

Experientia (in press, 1961). — 3. MOLNÁR, Zs., SOMOGYI, Gy. and CSALAY, L., Gastroenterological Congress (Parád, 1960). — 4. SÓS, J., A Kisérleti orvostudomány vizsgáló módszerei. III. Vol. Akadémiai Kiadó (Budapest 1959). — 5. LUDÁNY, G., A Kisérleti orvostudomány vizsgáló módszerei. III. Vol. Akadémiai Kiadó (Budapest 1959). — 6. SINGER, C. Lancet 1913, II, 279. — 7. FIBIGER, J., J. Cancer Research 4, 367 (1919). — 8. PAPPENHEIMER, A. M. and GARIMORE L. D., J. Exp. Med. 40, 719 (1924). — 9. WEECH, A. A. and PAIGE, B. G., Am. J. Pathol. 13, 249 (1937). — 10. LI, T. W. and FREEMAN, S., Gastroenterology 6, 140 (1946). — 11. CHEN, K. C., Am. J. Digest Dis. 8, 28 (1941). — 12. HOELZEL, F. and DA COSTA, E., Am. J. Digest. Dis Nutrition 4, 325 (1937). — 13. ORTEN, A. J., J. Nutrition 17, 13 (1939). — 14. SHARPLESS, G. R., Cancer Res. 3, 108 (1943). — 15. WEISS, A. G. and AROM, E., Presse Med. 41, 1880 (1933). — 16. MANN, F. C. and WILLIAMSON, C. S., Ann. Surg. 74, 409 (1923). — 17. FÜRTH, O. and SCHOLL, R., Klin. Wschr. 1937, II, 1363. — 18. BERG, B. N., Gastroenterology 7, 340 (1946). — 19. SÓS, J., KEMÉNY T., VÉGHÉLYI, P., NAGY, L., ERDÉLYI, G. and TÓTH, E.: Acta Phys. 2, 32 (1951). — 20. CSALAY, L., HORVÁTH, G. and SÓS, J., Acta Physiol. Hung. 5, 293 (1954). — 21. HAHN, P. F., BAUGH, P. and FOSTER D. L., Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 95, 238 (1957). — 22. LUDÁNY, G., GÁTI, T., GELENCSÉR, F. and HÍDEG, J., Pflügers Archiv. 270, 489 (1960). — 23. GÁTI, T., GELENCSÉR, F., HÍDEG, J. and LUDÁNY, G., Ceskoslovenská Fysiologie. 9, 100 (1960). — 24. GÁTI, T., SÓS, J., HARMOS, G. and SVATOS, A., In press, 1961.

Authors' address:

Dr. T. GÁTI, et al. Institute of Pathophysiology Medical University Budapest, Hungary, IX. Högyes E

*Aus der Bundesforschungsanstalt für Lebensmittelfrischhaltung, Karlsruhe*

## Aktivierung der ATP-Spaltung im Warm- und Kaltblütermuskel durch Gefrieren und mechanische Verletzung

Von W. PARTMANN

Mit 15 Abbildungen und 4 Tabellen

(Eingegangen am 5. März 1961)

Während des Auftauens von Warmblütermuskulatur, die unmittelbar nach dem Tode eingefroren wurde, kommt es häufig zu einer Taukontraktur. Sie wird auch als Taurigor bezeichnet. BENDALL und MARSH haben zuerst darauf hingewiesen, daß diese Kontraktur durch die relativ rasche Spaltung von ATP beim Auftauen bedingt ist. Durch das Gefrieren des Gewebes unmittelbar nach dem Tode werden die glykolytischen Prozesse verlangsamt und bei genügend großer Temperatursenkung praktisch fixiert. Das hierbei noch vorhandene ATP bleibt erhalten und wird erst durch die Temperaturerhöhung beim Auftauen unter Entfaltung seiner physiologischen Kontraktionswirkung vollständig gespalten (1). Im Warmblütermuskel, speziell beim

Wal, kann bei dieser Kontraktur etwa 30% des Gewebegegewichtes in Form von Tropfsaft verloren gehen (2). Damit sind erhebliche Verluste an Eiweißen und Vitaminen verbunden.

Bei der Durchsicht der Literatur über den Taurigor und den ATP-Abbau im gefrorenen Gewebe beim Auftauen (3) gewinnt man den Eindruck, daß beide Vorgänge unerwartet rasch ablaufen, die Geschwindigkeit der ATP-Spaltung sogar größer ist als im ungefrorenen Material bei Temperaturen über 0°C. Es erschien uns wünschenswert, diesem Problem, das für das Studium biochemischer Gefrierveränderungen wie für die Erarbeitung optimaler Gefrierbedingungen gleichermaßen interessant ist, nachzugehen. Es wurden daher die pH-Werte und die ATP-Spaltung im Muskelgewebe verschiedener Tierarten im Temperaturbereich zwischen + 20° und - 24°C in Abhängigkeit von der Zeit post mortem gemessen. Dabei wurde in die Untersuchung auch die Frage mit einbezogen, inwieweit bei Fischen und Warmblütern die Temperaturabhängigkeit der ATP-Spaltung unter 0°C übereinstimmt. Wir hofften, damit zugleich einen Beitrag zum experimentell im allgemeinen schwer bearbeitbaren Problem der Enzymaktivitäten in gefrorenen Geweben leisten zu können.

## Material und Methoden

### 1. Material

Als Material dienten die weiße Seitenrumpfmuskulatur von *Cyprinus carpio* L. und von *Salmo irideus* Gibb., der *Musculus pectoralis major* des Haushuhnes (es handelte sich um „rebhuhnfarbige Italiener“), der *Musculus extensor digitalis communis* vom Rind und der *Musculus psoas* vom Rind. Die rote Oberschenkelmuskulatur des Huhnes wurde im allgemeinen nur zur Bestimmung von Anfangswerten benutzt.

Die Fische wurden zur Beruhigung und Temperaturanpassung einen Tag vor dem Schlachten in Wasser von + 10°C gebracht. Die Muskelproben wurden zum frühest möglichen Termin nach dem Töten der Tiere entnommen und wie in den einzelnen Versuchsreihen angegeben, weiterbehandelt. Beim Rindermuskel konnte die erste Probeentnahme erst 1 bis 1½ Stunden nach dem Tode der Tiere erfolgen.

Für die Messung des ATP-Abbaues im Muskel bei verschiedenen Temperaturen wurden Proben bis zu einem Gewicht von 5 g aus dem präparierten Muskel des gerade getöteten Tieres entnommen, an einer Schnur befestigt und in flüssige Luft getaucht. Die hart gefrorenen Proben wurden mit Ausnahme der anschließend bei -2°C gelagerten in polyäthylenbeschichtete Cellophanbeutel gepackt, um Austrocknungsverluste bei längerer Lagerung zu vermeiden und sogleich ins Gefrierlager gegeben. Bis zum Einbringen ins Gefrierlager stieg die Temperatur im Innern der Proben nie über -80°C an. Die bei -2°C und -4°C zu lagern Proben wurden durch rasche Luftumwälzung in einem kleinen Behälter, der in das Bad eines Kühlthermostaten (-2°C) eintauchte und im Fach der Gefriertruhe (-4°C) innerhalb von einer Stunde auf die Lagertemperatur gebracht. Eine rasche Temperatureinstellung gerade bei diesen Temperaturen war erforderlich, um auch bei Lagerzeiten von wenigen Stunden zu brauchbaren Ergebnissen zu kommen. Bei den Lagertemperaturen über 0°C wurden nicht zuvor gefrorene größere Muskelproben, die durch Abdecken mit feuchtem Filtrerpapier vor dem Austrocknen geschützt wurden, verwandt. Die angeschnittenen Außenschichten wurden bei der späteren Probenahme für Versuche nicht benutzt. Dadurch wurde die Verschiebung der Werte durch den rascheren ATP-Abbau vor allen Dingen in den verletzten äußeren Fasern geringer (4). Insgesamt wurden in dieser Versuchsreihe folgende Lagertemperaturen verwandt: + 20°, + 5°, + 2°, -2°, -4°, -8° und -24° C.

## 2. Methoden:

Die Messung des Gehaltes an energiereichem labilen Phosphor =  $\sim P$  (vorwiegend ATP und ADP) und des pH-Wertes der Muskelproben erfolgte nach den an anderer Stelle angegebenen Methoden (4). Kam es darauf an, die ATP-Gehalte und die pH-Werte der gefrorenen Proben zu ermitteln, wurde mit großer Sorgfalt darauf geachtet, daß sie erst beim Zerreiben mit Trichloressigsäure — wenn es sich um die Bestimmung von  $\sim P$  handelte — oder Natriumjodazetatlösung — wenn der pH-Wert gemessen wurde — auftauteten.

Die Temperaturmessungen wurden mit Thermoelementen (Kupfer-Konstanten 0,5 mm Drahtdurchmesser) durchgeführt. Die Temperaturverläufe wurden durch einen Kompensographen mit einer Punktfolge von 4 sec registriert.

