiheit gesetzt werden. Das Tyrosin begann schon nach kurzer Fermenteinwirkung auszufallen. Später konnte gezeigt werden, daß bei der Freilegung von Aminosäuren aus Edestin erst 7% der Glutaminsäure frei vorliegen, wenn schon 98% des Tyrosins als freie Aminosäure vorhanden sind<sup>2</sup>. Neuerdings berichtete WALLENFELS<sup>3</sup>, daß Tyrosin und Tryptophan im allgemeinen bevorzugt vor anderen Aminosäuren aus dem Proteinverband herausgelöst werden. Eine beträchtliche Schwankungsbreite wird allerdings durch die zur Eiweißspaltung benutzten Fermente und das Substrat selbst bedingt.

Zur Verfolgung von Veränderungen der Fischmuskulatur während der Lagerung wurde der „Tyrosintest“ u. W. zum ersten Mal von BRADLEY und BAILEY<sup>4</sup> benutzt. SIGURDSSON und Mitarbeiter<sup>5</sup> zeigten dann in weiteren Untersuchungen, daß diese Methode den bisher gebräuchlichen gegenüber zumindest ebenbürtig ist. Weitaus die Mehrzahl der uns bekannten Veröffentlichungen über Tyrosinbestimmungsverfahren hat die beiden von FOLIN und CIOCALTEU<sup>6</sup> angegebenen Methoden zur Grundlage. Die eine auf dem Prinzip der MILLONschen Reaktion beruhende Bestimmung wurde von FOLIN und MARENZI<sup>7</sup> verbessert und gilt allgemein als genau und zuverlässig. Leider reichte die in der Fischmuskulatur unmittelbar nach dem Tode vorhandene Tyrosinmenge nicht aus, um mit den zu unserem PULFRICH-Photometer vorhandenen Einrichtungen bei einer maximalen Einwaage von 3 g Fischfleisch später zu verfolgende geringfügige Veränderungen des Tyrosingehaltes zu erkennen.

Bei der zweiten Methode, die auf der Reaktion von Phenolen mit Phosphorwolframsäure beruht, trat diese Schwierigkeit nicht auf. Dafür ist sie aber nicht spezifisch, da das Reagens immer mit Phenolen, auch mit Sulphydrylverbindungen und H<sub>2</sub>S reagiert. Es ist also wichtig, diese Zusammenhänge zu kennen, wenn man dieses Verfahren als „Tyrosintest“ bezeichnen will. Wir folgten im wesentlichen der von WOOD, SIGURDSSON und DYER<sup>5</sup> angegebenen Vorschrift, die bei Reihenuntersuchungen den früheren gegenüber eine wesentliche Zeitersparnis bringt und doch gut reproduzierbare Ergebnisse liefert.

Die Tyrosinbestimmungsmethode mit  $\alpha$ -Nitroso- $\beta$ -naphthol<sup>8</sup> nach der von MACIAG und SCHWENTAL<sup>9</sup> angegebenen Vorschrift war für Fischmuskulatur nicht brauchbar, da z. T. negative Werte erhalten wurden, deren Ursache bisher nicht geklärt werden konnte.

Bei der Überprüfung der von uns verwandten Bestimmungsmethoden mit dem Phenolreagens stellten wir fest, daß die Ablesung der Extinktionswerte in dem Zeitraum zwischen 5 und 30 min nach Beginn der Farbentwicklung erfolgen muß. Nach 30 min beginnt die Farbintensität linear mit der Zeit abzufallen. Im Homogenat

<sup>1</sup> FISCHER, E., u. E. ABDERHALDEN: Z. physiol. Chem. **39**, 81 (1903).

<sup>2</sup> ABDERHALDEN, E., u. B. REINBOLD: Z. physiol. Chem. **46**, 159 (1905).

<sup>3</sup> WALLENFELS, K.: Biochem. Z. **321**, 189 (1950).

<sup>4</sup> BRADLEY, H. C., u. B. E. BAILEY: Food Res. **5**, 487 (1940).

<sup>5</sup> SIGURDSSON, G. J.: Zit. S. 342, Anm. 5. — WOOD, A. J., G. J. SIGURDSSON u. W. J. DYER: J. Fish. Res. Board Canada **6**, 53 (1942).

<sup>6</sup> FOLIN, O., u. V. CIOCALTEU: J. Biol. Chemistry **73**, 627 (1927).