## Ergebnisse

### 1. ATP-Anfangsgehalte

Bei der Durchsicht der in Tab. 1 zusammengestellten Anfangsgehalte an labilem, energiereichem P in den untersuchten Proben fallen die hohen Werte für den Brustmuskel des Huhnes auf. Sie bestätigen die insbesondere von LAWRIE aufgedeckte Beziehung zwischen Myoglobingehalt und biochemischen Eigenschaften (6). Der weiße Brustmuskel des Huhnes, der für die kurzen Flatterflüge zu einer großen Arbeitsleistung in kurzer Zeit befähigt sein muß, bedarf eines großen Vorrates an energiereichem Phosphat, zumal die Resynthese über die oxydative Phosphorylierung infolge des Mangels an Myoglobin und vermutlich auch an Mitochondrien recht langsam erfolgen wird. Die hohen ATP-Gehalte sind bei den mäßigen Resynthesemöglichkeiten aber auch deshalb besonders günstig, weil sie dazu beitragen können, daß unter Beteiligung des MARSH-BENDALL-Faktors die ATP-Spaltung im Ruhezustand infolge der Substrathemmung auf das mögliche Minimum herabgesetzt wird (5).

In den roten Oberschenkelmuskeln, die ja bei den schlecht fliegenden Hühnern funktionell einer Dauerbeanspruchung gewachsen sein müssen, sind gute Resynthesemöglichkeiten für das labile energiereiche Phosphat wesentlicher als hohe ATP-Gehalte. Infolgedessen ist es verständlich, daß hier für den  $\sim P$  nur etwa halb so große Ausgangswerte gefunden wurden wie im weißen Brustmuskel (Tab. 1). Da sich die einzelnen Oberschenkelmuskeln jedoch im Myoglobingehalt und funktionell beträchtlich unterscheiden, wird das ATP während der Glykolyse in den einzelnen Muskeln mit voneinander abweichenden Geschwindigkeiten abgebaut. Die kleinen Muskeln, als „Oberschenkelmuskulatur“ zusammengenommen, sind daher für eine Auswertung der Temperaturabhängigkeit der postmortalen ATP-Spaltung ungeeignet.

Bei den Seitenrumpfmuskeln der Fische sowie dem Musculus extensor digitalis communis und dem Musculus psoas des Rindes betragen die Werte für den ATP-Anfangsgehalt zwischen 0,3 und 0,55 mg  $\sim P/g$  Muskulatur. Die in der Hauptsache nach Literaturangaben an anderer Stelle für die ATP-Anfangsgehalte von Säugetier- und Fischmuskeln angegebenen Werte liegen für die Warmblütermuskeln im gleichen Bereich. Für Fischmuskeln finden sich dagegen in dieser Zusammenstellung auch recht viel niedrigere Werte (7). Wir nehmen heute an, daß sie zum Teil von erschöpften Tieren stammen und zum anderen Teil auf Fehler, vor allen Dingen zeitlicher Art, bei der Probennahme und Weiterverarbeitung zurückzuführen sind. Die Hauptursache dieser Fehlerquelle ergibt sich aus den weiteren experimentellen Befunden.

Tabelle 1  
ATP-Anfangsgehalte

Tierart	Muskel	mg ~ P/g Muskel	Datum	Zeit nach dem Schlachten in Stunden
Spiegelkarpfen	weiße Seitenrumpfmuskulatur	0,30	11. 4. 60	~ 0,1
Spiegelkarpfen	weiße Seitenrumpfmuskulatur	0,39	3. 3. 60	~ 0,1
Spiegelkarpfen	weiße Seitenrumpfmuskulatur	0,54	17. 2. 60	~ 0,1
Regenbogenforelle	weiße Seitenrumpfmuskulatur	0,48	30. 3. 60	~ 0,1
Regenbogenforelle	weiße Seitenrumpfmuskulatur	0,48	19. 2. 60	~ 0,1
Regenbogenforelle	weiße Seitenrumpfmuskulatur	0,38	19. 2. 60	~ 0,1
Regenbogenforelle	weiße Seitenrumpfmuskulatur	0,45	22. 3. 60	~ 0,1
Regenbogenforelle	weiße Seitenrumpfmuskulatur	0,43	22. 3. 60	~ 0,1
Regenbogenforelle	weiße Seitenrumpfmuskulatur	0,54	22. 3. 60	~ 0,1
Regenbogenforelle	weiße Seitenrumpfmuskulatur	0,40	3. 5. 60	~ 0,1
Regenbogenforelle	weiße Seitenrumpfmuskulatur	0,40	3. 5. 60	~ 0,1
Regenbogenforelle	weiße Seitenrumpfmuskulatur	0,44	24. 5. 60	~ 0,1
Rind	Musc. extensor digit. com.	0,37	14. 3. 60	~ 1
Rind	Musc. extensor digit. com.	0,40	28. 3. 60	~ 1
Rind	Musc. extensor digit. com.	0,38	9. 5. 60	~ 1
Rind	Musc. extensor digit. com.	0,34	4. 4. 60	~ 1
Rind	Musc. psoas	0,31	18. 7. 60	~ 1
Rind	Musc. psoas	0,33	20. 6. 60	~ 1
Haushuhn	Musc. pectoralis major	0,59	12. 7. 60	~ 0,1
Haushuhn	Musc. pectoralis major	0,86	5. 7. 60	~ 0,1
Haushuhn	Musc. pectoralis major	0,63	14. 7. 60	~ 0,1
Haushuhn	rote Oberschenkelmuskeln	0,27	12. 7. 60	~ 0,5
Haushuhn	rote Oberschenkelmuskeln	0,28	5. 7. 60	~ 0,5
Haushuhn	rote Oberschenkelmuskeln	0,23	14. 7. 60	~ 0,5

*2. ATP-Abbau im frisch entnommenen, ungefrorenen Muskelblock und im aufgetauten Muskelblock*

Die bereits von anderen Autoren bei der Taukontraktur und in eigenen Versuchen zur Ermittlung des Anfangsgehaltes an ~P in verschiedenen Muskeln erhaltenen Ergebnisse ließen vermuten, daß nach dem Auftauen eine raschere Nukleotidspaltung erfolgt als im ungefrorenen Gewebe. Zur Nachprüfung dieser Annahme wurde nach dem Tode der Tiere der ATP-Abbau im Muskelstreifen von Regenbogenforellen, Karpfen und im Muskelstreifen aus dem Musculus psoas des Rindes nach dem Einfrieren in flüssiger Luft und nach übereinstimmenden Gefrierlagerzeiten im gefrorenen und im aufgetauten Zustand mit dem ATP-Abbau im Muskelstreifen desselben Tieres verglichen, der bei +10°C gelagert wurde. Der enzymatische Abbau der energiereichen Phosphatverbindungen wurde durch Zusatz von Trichloressigsäure vor dem Zerreiben der Muskelproben unterbunden. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß das Einfrieren in flüssiger Luft — also mit großer Gefriergeschwindigkeit — praktisch mit keinem ATP-Verlust verbunden ist. Auch während der relativ kurzen Lagerzeit von einem Tage findet bei —190°C erwartungsgemäß kein ATP-Abbau

Tabelle 2

ATP-Abbau im Muskelstreifen vom Seitenrumpfmuskel des Karpfens und der Regenbogenforelle sowie vom Musculus psoas des Rindes nach dem Einfrieren in flüssiger Luft im gefrorenen und im aufgetauten Zustand, verglichen mit dem ATP-Abbau im analogen Muskelstreifen (bei Fischen Filet der anderen Seite) desselben Tieres, der bei + 10° C gelagert wurde.

Muskel von	Trichloressigsäure-zusatz nach dem Tode	mg ~ P/g Muskelgewebe		
		ungefroren	gefroren	gefroren u. aufgetaut
Spiegelkarpfen	10 min	0,45	0,46	—
Spiegelkarpfen	35 min	0,42	0,46	0,11
Spiegelkarpfen	5,5 h	0,51	0,53	0,03
Spiegelkarpfen	25 h	0,25	0,46	0,07
Regenbogenforelle	11 min	0,32	0,36	—
Regenbogenforelle	36 min	0,30	0,35	0,06
Regenbogenforelle	5,3 h	0,30	—	0,02
Regenbogenforelle	24 h	0,02	0,36	0,02
Rind	1 h	0,29	0,30	—
Rind	1,5 h	0,24	0,29	0,24
Rind	4 h	0,23	0,26	0,20
Rind	24 h	0,05	0,28	0,22

statt. Dagegen ist in den gefrorenen und dann sofort aufgetauten Fischproben bereits etwa eine halbe Stunde nach dem Tode der Großteil der labilen energiereichen Phosphate gespalten. Im ungefrorenen Muskel haben sie zu diesem Zeitpunkt erst unwesentlich abgenommen.

Im Rindermuskel wird das ATP nach Auftaubeginn wesentlich langsamer gespalten als im Fischmuskel; wie Abb. 1 erkennen läßt, sind noch zwei Stunden nach Auftaubeginn ~ 40% des ATP-Anfangsgehaltes vorhanden. Durch das Gefrieren und Auftauhen bei + 10° C wird das ATP im Musculus psoas des Rindes etwa 5mal so schnell hydrolysiert wie im nicht gefrorenen Muskel bei derselben Temperatur (Tab. 2 und Abb. 1). Im Karpfen- und Forellennmuskel beschleunigen Gefrieren und Auftauhen den Zerfall des energiereichen Phosphates etwa 50–200fach.

Es ergibt sich somit, daß das Einfrieren von Muskelgewebe in flüssiger Luft zur „Fixierung“ des Nukleotidbestandes nur dann sinnvoll ist, wenn es bis zur Inaktivierung der beteiligten Enzyme z. B. durch Trichloressigsäure nicht zu einer Temperaturerhöhung — selbst von kurzer Dauer — kommt. Taut das Gewebe auf, so werden die energiereichen Phosphate im Vergleich zu denen der ungefrorenen Proben beschleunigt hydrolysiert. Die Unkenntnis dieser Zusammenhänge kann insbesondere bei analytischen Phosphatbestimmungen am lebendfrischen Fischmuskel zu schweren Fehlern führen. Es ist zu fragen, ob die offenbar durch das Einfrieren bzw. Auftauhen des Muskelgewebes bedingte Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit der Nukleotidspaltung sich bereits bei Temperaturen unterhalb des Gefrierbeginns bemerkbar macht. Darüber sollte die folgende Versuchsreihe Auskunft geben.