<sup>7</sup> FOLIN, O., u. A. D. MARENZI: J. Biol. Chemistry **83**, 89 (1929).

<sup>8</sup> GERNGROSS, O., K. VOSS u. H. HERFELD: Ber. dtsh. chem. Ges. **66**, 435 (1933).

<sup>9</sup> MACIAG, A., u. R. SCHWENTAL: Mikrochem. **24**, 250 (1938).

erhielten wir Abweichungen bis zu  $\pm 1,4\%$  vom Mittelwert. Von Tier zu Tier wurde bei Schleien eine Schwankungsbreite zwischen 0,57 und 1,77 mg Tyrosin-N/100 g dorsale Seitenrumpfmuskulatur festgestellt. Der Mittelwert von 20 Tieren lag bei 0,95 mg Tyrosin-N/100 g. Innerhalb der dorsalen Seitenrumpfmuskulatur eines Tieres betrug die bisher maximal erhaltene Abweichung vom Mittelwert  $\pm 21\%$ . Der für die Gesamtaminosäuren gefundene Anstieg im Bereich der Rückenflosse konnte beim Tyrosinstickstoff allein nicht mit Sicherheit festgestellt werden; es wurde lediglich vom Kopfende zur Schwanzspitze hin ein leichter Anstieg bei 15 von insgesamt 18 Tieren gefunden.

Wie beim Aminostickstoff ist auch aus diesen Befunden zu ersehen, wie wichtig, aber auch wie schwierig es ist, den zu lagernden Proben die richtigen Ausgangswerte zuzuordnen, da die Streuung der Werte innerhalb eines Tieres bei geringfügigen Veränderungen diese überdecken kann. Daß diese Frage von anderen Autoren, die die Veränderungen während der Lagerung verfolgt haben, selten aufgegriffen und ziemlich unbeachtet geblieben ist, mag daran liegen, daß sie im allgemeinen mit sehr viel größeren Seefischen gearbeitet haben, bei denen die Unterschiede der Testwerte dadurch, daß die Proben aus fast gleichen Bereichen entnommen werden können, nicht so ins Gewicht fallen, während eine solche Möglichkeit bei den relativ kleinen Tieren, die hier als Versuchsobjekte dienten, nicht besteht.

#### B. Die Beziehungen der Ausgangstestwerte zueinander und ihre Beeinflussung durch den Aufbau der Seitenrumpfmuskulatur.

Wie wir sahen, traten bei den Schleien sowohl für den Gesamtstickstoff als auch für basischen Aminosäuren- und Tyrosinstickstoff von Tier zu Tier bedeutende Schwankungen auf, die vermutlich auf den Ernährungszustand und den Grad der physiologischen Beanspruchung unmittelbar vor dem Tod zurückzuführen sind. Nun erhebt sich die Frage, ob irgendwelche Beziehungen zwischen den einzelnen Größen vorhanden sind. Bei den untersuchten Schleienmännchen wiesen die Eiweißwerte von Tier zu Tier eine wesentlich geringere Streuung auf als bei den im gleichen Zeitabschnitt — in der ersten Hälfte dieses Jahres — untersuchten Weibchen und ließen auch nicht andeutungsweise eine Beziehung zum Gehalt an freien Aminosäuren erkennen. Dagegen lassen die in Abb. 2 für die bisher untersuchten Weibchen zusammengestellten Meßwerte vermuten, daß möglicherweise für die weiblichen Tiere dieser Fischart eine positive Korrelation zwischen den Gesamtstickstoffwerten und dem Gehalt an freien Aminosäuren besteht. Der gleiche Zusammenhang wurde von THOMPSON und Mitarbeitern<sup>1</sup> für die Gewebe von Ratten und von HERRNRING und BORELLI<sup>2</sup> für das menschliche Blutserum erkannt.

Für den Tyrosinstickstoff könnte eine ähnliche Abhängigkeit vermutet werden. Der basische Stickstoff ist, wie wir weiter oben sahen, bei Mammaliern — und auch

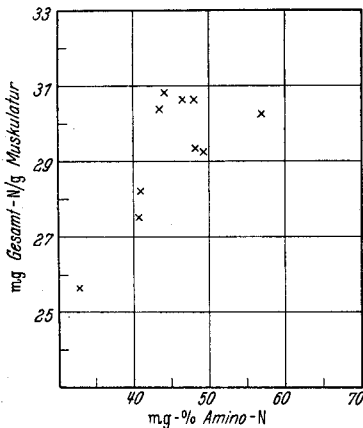


Abb. 2. Aminostickstoffgehalt der Seitenrumpfmuskulatur von Schleienweibchen in Abhängigkeit vom zugehörigen Gesamtstickstoff. (Jeder einzelne Punkt stellt einen Mittelwert von mehreren Meßwerten desselben Tieres dar.)

<sup>1</sup> THOMPSON, H. T., P. E. SCHURR, L. M. HENDERSON u. C. A. ELVEHJEM: Zit. S. 348, Anm. 4.

<sup>2</sup> HERRNRING, G., u. S. BORELLI: Zit. S. 348, Anm. 5.

vielleicht bei Fischen — zu sehr von kleinen Schwankungen des Tagesablaufes abhängig. Es ist daher nicht verwunderlich, daß keine deutliche Korrelation zwischen basischem Stickstoff und Gesamtstickstoffgehalt vorzuliegen scheint. Ebenso konnte keine eindeutige Beziehung zwischen basischem Stickstoff und Aminosäuren unmittelbar nach dem Tode ermittelt werden. Zwischen  $p_{\text{H}}$ -Wert und basischem Stickstoff ergibt sich insofern eine bemerkenswerte aber nicht sehr überraschende Relation, als der bei Plattfischen beobachtete niedere Ammoniakgehalt mit dem im allgemeinen — ebenfalls im Vergleich zu Rundfischen — niedrigeren  $p_{\text{H}}$ -Wert auf dem Höhepunkt der Totenstarre übereinstimmt.

Nun bliebe noch zu klären, worauf die großen Schwankungen im Aminosäuren- und Tyrosingehalt innerhalb eines Tieres zurückzuführen sind. Schon der Aufbau der Seitenrumpfmuskulatur, wie ihn Abb. 3 zeigt, läßt erkennen, daß der Bindegewebsanteil in verschiedenen Abschnitten verschieden groß ist. Insbesondere dürfte



Abb. 3. Schleie, deren dorsale Seitenrumpfmuskulatur an einer Seite durch Entfernung der Haut und des Unterhautbindegewebes mit Hilfe des Glühdrahtschneiders freigelegt wurde.

der Schwanzabschnitt relativ mehr Bindegewebe besitzen als der mittlere Teil der Seitenrumpfmuskulatur, da die Myomeren unterschiedlich breit sind und infolgedessen im hinteren Körperabschnitt mehr (bindegewebige) Myoseptenanteile auf die gleiche Gewichtseinheit Muskulatur kommen. Dabei ist noch zu berücksichtigen, daß sowohl Myomeren wie Myosepten hohlkegelförmig ausgebuchtet sind. Die individuellen Schwankungen können außerdem teilweise darauf zurückzuführen sein, daß der Anteil feinsten Gräten in den verschiedenen Proben differiert.

Wenn wir uns vornehmen wollen, geringfügige Veränderungen in Gewebeblöcken der Seitenrumpfmuskulatur von Schleien analytisch zu verfolgen, müssen wir die Streuung der Werte innerhalb eines Tieres berücksichtigen und hierdurch möglicherweise bedingte Fehler vermeiden.

### C. Die Brauchbarkeit der von uns näher untersuchten Testmethoden.

Wichtig für die Brauchbarkeit einer Testmethode ist es, daß bei Veränderungen des Lagergutes die sich ergebenden Meßwerte Übereinstimmungen mit anderen gut bekannten Eigenschaften bzw. Testwerten zeigen. Nach unseren Erfahrungen eignet sich von den organoleptischen Befunden die Geruchsbewertung in besonderem Maße, um Unterschiede des Frischezustandes von Fischen festzustellen.

In Tab. 2 sind die Mittelwerte des basischen Stickstoffs von 5 Versuchsansätzen mit bactericidem Eis<sup>1</sup> und die sich daraus ergebende Rangfolge der unabhängig davon nach dem Geruch der behandelten Fische ermittelten Rangfolge gegenübergestellt.

Dem schlechtesten Frischezustand entspricht bei subjektiver und objektiver Rangfolge die Zahl 1, dem besten die Zahl 8. Ergab sich bei der organoleptischen Beurteilung für 2 Zusätze eine fast übereinstimmende Rangfolge, so erhielten beide die gleiche, aus dem Mittelwert der in Frage kommenden Größen gebildete Zahl.

<sup>1</sup> Über diese Versuche wird an anderer Stelle ausführlich berichtet werden.