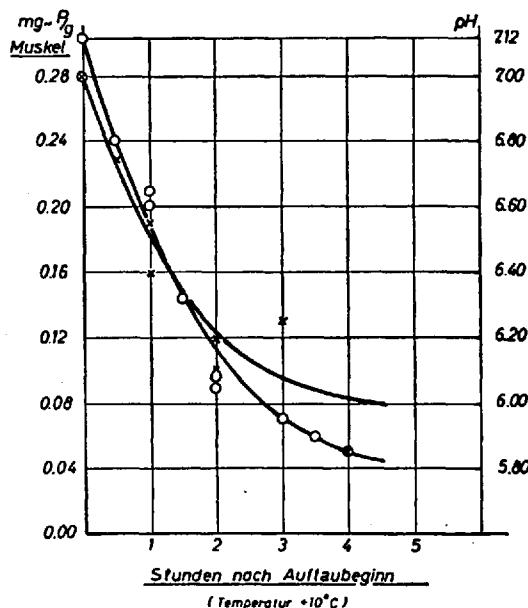


Abb. 1. ATP-Abbau und pH-Werte im aufgetauten Muskelstreifen vom Musculus psoas des Rindes. Der Muskelstreifen wurde in flüssiger Luft gefroren, anschließend einen Tag bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagert und dann bei  $+10^{\circ}\text{C}$  aufgetaut. ATP-Gehalte  $\times$ , pH-Werte  $\circ$ .

### 3. ATP-Abbau im Muskel bei verschiedenen Temperaturen

Maßgeblich für die Planung der Versuchsdurchführung war die Fragestellung, ob das ATP im normalen Muskelgewebe über  $0^{\circ}\text{C}$  langsamer gespalten wird als im gefrorenen Gewebe des gleichen Materials in der Nähe des Gefrierbeginns. Um im Gefrierbereich vergleichbare Meßergebnisse zu erhalten, erschien es uns notwendig, die Temperatur in allen Fällen rasch zu

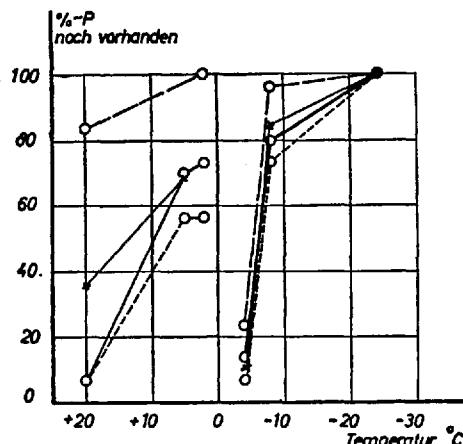


Abb. 2. Gehalte an labilem energiereichen Phosphat ( $\sim\text{P}$ ) in Muskelstreifen von 2 Karpfen ( $\times$  und  $\circ$ ) zu verschiedenen Zeiten nach dem Tode (--- 18 Std., —— 24 Std. und -·-·- 48 Std.) in Abhängigkeit von der Temperatur.

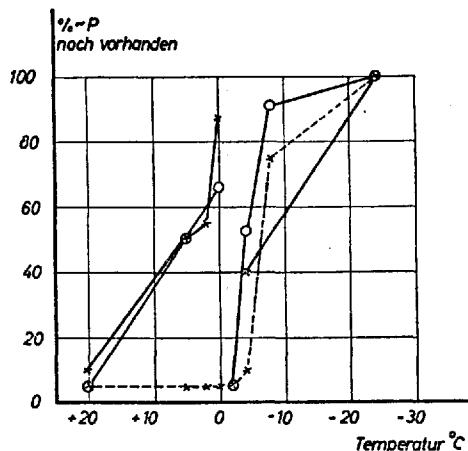


Abb. 3. Gehalte an  $\sim P$  in Muskelstreifen von 2 Regenbogenforellen ( $\times$  und  $\circ$ ) 5,5 Stunden (—) und 24 Stunden (-----) nach dem Tode in Abhängigkeit von der Temperatur.

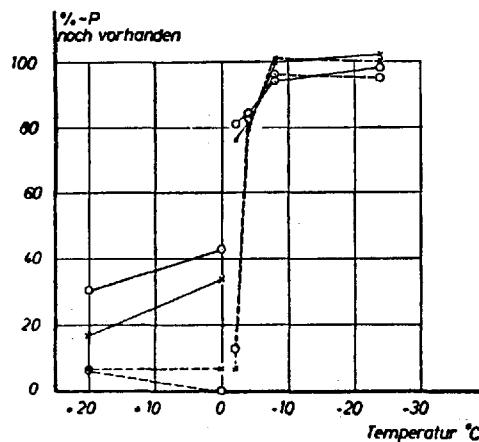


Abb. 4. Gehalte an  $\sim P$  in Streifen aus dem Musculus pectoralis major zweier Haushühner ( $\times$  und  $\circ$ ) 4 Stunden (—) und 24 Stunden (-----) nach dem Tode in Abhängigkeit von der Temperatur.

senken, die Einfrierbedingungen konstant zu halten und insbesondere bei möglicherweise auftretenden großen Reaktionsgeschwindigkeiten für die ATP-Spaltung in der Nähe des Gefrierbeginns möglichst schnell auf die gewünschte Lagertemperatur einzustellen. Durch das Eintauchen der Proben in flüssige Luft wurden ohne ATP-Verluste und ohne schwerwiegende Folgen von Unterkühlungseffekten geeignete Einfrierbedingungen geschaffen (s. S. 2).

Oberhalb der Temperatur des Gefrierbeginns wurde am gleichen, aber ungefrorenen Muskelmaterial gemessen.

In den Abb. 2 bis 5 sind die zu 2 oder 3 verschiedenen Zeitpunkten nach dem Tode ermittelten ATP-Gehalte (bezogen auf den Anfangsgehalt) im Karpfen- (Abb. 2), Forellen- (Abb. 3), Hühner- (Abb. 4) und Rindermuskel

(Abb. 5) dargestellt. Es wird deutlich, daß in den weißen Seitenrumpfmuskeln der Fische der ATP-Abbau bei  $-4^{\circ}$  und  $-2^{\circ}\text{C}$  wesentlich rascher verläuft als im ungefrorenen Muskel bei  $+10^{\circ}\text{C}$ . Im Temperaturbereich des Gefrierbeginns wird somit die ATP-Spaltung in den weißen Muskeln von Forelle und

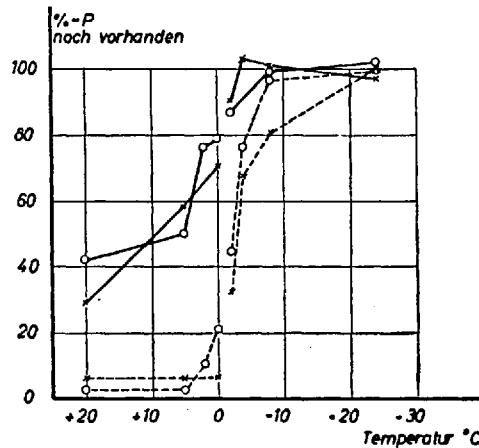


Abb. 5. Gehalte an  $\sim\text{P}$  in Streifen aus dem Musculus psoas (×) und dem Musculus extensor digitalis communis (○) des Rindes 7 Stunden (—) und 21 Stunden (-----) nach dem Tode

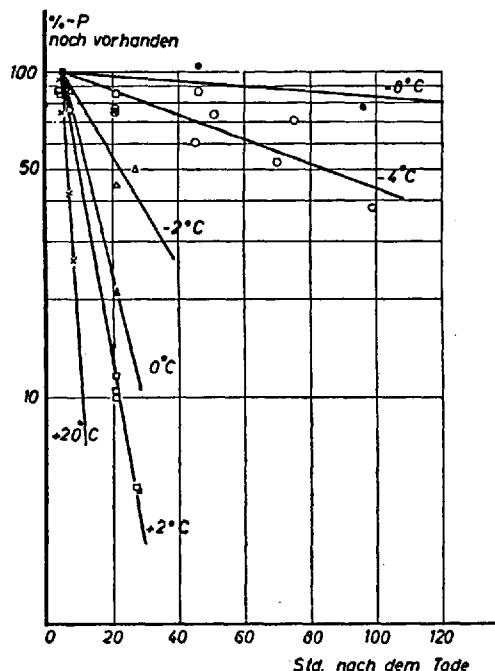


Abb. 6. Gehalte an  $\sim\text{P}$  in Muskelstreifen aus dem Musculus extensor digitalis communis des Rindes in den ersten 100 Stunden nach dem Tode in Abhängigkeit von der Temperatur ( $-8^{\circ}\text{C}$  ●,  $-4^{\circ}\text{C}$  ○,  $-2^{\circ}\text{C}$  △,  $0^{\circ}\text{C}$  ▲,  $+2^{\circ}\text{C}$  □ und  $+20^{\circ}\text{C}$  ×)

Karpfen im gefrorenen Zustand stark aktiviert. Dieser Aktivierungseffekt wurde dagegen im Musc. pectoralis major des Huhnes (Abb. 4) und im Rindermuskel (Abb. 5) nicht beobachtet. Bei den beiden Warmblütern wurde die normalerweise zu erwartende Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit sinkender Temperatur gefunden.