Wie man erkennt, stimmen in diesen Fällen die Analysenergebnisse bei den subjektiv gleich eingeordneten Fischen jeweils verhältnismäßig gut überein. Die Tabelle zeigt ferner, daß im allgemeinen einem höheren Gehalt an basischem Stickstoff eine niedrigere Rangnummer bei der organoleptischen Einordnung entspricht. Subjektiv und objektiv ermittelte Rangordnungen stimmen in 2 der 8 Fälle überein, während sie in den übrigen 6 Fällen nur um eine halbe Einheit voneinander abweichen.

Eine relativ gute Beziehung zum Keimgehalt drückt sich beim basischen Stickstoff darin aus, daß in gelagerten Fischen der Gehalt an flüchtigen, basischen Verbindungen in der ventralen Seitenrumpfmuskulatur größer ist als in der dorsalen. Das bedeutet ja offensichtlich, daß ausgeweideter Fisch mit relativ größeren, den

Tabelle 2. Gehalt an basischem Stickstoff und Rangfolge für die Geruchsbewertung von in Eis mit verschiedenen bactericiden Zusätzen gelagerten Süßwasserfischen.

Bactericider Zusatz zum Eis	Chemische Bewertung		Geruchsbewertung
	basischer Stickstoff <sup>1</sup> mg-%	objektive Rangfolge <sup>1</sup>	subjektive Rangfolge <sup>2</sup>
0,02% Natriumnitrit + 1,5% Kochsalz . . . . .	21,5	8	8
0,05% Natriumnitrit . . . . .	39,2	7	6,5
0,08% Sulfathiazol . . . . .	41,1	6	6,5
0,1% „Zephirol“ . . . . .	53,1	5	5
0,05% „Halazone“ (p-Sulfodichloraminobenzoessäure) . . . . .	55,4	4	3,5
0,01% „Halazone“ (p-Sulfodichloraminobenzoessäure) . . . . .	55,6	3	3,5
Kein Zusatz (Kontrolle) . . . . .	58,1	2	1,5
0,1% „Quartamin“ . . . . .	65,5	1	1,5

Mikroben zugänglichen Körperoberflächen bei der Lagerung eine größere Keimdichte bekommt und daher rascher verdirbt als z. B. Fischfleisch mit kleineren Oberflächen. Nun darf man aber bei Anwendung einer chemischen Testmethode auf biologische Objekte nicht erwarten — wir sahen es schon bei der Trimethylaminbestimmung — daß z. B. eine Proportionalität zwischen der Bakterienzahl und einem getesteten Stoff besteht, da die vorhandene Bakterienflora von Fall zu Fall nicht nur in systematischer, sondern auch in stoffwechsel-physiologischer Hinsicht verschieden ist. Außerdem sind die Veränderungen im Fleisch allgemein ja nicht nur mikrobieller Art. Interessant sind in diesem Zusammenhang Untersuchungsergebnisse einer Reihe von Autoren<sup>3</sup>, die zeigen, daß gelegentlich bei verdorbenen Seefischen keine Bakterien innerhalb der Fischmuskulatur nachzuweisen waren. Der Befund scheint für gewisse Fischarten typischer zu sein als für andere.

Zwischen basischem und Amino-Stickstoffgehalt ergaben sich in unseren Versuchen in fortgeschrittenen Zersetzungsstadien ebenfalls gute Übereinstimmungen. Aus den in Tab. 3 mitgeteilten Werten geht hervor, daß unmittelbar nach dem Tode entnommene Schleienmuskulatur, die mit Reinkulturen von *Bacillus subtilis* und *Bacillus mesentericus* beimpft worden war, in denselben Proben größenordnungsmäßig den gleichen Anstieg für basischen Stickstoff- und Aminosäuregehalt zeigte: Die absoluten Aminostickstoffwerte waren bei gleichen Proben in diesen fortgeschrittenen Zersetzungsstadien in allen Fällen höher als die Werte für den basischen Stickstoff.

<sup>1</sup> Als Mittelwert aus 5 Versuchsansätzen.

<sup>2</sup> Als Mittelwert aus 5 Geruchsbewertungen.

<sup>3</sup> LEHR, E.: Zit. in einem Vortrag von F. LÜCKE, gehalten auf der Hauptversammlung des Deutschen Kälte-Vereins, Lübeck 1932: Kälte-Ind. **39**, 160 (1932). — LÜCKE, F., u. E. FRERCKS: Vorratspfl. u. Lebensmittelforsch. **3**, 133 (1940). — DYER, W. J., u. F. E. DYER: Food Ind. South Africa **2**, 47 (1949). — DIEHL, Ch.: Refrig. Eng. **1950**, 379.