Um zu genaueren Vorstellungen über die Veränderungen der Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Temperatur zu kommen, sollte bekannt sein, nach welcher Ordnung die enzymatische ATP-Spaltung im Muskelgewebe erfolgt. Wie die in Abb. 6 gewählte halblogarithmische Darstellung des ATP-Abbaus im Musculus extensor digitalis communis des Rindes in den ersten 100 Stunden nach dem Tode bei Lagertemperaturen von  $-8^{\circ}$ ,  $-4^{\circ}$ ,  $-2^{\circ}$ ,  $0^{\circ}$ ,  $+2^{\circ}$  und  $+20^{\circ}\text{C}$  erkennen läßt, folgt die ATP-Hydrolyse offenbar dem Schema einer monomolekularen Reaktion. Auch die für Hühner-, Karpfen- und Forellenmuskel in Abhängigkeit von der Zeit nach dem Tode ermittelten ATP-Werte waren für eine bestimmte Temperatur und Tierart am besten als Ergebnisse einer nach der ersten Ordnung verlaufenden Reaktion zu interpretieren. Die unter Zugrundelegung eines formal monomolekularen Reaktionsablaufes ermittelten Geschwindigkeitskonstanten können bei den stark streuenden Meßwerten nur angenähert als richtig gelten. Sie sind aber sicher nicht so ungenau, daß die aus ihrer Größe gezogenen und nunmehr zu diskutierenden Schlußfolgerungen zweifelhaft wären. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden für die Warmblütermuskeln in Abb. 7 und für die Fischmuskeln in Abb. 8 in Abhängigkeit von der Temperatur eingezeichnet. Bei der gewählten halblogarithmischen Darstellung erkennt man, daß sich der Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeiten (bei gleicher ATP-Ausgangsmenge) im Temperaturbereich von  $-8^{\circ}$  bis  $-0,8^{\circ}\text{C}$  und von  $-0,8^{\circ}$  bis  $+20^{\circ}\text{C}$  jeweils

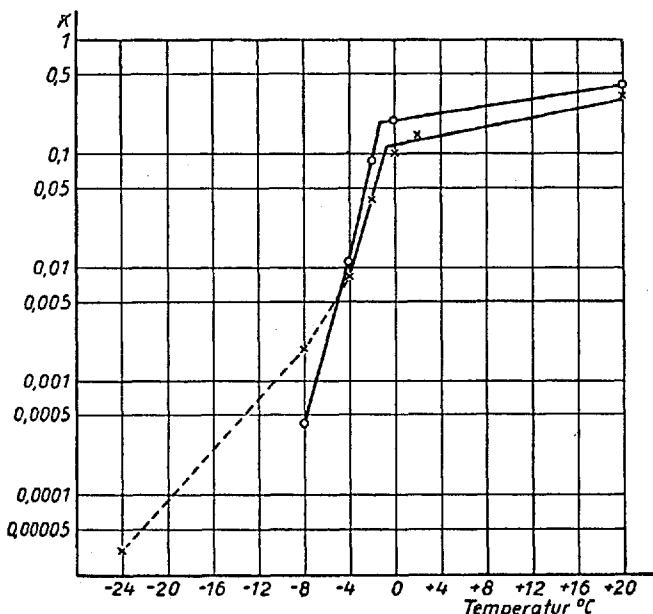


Abb. 7. Geschwindigkeitskonstanten ( $K$ ) für den ATP-Abbau im Musculus extensor digitalis communis des Rindes (x) und im Musculus pectoralis major des Haushuhnes (o) in Abhängigkeit von der Temperatur

durch eine Gerade darstellen läßt. Lediglich beim Rindermuskel wurden unterhalb von  $-4^{\circ}\text{C}$  größere Geschwindigkeitskonstanten ermittelt als nach dem bisherigen Verlauf unterhalb des Gefrierbeginns zu erwarten gewesen wären. Es wird deutlich, daß sich bei etwa  $-1^{\circ}\text{C}$ , also bei Gefrierbeginn des Muskelgewebes, der Reaktionsmechanismus für die ATP-Spaltung stark verändert. Aus dem Verlauf der Kurvenabschnitte oberhalb und unterhalb der Temperatur des Gefrierbeginns folgt, daß die Reaktionsgeschwindigkeiten für die beiden verglichenen Muskeln jeder Abbildung (7 und 8) angenähert dieselbe Temperaturabhängigkeit besitzen. Im Temperaturbereich zwischen 0 und  $20^{\circ}\text{C}$  wurden für den ATP-Abbau folgende  $Q_{10}$ -Werte errechnet: für den Karpfenmuskel 2,52, für den Forellenmuskel 2,64, für den Musc. extensor digitalis communis des Rindes 1,66, für den Musc. pectoralis major des Huhnes 1,40. BENDALL ermittelte für den ATP-Abbau im Kaninchenmuskel bei  $+20^{\circ}\text{C}$  einen  $Q_{10}$ -Wert von 1,63 (9). Für die postmortalen pH-Veränderungen im Rindermuskel im Temperaturbereich zwischen 7 und  $33^{\circ}\text{C}$  wurden von MARSH ebenfalls  $Q_{10}$ -Werte unter 2 bestimmt (10).

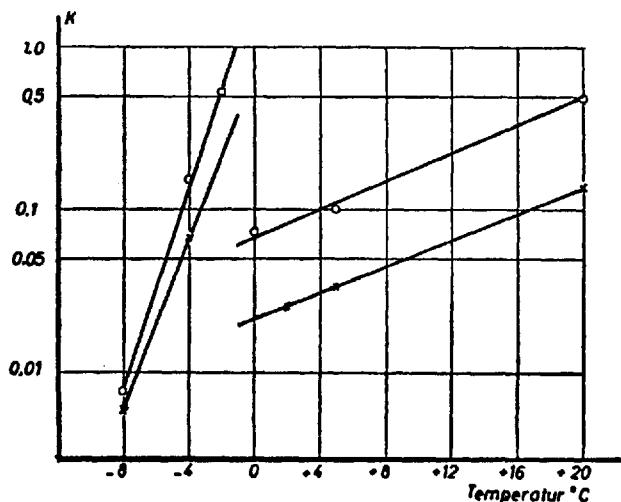


Abb. 8. Geschwindigkeitskonstanten ( $K$ ) für den ATP-Abbau im weißen Seitenrumpfmuskel vom Spiegelkarpfen ( $\times$ ) und Regenbogenforelle ( $\circ$ ) in Abhängigkeit von der Temperatur

Im Temperaturbereich wenig unter  $-1^{\circ}\text{C}$  wird auch in dieser Darstellung (Abb. 8) die bei Fischen schon weiter oben erkannte starke Aktivierung der ATP-Spaltung durch das Gefrieren deutlich. Nur um die Größenordnung zu charakterisieren, sei erwähnt, daß wir im Bereich zwischen  $-2$  und  $-4^{\circ}\text{C}$  für Karpfenmuskel einen  $Q_{10}$ -Wert von  $\sim 400$  und für Regenbogenforelle von  $\sim 1000$  ermittelten. Im Rindermuskel betrug der berechnete Wert etwas über 2000 und für Hühnermuskel im Temperaturbereich zwischen  $-2^{\circ}$  und  $-8^{\circ}\text{C}$  sogar über 7000. Derart hohe Temperaturquotienten sind unseres Wissens bei enzymatischen Reaktionen nur dann berechnet worden, wenn in dem betreffenden Temperaturbereich das Enzymeiweiß denaturierte (8). Es erscheint uns schwer vorstellbar, daß mit Gefrierbeginn die für die ATP-Spaltung verantwortlichen fibrillären Muskelproteine denaturieren und darauf die hohen

$Q_{10}$ -Werte zurückzuführen sind. Wir vermuten vielmehr, daß die mit Gefrierbeginn einsetzende Umstellung des Reaktionsmechanismus und die zur Einstellung des neuen Gleichgewichtszustandes erforderlichen Temperatur- und Zeitbedingungen dafür verantwortlich sind. Die Reaktion sollte nach Einstellung des neuen Reaktionsmechanismus mit kleineren, für enzymatische Vorgänge typischen Temperaturquotienten weiterlaufen. Daß dieses der Fall ist, könnte für Rindermuskel aus dem deutlich flacher werdenden Kurvenverlauf für die Geschwindigkeitskonstanten unterhalb von  $-4^{\circ}\text{C}$  (Abb. 7) entnommen werden. Bei den übrigen Muskeln ist dieser neue Gleichgewichtszustand bei  $-8^{\circ}\text{C}$  offenbar noch nicht erreicht. Insgesamt sind die Vorgänge in den viele Komponenten und Strukturen enthaltenden Muskelfasern natürlich weit komplizierter und kinetisch schwerer zu deuten als etwa in einfachen Zweistoffsystemen. Die Reaktionen können durch Permeabilitätsveränderungen, wie sie beim Gefrieren von Zellen häufig beobachtet wurden, grundlegend umgestaltet werden. Hinzu kommt, daß durch das Gefrieren mit sinkender Temperatur die wässrige Phase mehr und mehr abnimmt und damit Hand