Tabelle 3. Gehalt der Schleimmuskulatur an basischem und Amino-Stickstoff nach beidseitiger Beimpfung mit *Bacillus subtilis* und *Bacillus mesentericus*.

Bakterienart	Bakterien- dichte/cm <sup>3</sup> 0.08% ige K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - Lösung	Zusatz cm <sup>3</sup>	Lagerzeit Tage	Lagertemp. ° C	Basischer N mg-%	Amino-N mg-%
<i>Bacillus subtilis</i> . . . . .	4330	0,5	2	24	143	158
<i>Bacillus mesentericus</i> . . . . .	2570	0,5	2	24	231	283
<i>Bacillus subtilis</i> . . . . .	27000	0,5	2	22	283	316
<i>Bacillus mesentericus</i> . . . . .	28000	0,5	2	22	284	326

Nun ist eine Testmethode für unsere Zwecke umso besser geeignet, je eindeutiger sie schon geringfügige Abweichungen vom Frischezustand anzeigt. Um zu prüfen, welche von unseren näher untersuchten Testmethoden diesen Forderungen am besten genügt, wurden einige Bestimmungen an Schleimmuskulatur gemacht, die unmittelbar nach dem Tode der Tiere dreimal durch den Fleischwolf getrieben und dann z. T. bei +3° C, z. T. bei +21° C gelagert wurde. Während der Lagerung wurden in bestimmten Zeitabständen parallel zueinander Tyrosin, basischer Stickstoff und Aminostick-

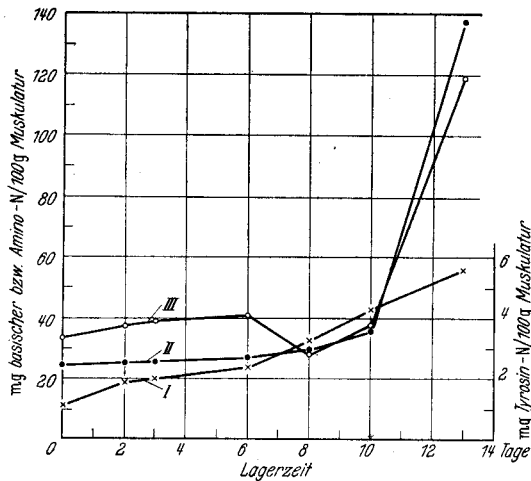


Abb. 4. Veränderungen der Stickstoffsubstanzen von zerkleinerter Schleimmuskulatur während der Lagerung bei +3° C. I: Tyrosin-Stickstoff, II: basischer Stickstoff, III: Amino-Stickstoff.

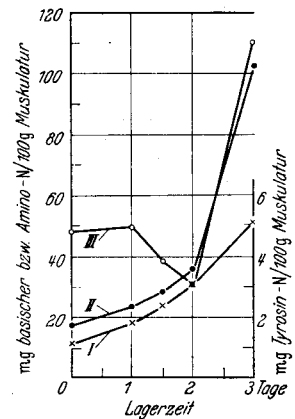


Abb. 5. Veränderungen der Stickstoffsubstanzen von zerkleinerter Schleimmuskulatur während der Lagerung bei +21° C. I: Tyrosin-Stickstoff, II: basischer Stickstoff, III: Amino-Stickstoff.

stoff bestimmt. Wie Abb. 4 und 5 zeigen, erfahren hierbei der basische Stickstoff und der Tyrosinstickstoff bei subjektiv als relativ frisch empfundenem Zustand des Lagergutes — nach Lagerung bei 3° C in 4 Tagen, nach Lagerung bei 21° C nach 1 Tag — in jedem Fall einen deutlichen Anstieg. Beim Aminostickstoff war dagegen bei beiden Temperaturen zunächst ein leichter Abfall bis zur Genußuntauglichkeit zu beobachten, dem dann allerdings ein immer steiler werdender Anstieg folgte.