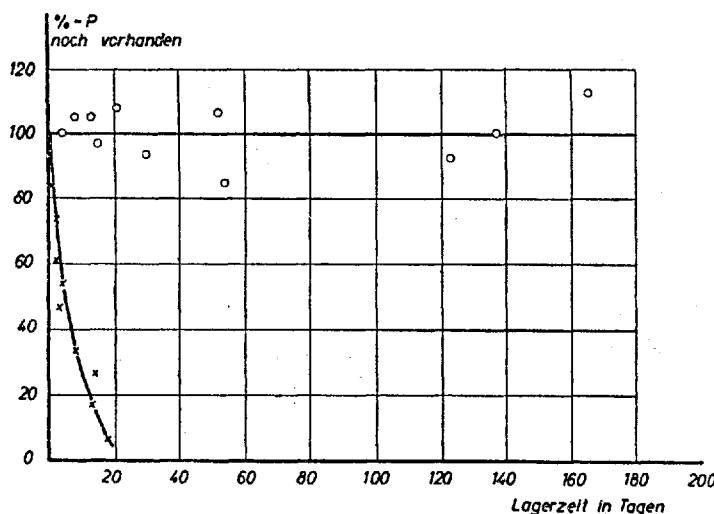


Abb. 9. Enzymatische Spaltung des  $\sim\text{P}$  in der Seitenrumpfmuskulatur des Karpfens bei  $-8^{\circ}\text{C}$  (x) und  $-24^{\circ}\text{C}$  (○) in Abhängigkeit von der Gefrierlagerzeit

in Hand die Ionenkonzentration zunimmt. Beide Vorgänge werden die Reaktionsgeschwindigkeit, zumindest in gewissen Temperaturbereichen, stärker beeinflussen als die in diesem Bereich erfolgte Temperaturveränderung. Im aufgetauten Gewebe wird der durch das Gefrieren in Kraft getretene neue Reaktionsmechanismus, der offenbar auch nach der Stabilisierung noch höhere Temperaturquotienten besitzt als der im ungefrorenen Gewebe tätige, auch bei Temperaturen über  $0^{\circ}\text{C}$  noch wirksam sein. Damit wird verständlich, daß wohl im aufgetauten Warmblütermuskelgewebe, aber nicht im gefrorenen, die Reaktionsgeschwindigkeit für die ATP-Spaltung größer ist als im nicht gefroren gewesenen und damit völlig intakten Gewebe bei derselben Temperatur. Bei den Fischmuskeln werden die Verhältnisse dadurch zunächst komplizierter,

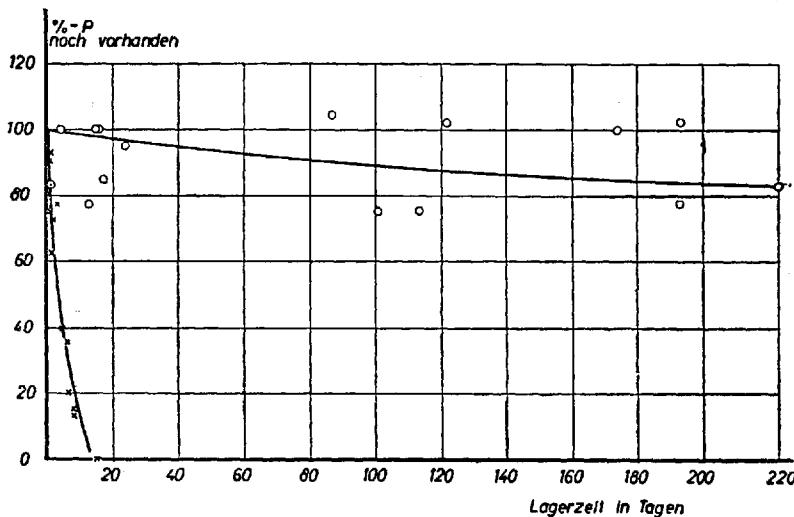


Abb. 10. Enzymatische Spaltung des ~P in der Seitenrumpfmuskulatur der Regenbogenforelle bei  $-8^{\circ}\text{C}$  (X) und  $-24^{\circ}\text{C}$  (O) in Abhängigkeit von der Gefriermärktezeit

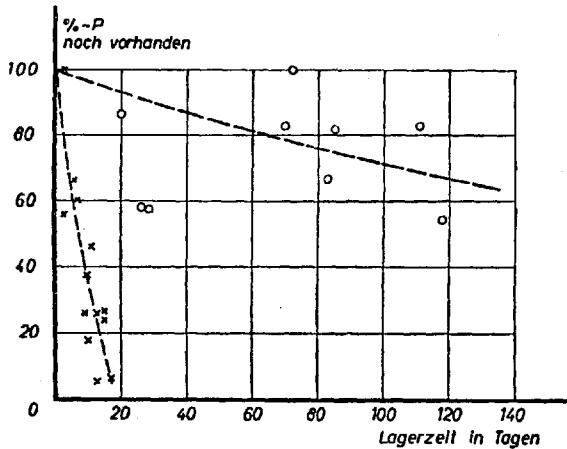


Abb. 11. Enzymatische Spaltung des ~P im Musculus pectoralis major des Huhnes bei  $-8^{\circ}\text{C}$  (X) und  $-24^{\circ}\text{C}$  (O) in Abhängigkeit von der Gefriermärktezeit

daß die beiden Reaktionsmechanismen durch den Gefriervorgang bedingt, sich anscheinend beziehungslos ablösen, ohne Übergang im Gegensatz zum Rindermuskel und mit ganz unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten bei der Temperatur des Gefrierbeginns.

Um abzuschätzen, nach welcher Gefriermärktezeit noch mit einer Taukontraktur zu rechnen ist, wurden die für die einzelnen Muskeln und Lagertemperaturen  $-8^{\circ}$  und  $-24^{\circ}\text{C}$  ermittelten ATP-Gehalte in Abhängigkeit von der Märktezeit dargestellt (Abb. 9–12). Wenn man berücksichtigt, daß ein kleiner Teil des Nukleotids an die Muskelproteine gebunden ist und nicht

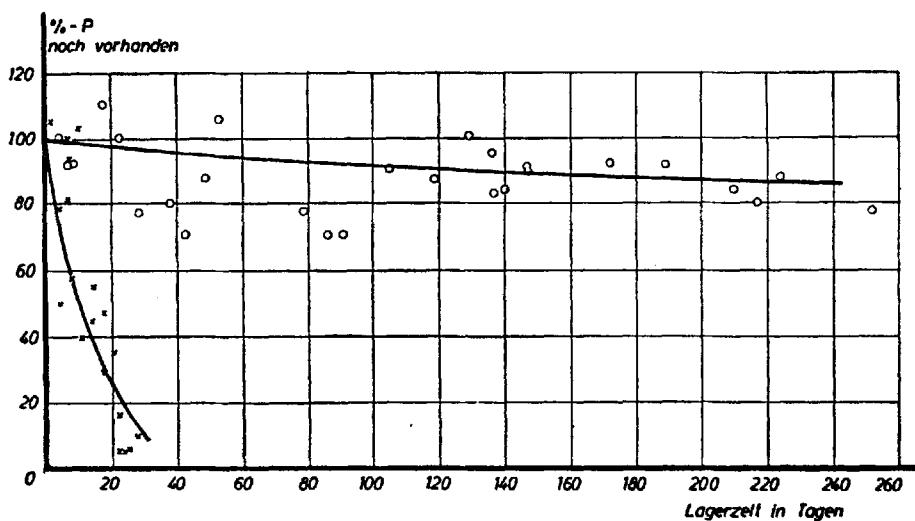


Abb. 12. Enzymatische Spaltung des  $\sim$ P im Rindermuskel bei  $-8^{\circ}\text{C}$  ( $\times$ ) und  $-24^{\circ}\text{C}$  ( $\circ$ ) in Abhängigkeit von der Gefrierlagerzeit

enzymatisch gespalten wird, ergibt sich, daß bei  $-8^{\circ}\text{C}$  die ATP-Hydrolyse im Forellenmuskel bereits nach 10 Tagen, im Musculus pectoralis major des Huhnes sowie im Karpfenmuskel nach 20 Tagen und im Rindermuskel (Musculus psoas und Musculus extensor digitalis communis zusammengenommen) — hier offenbar mit Unterschieden von Muskel zu Muskel — nach etwa 25 Tagen abgeschlossen ist. Bei einer Lagertemperatur von  $-24^{\circ}\text{C}$  wurde nach Lagerzeiten bis zu einem halben Jahr bei relativ stark streuenden Meßwerten noch der Großteil des unmittelbar post mortem vorhandenen energiereichen Phosphates wiedergefunden.

Wie bereits früher festgestellt wurde (4, 9, 10), besteht bei den postmortalen Vorgängen im Muskel eine enge Beziehung zwischen ATP-Abbau und pH-Senkung. Auch hier ergab sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen beschleunigtem ATP-Abbau im Fischmuskel bei Gefrierbeginn und rascher pH-

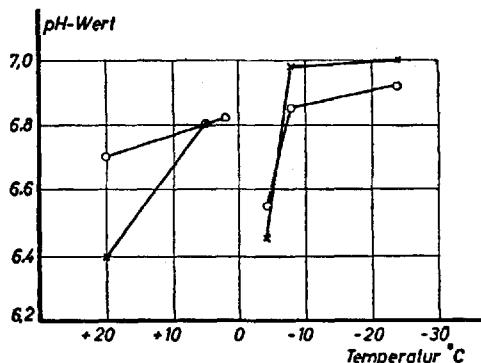


Abb. 13. pH-Wert in Streifen aus den weißen Seitenrumpfmuskeln zweier Karpfen ( $\circ$  und  $\times$ ) einen Tag nach dem Tode in Abhängigkeit von der Lagertemperatur

Senkung (Abb. 13). Unterhalb des Gefrierbeginns ist ebenfalls die Abnahme des ATP-Gehaltes mit einem meßbaren Absinken des pH-Wertes gekoppelt (Abb. 14). Es ergibt sich somit, daß die postmortale Glykolyse im negativen Temperaturbereich weiterläuft und ihre Reaktionsgeschwindigkeit mit sinkender Temperatur außerordentlich stark verlangsamt wird.