Auf einen Rückgang des Aminostickstoffs während der ersten postmortalen Veränderungen von Heringen kann auch aus den Kurvenbeispielen von SIGURDSSON<sup>1</sup> geschlossen werden. NICKERSON und PROCTOR<sup>2</sup> berichten, daß in infiziertem Schellfischmuskel zunächst ein Anstieg,

<sup>1</sup> SIGURDSSON, G. J.: Zit. S. 342, Anm. 5<sup>2</sup> NICKERSON, J. T. R., u. B. E. PROCTOR: J. Bacter. 30, 383 (1935).

dann ein Abfall und dann wieder ein Anstieg des Aminostickstoffs zu beobachten sind. Diese eigenartigen Schwankungen des Aminosäuregehalts werden von den Autoren darauf zurückgeführt, daß zunächst bei geringerer Keimzahl ein Teil der vorhandenen freien Aminosäuren von den Mikroorganismen mit verbraucht wird (teils ohne Umbau, teils nach Decarboxylierung oder Deaminierung), während bei großen Bakteriedichten die Menge der bei der Proteolyse freigesetzten Aminosäuren den Bedarf der Bakterien immer mehr übertrifft. Es ist ja auch durchaus denkbar, daß beim bakteriellen Eiweißabbau in Abhängigkeit von der Temperatur und Bakteriedichte zunächst eine gewisse Zeit notwendig ist, um die Proteine — speziell die Skleroproteine — in kleinere Untereinheiten zu zerlegen, und erst dann in kurzer Zeit große Mengen von Aminosäuren in Freiheit gesetzt werden. Daraus geht hervor, daß die Bestimmung der freien Aminosäuren zur objektiven Ermittlung des Frischezustandes für die Anfangsstadien der Proteolyse im Fischfleisch längst nicht so gut zu gebrauchen ist wie die beiden übrigen von uns näher untersuchten Methoden. Auch LÜCKE und GEIDEL<sup>1</sup> weisen darauf hin, daß die Bestimmung des Aminostickstoffs zur Beurteilung des Frischezustandes nicht geeignet ist, da ein deutliches Anwachsen des Gehaltes an Aminostickstoff erst erfolgt, wenn der Fisch bereits verdorben ist. Die Beurteilung des Aminostickstofftestes nach den in Tab. 3 an künstlich infizierten und total verdorbenen Proben erhaltenen Befunden hätte zu einem ganz falschen Ergebnis geführt.

Abweichend von den Gesamtaminosäuren verhält sich das Tyrosin, das auch beim Fischfleisch ganz offensichtlich in den Anfangsstadien der Proteolyse selektiv aus den Proteinverbänden in Freiheit gesetzt wird und wohl deshalb nicht merklich von dem anfänglichen Abfall des Gesamtaminosäuregehaltes betroffen wird. Nach unseren bisherigen Untersuchungen scheint der „Tyrosintest“ für die ersten Stadien der Proteolyse von Knochenfischen noch geeigneter als die brauchbare Methode von LÜCKE und GEIDEL<sup>1</sup> zu sein. Das geht auch aus einem von uns zufällig erhaltenen Befund hervor: Zur Bestimmung der Streuung der Anfangswerte hatten wir Schleien zunächst bei  $-23^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Probenahme erfolgte am nächsten Tage von einer Seite bei  $0^{\circ}\text{C}$ . Es ließ sich nicht vermeiden, daß der Rest des Fisches während dieser Manipulation etwas auftaute. Er wurde nun anschließend wieder bei  $-23^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Als am darauffolgenden Tag der Mittelwert des Tyrosingehaltes von der anderen Seite mit dem am Vortage verglichen wurde, stellte sich gemäß Tab. 4 heraus, daß in allen Fällen ein deutlicher Anstieg des Tyrosinstickstoffs erfolgt war.

Tabelle 4. Tyrosingehalt der Seitenrumpfmuskulatur von Schleien während 36stündiger Lagerung bei  $-23^{\circ}\text{C}$ . (Die Fische wurden nach 12 Std. zur ersten Probeentnahme 3 Std. lang bei  $0^{\circ}\text{C}$  gehalten.)

Versuch Nr.	Gehalt an Tyrosin-Stickstoff	
	nach 12 Std. mg-%	nach 36 Std. mg-%
1	0,57	0,58
2	0,66	0,98
3	0,66	0,85
4	1,05	1,12
5	0,99	1,08
6	1,06	1,24

Daß zur Herauslösung des Tyrosins aus den Proteinverbänden vermutlich relativ wenig Energie erforderlich ist, geht auch daraus hervor, daß bei UV-Einwirkung auf Eiweißstoffe Tyrosin besonders leicht in Freiheit gesetzt wird, wenn die wirksame Wellenlänge im bestrahlenen UV-Licht enthalten ist<sup>2</sup>.

Es erscheint sehr gewagt, eine Testmethode zur Bestimmung des Frischezustandes eines Lebensmittels schlechthin als die „beste“ oder als unbrauchbar zu bezeichnen. Bei einem so heterogenen Punkt, wie es der Magerfisch und noch extremer der Fettfisch ist, müssen naturgemäß Faktoren, die auf eine Veränderung der einzelnen Bestandteile von unterschiedlichem Einfluß sind und selber variieren können, ganz besonders berücksichtigt werden. Einer der wichtigsten Faktoren dieser Art bei der Fischlagerung ist die Temperatur. Bekanntlich erfolgt bei Temperatursenkung eine Herabsetzung sowohl des Bakterienwachstums als auch der Enzymaktivität. Es

<sup>1</sup> LÜCKE, F., u. W. GEIDEL: Zit. S. 342, Anm. 4.

<sup>2</sup> DANNENBERG, H.: Angew. Chem. 63, 208 (1951). — KAPLAN, E. H., E. D. CAMPBELL u. A. D. McLAREN: Biochem. biophys. Acta [Amsterdam] 4, 493 (1950).

ist in diesem Zusammenhang sehr bedeutsam, daß die Wirksamkeit der verschiedenen Enzyme nicht gleichmäßig vermindert wird<sup>1</sup>. Vor kurzem hat SIGURDSSON<sup>2</sup> gezeigt, daß bei extrem verschiedenen Lagertemperaturen der Frischezustand von Heringen am besten nach verschiedenen Methoden bestimmt wird. Während z. B. bei +10° C der Aminostickstoff in den ersten 80 Std. im Vergleich zu den flüchtigen Säuren und zum Trimethylamin nur wenig zunahm, zeigte er bei -2° C gegenüber diesen Stoffen zu übereinstimmenden Zeiten ein deutliches Anwachsen. Offensichtlich hat sich nach diesen Untersuchungen über -2° C der Tyrosintest in allen Fällen gut bewährt. Es wird sich in Zukunft erweisen müssen, ob er bei Temperaturen unter -15° C, bei denen die Vermehrung der Fischbakterien aufhört, die im Verlauf der Lagerung auftretenden Eiweißveränderungen auch so deutlich zu erkennen gibt.

Schon bei der Besprechung der Trimethylamin-Bildung sahen wir, daß die jeweils



Abb. 6. Teil eines Längsschnittes durch die auf den Oberflächen mit einer Suspension von *Bacillus subtilis* beimpfte und dann 2 Tage bei 21° C gelagerte Seitenrumpfmuskulatur einer Schleie. Gräte quer getroffen, umgeben von einem Bakterienhof. (Hensoldt-Diami, Vergrößerung 68fach, GIEMSA-Färbung.)



Abb. 7. Teil eines Längsschnittes durch die auf den Oberflächen mit einer Suspension von *Bacillus subtilis* beimpfte und dann 1 Tag bei 21° C gelagerte Seitenrumpfmuskulatur einer Schleie. Innerhalb der Fasern werden die Bacillen in diesem Stadium auffallend häufig annähernd parallel zur Fibrillenrichtung angetroffen. (Hensoldt-Diami, Vergrößerung 320fach, GIEMSA-Färbung.)

vorliegenden chemisch-physiologischen Verhältnisse es bei einer Fischgruppe gestatten, eine bestimmte Testmethode anzuwenden, es aber bei einer anderen Fischgruppe notwendig machen können, eine andere Testmethode zu wählen. So mag sich auch bei Elasmobranchiern zur Bestimmung des Frischezustandes die Ermittlung des Ammoniak-Gehaltes noch viel besser bewähren als bei Teleostiern. Bekanntlich wird bei den Knorpelfischen die Isotonie des Blutes um mit dem Meerwasser in erster Linie durch den hohen Harnstoffgehalt erreicht. Da die Urease bei Bakterien allgemein verbreitet ist, dürfte die Zunahme der Bakterien-dichte in der Muskulatur am Anstieg der  $\text{NH}_3$ -Werte hier noch besser zu verfolgen sein als bei den Teleostiern, bei denen die Zunahme des Ammoniaks in erster Linie eine Folgeerscheinung der Proteolyse ist.