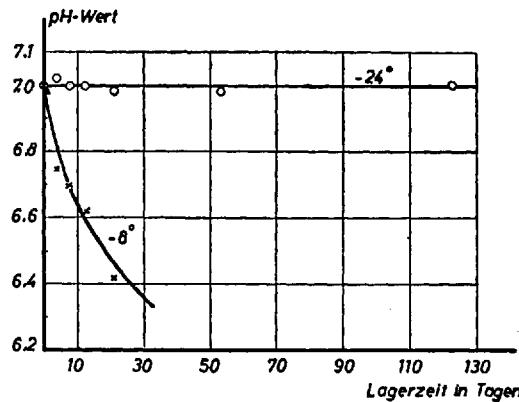


Abb. 14. Veränderung des pH-Wertes in Streifen aus dem weißen Seitenrumpfmuskel des Karpfens bei  $-8^{\circ}\text{C}$  ( $\times$ ) und  $-24^{\circ}\text{C}$  ( $\circ$ ) in Abhängigkeit von der Lagerzeit

#### 4. ATP-Abbau im zerkleinerten und unzerkleinerten Muskelgewebe

Wie bereits weiter oben gezeigt wurde, dürfte mit dem Gefrierbeginn der Reaktionsmechanismus für die ATP-Spaltung im Muskel sich verändern. Es ist naheliegend daran zu denken, daß es sich hierbei um einen „Verletzungseffekt“ handelt. Damit ist gemeint, daß die durch das Gefrieren bedingte Verletzung des Gewebes die ATP-Spaltung im Fischmuskel stark aktiviert, während sie die Reaktionsgeschwindigkeit im Rindermuskel erst bei Temperaturen über  $0^{\circ}\text{C}$  erhöht. (Abb. 1)

Falls unsere Annahme stimmt, sollten sich beim Vergleich des ATP-Abbaues über  $0^{\circ}\text{C}$  im zerkleinerten und intakten Muskelstreifen von untersuchten Kalt- und Warmblütern wesentliche Unterschiede ergeben. Wie Tabelle 3 lehrt, sind bei Karpfen, Regenbogenforelle und Rindermuskel die Anfangswerte für den ATP-Gehalt wenige Minuten nach Muskelentnahme im Muskelstreifen und Muskelbrei fast gleich groß und betragen  $0,3\text{--}0,5\text{ mg } \sim\text{P/g Muskel}$ . Bereits eine halbe Stunde später ist bei den Fischen das gesamte energiereiche Phosphat im Muskelbrei bei  $+20^{\circ}\text{C}$  abgebaut, während es im Muskelstreifen noch kaum abgenommen hat. Beim Rindermuskel hat dagegen auch der Muskelbrei nach einer halben Stunde nur wenig an enzymatisch spaltbarem energiereichen Phosphat verloren. Nach einer Lagerzeit von 5,5 Stunden bei  $+5^{\circ}\text{C}$  waren im Muskelstreifen von Rind und Fisch und im Muskelbrei vom Rindermuskel noch beträchtliche Mengen an labilem  $\sim\text{P}$  vorhanden. Beim Rindermuskel ist also auch die Aktivierung der ATP-Spaltung durch Zerkleinerung wesentlich geringer als beim Fischmuskel.

Die durch Gefrieren und Zerkleinerung bedingten „Verletzungseffekte“ beruhen offenbar auf einer Zerstörung oder Inaktivierung des MARSH-BENDALL-

Tabelle 3

ATP-Abbau und pH-Werte im Muskelbrei und Muskelstreifen vom Seitenrumpfmuskel des Karpfens, der Regenbogenforelle und vom Musculus psoas des Rindes bei + 5° C in Abhängigkeit von der Zeit nach dem Tode

Muskel vom	Zeit nach dem Tode in Stunden*)	Muskelbrei		Muskelstreifen	
		mg~P/g Muskel	pH-Wert	mg~P/g Muskel	pH-Wert
Spiegelkarpfen	0	0,30	7,00	0,32	7,08
	0,5	0,04	6,88	0,28	7,00
	5,5	0,00	6,88	0,26	7,00
	24	0,02	6,86	0,16	6,89
Regenbogenforelle	0	0,25	7,05	0,48	7,10
	0,5	0,02	6,90	0,43	7,00
	5,5	0,04	6,90	0,37	7,00
	24	0,00	6,90	0,08	6,90
Rind	0	0,29	6,80	0,30	6,88
	0,5	0,27	6,48	0,29	6,78
	5,5	0,18	6,10	0,24	6,49
	21	0,03	5,71	0,06	5,88

Faktors (Erschlaffungsfaktor). Die in der ruhenden lebenden Muskelfaser durch seine Mitwirkung auf Distanz gehaltenen Aktin- und Myosinfilamente gleiten in den assoziierten Zustand zurück. Während zuvor nur die L-Myosin-ATP-ase wirksam war, ist jetzt die Aktomyosin-ATP-ase mit ihrer weit größeren Aktivität (11) wirksam. Die Befunde machen wahrscheinlich, daß die Vorgänge, die zum Unwirksamwerden des Erschlaffungsfaktors durch „Verletzung“ und zu allen Folgeerscheinungen führen, in den untersuchten Fischmuskeln rascher und u. U. auch vollständiger ablaufen als im Warmblütermuskel. Damit stimmt überein, daß man bei der Extraktion von Karpfenmuskel mit KCl-Lösung — also nach der Zerkleinerung — bei pH 7,1 und  $\mu$  0,35 nur Aktomyosin erhält, während man unter denselben Bedingungen aus Kaninchenmuskel Aktomyosin und Myosin gewinnt (12).

Als Ursache für die Hemmung des Erschlaffungsfaktors kommt die Einwanderung von Ca-Ionen in das Innere der Muskelfasern in Betracht. Man nimmt bekanntlich an, daß auch bei der Muskelkontraktion  $Ca^{++}$  von der Fasermembran herein dringen, den MARSH-BENDALL-Faktor inaktivieren und dadurch die aktive Muskelbewegung auslösen. Die Annahme eines einfachen Diffusionsprozesses für die Ca-Wanderung erscheint allerdings recht zweifelhaft. MUELLER zeigte, daß bereits  $10^{-3}$  mmol freies Ca/ml in Gegenwart von  $3 \cdot 10^{-3}$  mmol ATP/ml den Erschlaffungsfaktor hemmen (15). Es ist anzunehmen, daß beim Gefrieren und Zerkleinern von Muskelfasern die Permeabilität der Fasermembran verändert wird. Dieser „Verletzungseffekt“ könnte den

\*) Beim Rindermuskel nach der Präparation des Muskels, die etwa eine Stunde nach dem Tode erfolgte

Zutritt der  $\text{Ca}^{++}$  zum Faserinneren ermöglichen und somit über die Inaktivierung des MARSH-BENDALL-Faktors die Umwandlung der L-Myosin-ATP-ase in die Actomyosin-ATP-ase bewirken. Es ist ferner denkbar, daß diese Permeabilitätsveränderungen sich bei den Muskelfasern von Kalt- und Warmblütern unterschiedlich auswirken, wie das z. B. beim Gefrieren von Erythrozyten verschiedener Warmblüterarten festgestellt wurde (16).

Möglicherweise unterscheiden sich darüber hinaus auch die Transportvorgänge für das Ca innerhalb der Muskelfasern weit entfernter Tierarten beträchtlich. Damit wären uns möglich erscheinende Ursachen für die unterschiedliche Auswirkung des „Verletzungseffektes“ in Warm- und Kaltblütermuskeln aufgezeigt.

Man könnte die Bildung des Aktomyosinkomplexes im Sinne der von NORD aufgestellten Desaggregations-Aggregations-Hypothese deuten (17). Jedoch dürfte damit für die kausale Analyse des beobachteten Phänomens wenig gewonnen werden.

##### 5. ATP-Gehalte im Süßwasserfisch nach dem Einfrieren

Die Ergebnisse über die Temperaturabhängigkeit der ATP-Spaltung im Gefrierbereich lassen erwarten, daß beim Gefrieren von isolierten Warmblütermuskeln unmittelbar nach dem Tode, etwa im bewegten Luftstrom, noch ein großer Teil des ATP erhalten bleibt. Beim Auftauen kommt es dann häufig zur Taukontraktur. Der *in situ* belassene Warmblütermuskel, der an verschiedenen Skeletteilen in seiner Lage mehr oder weniger fixiert ist, zeigt jedoch eine weniger ausgeprägte Taukontraktur als der isolierte (13). An warmen Rindervierteln, die sofort nach dem Schlachten in einem Gefriertunnel bei  $-35^{\circ}\text{C}$  und einer Windgeschwindigkeit von  $\sim 1,25 \text{ m/sec}$  gefroren wurden, fand man, daß bei Ihnen die Totenstarre bereits begonnen hatte, bevor sie durchgefroren waren (14). In Rindervierteln, die unter derzeit meist üblichen Bedingungen gefroren und gelagert werden, ist daher nicht mit einer Taukontraktur zu rechnen.