Eine Methode, die die wichtigsten der möglichen Veränderungen zugleich erkennen läßt, sollte in ihrer Brauchbarkeit nicht oder kaum von den jeweils gegebenen Lagerbedingungen abhängig sein. Da sowohl die Fischbakterien als auch die histologischen Strukturen des Fischfleisches im Mikroskop sichtbar gemacht werden können, lag es nahe, eine histologische Methode auszuarbeiten, die den Bakterienbefall und die

<sup>1</sup> HESS, E.: Food Technol. 4, 477 (1950).

<sup>2</sup> SIGURDSSON, G. J.: Zit. S. 342, Anm. 5.

strukturell sichtbar werdenden biochemischen Veränderungen der Gewebe zugleich erkennen läßt. Wir konnten zeigen, daß die Bakterien in erster Linie von den Oberflächen her über das Bindegewebe ins Fischinnere gelangen und daß die Metamerie der Fischmuskulatur diesen Vorgang begünstigt<sup>1</sup>. Die Myosepten dienen also geradezu als „Bakterienstraßen“. Daneben ist natürlich auch das Bindegewebe um die Gräten für das Vordringen der Mikroorganismen von Bedeutung (Abb. 6). Nach dem Eindringen in die Muskelfasern läßt sich bei einigen Bacillenstämmen feststellen, daß ihre Hauptfortpflanzungsrichtung zunächst in der weniger zähen, interfibrillären sarkoplasmatischen Substanz liegt (Abb. 7), während die festeren Fibrillen für andere Bakteriengruppen, die ausgesprochen starke Eiweißzersetzer sind, kein Hindernis darzustellen scheinen. Auffallend ist auch der Befund, daß die Veränderungen in eng umrissenen Gewebebezirken sehr unterschiedlich sein können: In weit fortgeschrittenen Zersetzungsstadien können unmittelbar neben stark angegriffenen oder zerstörten Faserteilen auch solche Fasern liegen, die mikroskopisch noch einen nahezu unbeschädigten Eindruck machen.

Diese Ergebnisse lehren, daß nicht — wie schon oben betont wurde — unbedingt die Bakterienzahl ein Maßstab für den Frischezustand zu sein braucht. Es kommt eben sehr auf die Art der Infektion an, und vermutlich sind im gleichen Muskel einzelne Fasern widerstandsfähiger gegen proteolytische Angriffe als andere.

Mag aber das Verfahren wertvolle Aufschlüsse über den Verderbengang gewähren und einen guten Einblick in das komplexe Geschehen der mikrobiellen und enzymatischen Veränderungen geben, so hat es doch den Nachteil, daß es zu zeitraubend ist und keine absoluten Werte liefert wie die vorher besprochenen, objektiven chemischen Methoden. Es ist beabsichtigt, die histologische Methode zu vereinfachen und auch für Reihenuntersuchungen, die konkrete Zahlenangaben liefern sollen, zugänglich zu machen.

#### Zusammenfassung.

Für die Beurteilung geringfügiger Veränderungen bei der Lagerung von Fischfleisch ist es notwendig, die Anfangswerte der zu testenden Stoffe bzw. physikalischen Größen zu kennen. Da man sie in den lagernden Gewebelöcken nur in seltenen Fällen direkt messen kann, wurde die Schwankungsbreite der zu bestimmenden Größen innerhalb einer untersuchten Fischart und dann auch innerhalb eines Tieres unmittelbar nach dem Tode ermittelt. Sie war in allen untersuchten Fällen so groß, daß die bisherigen objektiven Testmethoden nur als Relativmethoden zu werten sind, da die Anfangsveränderungen bei verschiedenen Tieren innerhalb der Schwankungsbreite liegen.

Zur Verfolgung vorwiegend bakterieller Veränderungen der Schleimmuskulatur erscheint der „Tyrosintest“ am geeignetsten. Ihm folgt die Bestimmung des basischen Stickstoffs, während der Aminostickstoffgehalt erst in fortgeschrittenen Zersetzungsstadien merklich ansteigt und somit erst später zur Bewertung herangezogen werden kann.

Histologische und histochemische Methoden sind geeignet, den Verderbengang zu verfolgen und Einblick in das komplexe Geschehen während der Zersetzungsprozesse zu gewähren. Der „Trimethylamintest“ ist nur zur Verfolgung bakterieller Veränderungen von Seefischen zu empfehlen.

<sup>1</sup> PARTMANN, W., u. N. MALTSCHESKY: Diese Z. **93**, 121 (1951).