Da bei den untersuchten Süßwasserfischen die ATP-Spaltung bei Gefrierbeginn wesentlich rascher als im Warmblütermuskel verläuft, sind bei vergleichbaren Dimensionen und infolgedessen auch vergleichbaren Gefriergeschwindigkeiten die ATP-Verluste im Fischmuskel größer als im Warmblütermuskel. Das wird insbesondere der Fall sein, wenn Forellen und Karpfen unmittelbar nach dem Tode, z. B. in dicken Blöcken, gefroren werden. Beim Gefrieren von kleineren Einzelfischen, speziell von Forellen, ist zu bedenken, daß infolge der relativ geringen Schichtdicken die Gefriergeschwindigkeit recht groß sein wird. Genaueren Einblick in die ATP-Verluste beim Gefrieren dieser Fische sollten einige orientierende Versuche ergeben. In der Seitenrumpfmuskulatur der Regenbogenforelle von  $\sim 250 \text{ g}$  Gewicht mit einem mittleren Anfangsgehalt von  $0,47 \text{ mg } \sim\text{P/g}$  Muskel wurde unmittelbar nach dem Gefrieren im Luftstrom von  $-24^{\circ}$  bis  $-25^{\circ}\text{C}$  bei einer Windgeschwindigkeit von etwa  $0,5 \text{ m/sec}$  noch im Mittel ein Gehalt von  $0,28 \text{ mg } \sim\text{P/g}$  Muskel festgestellt.

In Abb. 15 ist der Temperaturverlauf bei einem Spiegelkarpfen von  $1,4 \text{ kg}$  Gewicht und einer Regenbogenforelle von  $260 \text{ g}$  Gewicht unter den angegebenen Gefrierbedingungen für je drei Meßstellen dargestellt. Die zu-

gehörigen ATP-Anfangsgehalte und die nach einer Gefrierdauer von sechs Stunden erhaltenen ATP-Endgehalte sind aus Tabelle 4 zu ersehen.

Unter diesen ausgewählt günstigen Tötungs-, Verarbeitungs- und Gefrierbedingungen wird nach dem Gefrieren in beiden Fällen noch etwa die Hälfte des ATP-Anfangsgehaltes gefunden. In der Praxis der Hochseefischerei, d. h. beim Gefrieren auf See, sind die Fang-, Tötungs- und Behandlungsbedingungen der Fische bis zum Gefrieren wesentlich ungünstiger. Falls der ATP-Abbau im Seefischmuskel durch das Gefrieren im Temperaturbereich zwischen  $-0,8$  und  $-5^{\circ}\text{C}$  im gleichen Maße aktiviert wird wie beim Karpfen und bei der Regenbogenforelle, dürften nach dem Gefrieren nur noch geringe Mengen an ATP vorhanden sein.

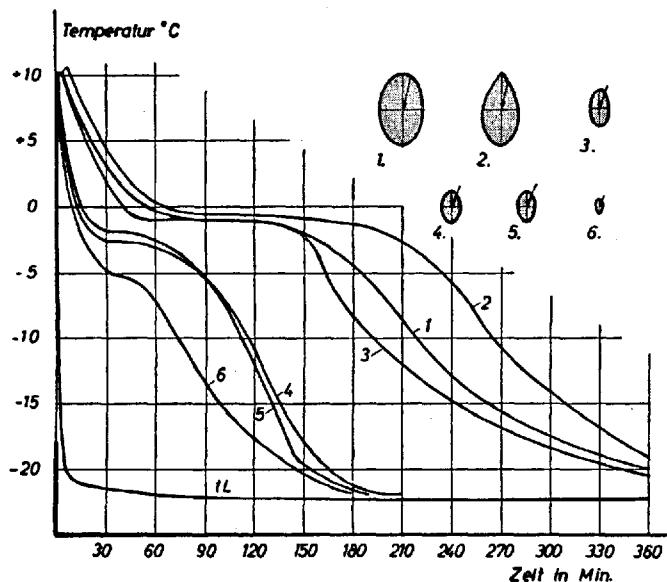


Abb. 15. Temperaturverlauf in einem Spiegelkarpfen von 1,4 kg Gewicht und in einer Regenbogenforelle von 0,26 kg Gewicht, die unmittelbar nach dem Tode bei einer Lufttemperatur  $t_L = -22^{\circ}\text{C}$  und einer mittleren Windgeschwindigkeit von  $0,5 \text{ m/sec}$  eingefroren wurden. Die Skizzen 1, 2 und 3 geben maßstabsgerecht (1:12,5) die Umrisse des zu den 3 Meßstellen am Karpfen gehörenden Querschnittes wieder. Die Skizzen 4, 5 und 6 sind die entsprechenden Querschnittsbilder für die drei Meßstellen der Regenbogenforelle. Die Pfeilspitze zeigt jeweils die Lage der Spitze des eingeführten Thermoelementen an

Bei Rotbarschfilets, welche nach Angabe der Schiffsbesatzung eine Stunde nach dem Einhieven des Netzes in Platten von 6 cm Dicke gefroren wurden (Gefrierdauer im Kontaktenschrank knapp 2 Stunden, Kerntemperatur  $-21^{\circ}\text{C}$ ), wurden nach einer Gefrierlagerung von 14 Tagen bei  $-24^{\circ}\text{C}$  nur Werte zwischen 0,04 und 0,13 mg  $\sim\text{P/g}$  Muskulatur gemessen. Das bedeutet, daß beim Auftauen industriell an Bord gefrorener Fische oder Filets mit keiner oder nur mit einer ebenso geringfügigen Taukontraktur zu rechnen sein wird, wie wir sie bereits bei Karpfen beschrieben haben (4).

Infolge der großen Labilität des energiereichen Phosphates im gefrorenen Fischmuskel bei Temperaturen bereits unterhalb des Gefrierbeginns erscheint es durchaus denkbar, es bei unmittelbar nach dem Tode eingefrorem Fischmuskelgewebe als Indikator für untragbare Temperaturschwankungen oder

Tabelle 4

ATP-Gehalte in der Seitenrumpfmuskulatur eines Spiegelkarpfens von 1,4 kg Gewicht und einer Regenbogenforelle von 0,26 kg Gewicht unmittelbar nach dem Tode sowie nach einer Gefrierdauer von 6 Stunden bei einer Windgeschwindigkeit von 0,5 m/sec (s. Abb. 15)

Fischart	Meßstelle	ATP-Gehalt in mg ~P/g Muskulatur	
		vor dem Gefrieren	nach einer Gefrierzeit von 6 Stunden
Spiegelkarpfen	1	0,35	0,14
Spiegelkarpfen	2	0,43	0,16
Spiegelkarpfen	3	0,40	0,27
Regenbogenforelle	4	0,54	0,28
Regenbogenforelle	5	0,55	0,24
Regenbogenforelle	6	0,55	0,21

einmalige Temperaturerhöhungen in Gefrierräumen verwenden zu können. Es sollte dann allerdings ein geeignetes Modellsystem entwickelt werden, das demselben oder einem ähnlichen Wirkungsprinzip gehorcht.

Es hat sich somit ergeben, daß bei Gefrierbeginn wesentliche biochemische Vorgänge im Fischmuskel beschleunigt ablaufen. Manche Beobachtungen weisen darauf hin, daß auch Folgereaktionen, wie z. B. die Desaminierung des gebildeten Adenosinmonophosphates, beträchtlich aktiviert werden. Es muß daher zweifelhaft erscheinen, daß Lagertemperaturen knapp unterhalb des Gefrierbeginns für Fisch im Vergleich zu Lagertemperaturen von ungefrorenem Fisch unmittelbar oberhalb des Gefrierbeginns günstiger beurteilt werden können. Um hier zu einem eindeutigen Ergebnis zu kommen, müßte allerdings auch die bakteriologische Seite des Problems in die Untersuchungen mit einzogen werden.

#### Zusammenfassung

Die postmortalen Veränderungen des ATP-Gehaltes und des pH-Wertes wurden im isolierten Musculus psoas und Musculus extensor digitalis communis des Rindes, im Musculus pectoralis major des Haushuhnes und im weißen dorsalen Seitenrumpfmuskel von Spiegelkarpfen (*Cyprinus carpio L.*) und Regenbogenforelle (*Salmo irideus Gibb.*) in Abhängigkeit von der Temperatur und Zeit gemessen.

Die *ATP-Anfangsgehalte*, ausgedrückt als labiler energiereicher P (~P), waren mit Werten zwischen 0,59 und 0,86 mg ~P/g Muskulatur im weißen Brustmuskel des Huhnes besonders hoch. In den roten Oberschenkelmuskeln erreichten sie nur etwa die Hälfte dieser Werte. In den Rindermuskeln und in den weißen Seitenrumpfmuskeln der Fische wurden Anfangsgehalte zwischen 0,3 und 0,55 mg ~P/g Muskulatur gemessen.

Beim *Einfrieren von Muskelstreifen* in flüssiger Luft traten keine Verluste an energiereichem Phosphat auf, dagegen war es in den Fischmuskeln nach dem Aufstauen in Luft bei + 20° C völlig gespalten; im ungefrorenen Muskelstreifen hatte der ATP-Gehalt zu diesem Zeitpunkt (1/2 Stunde nach dem Tode) bei + 10° C nur unwesentlich abgenommen. Beim Aufstauen von Rindermuskel wurde das ATP unter den angegebenen Bedingungen wesentlich langsamer gespalten als im aufgetauten Fischmuskel. Allerdings wurde es im aufgetauten Musculus psoas des Rindes etwa 5mal so schnell hydrolysiert wie im nicht gefrorenen Muskel; im Fischmuskel lag der Beschleunigungsfaktor zwischen 50 und 200.

In den weißen Seitenrumpfmuskeln von Karpfen und Regenbogenforelle verlief der ATP-Abbau bei  $-2^{\circ}\text{C}$  und  $-4^{\circ}\text{C}$  wesentlich rascher als im ungefrorenen Muskel bei  $+10^{\circ}\text{C}$ . Diese außerordentliche Aktivierung der ATP-Spaltung bei Gefrierbeginn konnte im Rinder- und Hühnermuskel nicht gefunden werden.

Die Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Temperatur läßt erkennen, daß bei allen untersuchten Muskeln der im positiven Temperaturbereich wirkende Reaktionsmechanismus für die ATP-Spaltung bei Gefrierbeginn durch einen anderen abgelöst wird. Für den Temperaturbereich zwischen  $0^{\circ}\text{C}$  und  $+20^{\circ}\text{C}$  wurden folgende  $Q_{10}$ -Werte berechnet: Karpfenmuskel 2,5, Forellenmuskel 2,6, Musculus extensor digitalis communis des Rindes 1,7, Musculus pectoralis major des Huhnes 1,4. Zwischen  $-2^{\circ}\text{C}$  und  $-4^{\circ}\text{C}$  wurden für die Muskeln  $Q_{10}$ -Werte zwischen 400 und 7000 ermittelt. Bei einer Lagertemperatur von  $-8^{\circ}\text{C}$  war die enzymatische Hydrolyse des  $\sim\text{P}$  im Forellenmuskel bereits nach 10 Tagen, im Musculus pectoralis major des Huhnes und im Karpfenmuskel nach 20 Tagen und im Rindermuskel nach etwa 25 Tagen abgeschlossen. Bei einer Lagertemperatur von  $-24^{\circ}\text{C}$  betrugen die Gehalte an energiereichem Phosphat nach einem halben Jahr im allgemeinen noch 50 bis 100% des Ausgangswertes.

Dem ATP-Abbau im Muskelgewebe geht eine Abnahme des pH-Wertes parallel.

Die Beschleunigung des ATP-Abbaues beim Auftauen wird als ein „Verletzungseffekt“ durch das Gefrieren gedeutet. Dafür spricht, daß bei Temperaturen über  $0^{\circ}\text{C}$  die ATP-Spaltung durch Zerkleinerung ebenfalls stark aktiviert wird.

Bei Karpfen (1,4 kg) und Regenbogenforelle (0,26 kg), die innerhalb einer Stunde nach dem Töten im Luftstrom gefroren wurden, betrugen die Gehalte für den  $\sim\text{P}$  nach dem Gefrieren noch etwa die Hälfte des Ausgangswertes. Bei auf Hochsee gefrorenen Rotbarschfilets wurden nur Werte zwischen 0,04 und 0,13 mg  $\sim\text{P}/\text{g}$  Muskel gemessen. Es wird geschlossen, daß bei Seefischen nur mit einer geringfügigen Taukontraktur zu rechnen ist.

Bei unmittelbar nach dem Tode eingefrorenem Fisch könnte der ATP-Gehalt u. U. als Indikator zur Kontrolle unerwünschter Temperaturanstiege benutzt werden.

#### *Summary*

The post mortem changes of the ATP-content and of the pH-value in dependence of temperature and time were measured in the isolated Musculus psoas and Musculus digitalis communis of cattle, in the Musculus pectoralis major of the hen and in the white dorsal body muscle of the mirror-carp (*Cyprinus carpio L.*) and the rainbow-trout (*Salmo irideus Gibb.*).

The initial ATP-contents expressed as labile energy-rich P ( $\sim\text{P}$ ) were especially high in the pectoralis major muscle of the hen, amounting to values between 0,59 to 0,86 mg  $\sim\text{P}/\text{g}$  muscle. In the red muscles of the upper part of the thigh only about half of the mentioned values were obtained. In beef muscle and in the white body muscles of fishes the initial ATP values were from 0,3 to 0,55 mg  $\sim\text{P}/\text{g}$  muscle tissue.

When freezing strips of muscle tissue in liquid air no losses of energy-rich phosphate were observed; on the other hand in fish muscles it was completely split after thawing in air at  $+20^{\circ}\text{C}$ ; at the same moment (half an hour after death) in unfrozen muscle strips of comparable size and at a temperature of  $+10^{\circ}\text{C}$  the ATP-content had only slightly decreased. When thawing beef-muscle under the conditions mentioned, the ATP broke down more slowly in comparison to the thawed fish-muscle. Nevertheless it was hydrolysed in the psoas muscle of beef about 5 times more quickly than in the unfrozen muscle. In fish-muscle the acceleration was about 50- to 200-fold.

In white body muscle of carp and rainbow-trout, at temperatures of  $-2^{\circ}\text{C}$  and  $-4^{\circ}\text{C}$  ATP was split distinctly more quickly than in unfrozen muscle at  $+10^{\circ}\text{C}$ . This unusual activation of the ATP-breakdown at the beginning of freezing could not be found in muscle tissue of beef and hen.

From the temperature-dependence of the reaction velocity it is evident that in all muscles the reaction mechanism for the ATP-splitting changes when freezing of the tissue

starts. For the temperature range between 0°C and 20°C the following  $Q_{10}$ -values were calculated: carp-muscle 2,5; trout-muscle 2,6; Musculus extensor digitalis communis of beef 1,7; Musculus pectoralis major of hen 1,4. Between -2°C and -4°C for all the muscles investigated  $Q_{10}$ -values ranging from 400 to 7000 were obtained. At a storage temperature of -8°C the enzymatic hydrolysis of the labile P was finished in trout muscle already after 10 days, in carp-muscle and the pectoralis major-muscle of hen after 20 days, and in beef-muscle after about 25 days. After a storage time of half a year at a storage temperature of -24°C normally 50 to 100% of the initial content of energy-rich phosphate were still present.

The ATP-breakdown in the muscle tissue corresponds to the decrease in pH-value.

The acceleration of the ATP-splitting on thawing is interpreted as an effect of the injury („Verletzungseffekt“) caused by freezing. This is in accordance with the observation that in ground muscle tissue at temperatures higher than 0°C there is a strong activation of the ATP-splitting, too.

After blast-freezing of carps (1,4 kg weight) and rainbow-trouts, (0,26 kg weight) immediately after killing, about 50% of the initial ATP-level were still present in the frozen tissue. In fillets of redfish frozen at sea only values ranging from 0,04 to 0,13 mg energy-rich P/g muscle were measured. Therefore, it is assumed that in saltwater-fish only an insignificant thawshortening is to be expected.

In fish frozen immediately after death the change in ATP-content during freezer-storage might be used as a measure for the control of unwelcome increases of temperature.

#### Résumé

Les changements après la mort de la teneur en ATP et du pH furent mesurés après isolation en dépendance de la température et du temps au musculus psoas et musculus extensor digitalis communis du boeuf, au musculus pectoralis de la poule et au blanc muscle latéral de tronc de la carpe à miroir (*Cyprinus carpio L.*) et de la truite d'arc-en-ciel (*Salmo irideus Gibb.*).

Les valeurs initiales en ATP, exprimées comme instable P (~P) riche d'énergie étaient surtout hautes aux valeurs entre 0,59 et 0,86 mg P/g musculature au blanc pectoral de la poule. Aux rouges muscles de cuisse elles n'attendaient qu'environ la moitié de ces valeurs. Aux muscles de boeufs et aux blancs muscles latéraux de tronc des poissons des teneurs initiales furent mesurées entre 0,3 et 0,55 mg ~P/g musculature.

Il n'y avait pas de pertes du phosphate riche d'énergie à la congélation des aiguillettes de muscle dans l'air liquide, mais il était complètement décomposé aux muscles de poissons après la décongélation à l'air à +20°C; à l'aiguillette de muscle non congelé la teneur en ATP ne s'était pas beaucoup affaibli à +10°C à ce moment (1/2 h après la mort). A la décongélation du muscle de boeuf l'ATP fut décomposé plus lentement sous les conditions nommées comme au muscle de poisson décongelé. Cependant il fut hydrolysé cinq fois si vite au muscle de boeuf décongelé comme au muscle non congelé; le facteur d'accélération comparable du muscle de poisson se trouva entre 50 et 200.

Aux blancs muscles latéraux de tronc de la carpe et truite d'arc-en-ciel la décomposition d'ATP se passa à -2°C et -4°C considérablement plus vite qu'au muscle non congelé à +10°C. Cette activation extraordinaire de la dissociation d'ATP au commencement de congélation ne pouvait pas être trouvée au muscle de boeuf et de poule.

L'exposition des vitesses de réaction en dépendance de la température permet de connaître que le mécanisme de réaction agissant pour la dissociation d'ATP à la positive zône de température à tous les muscles étudiés au commencement de congélation prend la place d'un autre. Les valeurs suivantes de  $Q_{10}$  furent calculées pour la zône de température entre 0 et 20°C: muscle de carpe 2,5; muscle de truite 2,6; musculus extensor digitalis communis du boeuf 1,7; musculus pectoralis major de la poule 1,4. Entre -2° et -4°C nous avons trouvé des valeurs de  $Q_{10}$  entre 400 et 7000. A une température de stockage de -8°C l'hydrolyse enzymatique du ~P était déjà fini au muscle de carpe après 10 jours au muscle pectoralis major de la poule et au muscle de carpe après 20 jours et au muscle de

boeuf après environ 25 jours. A une température de stockage de —24°C des valeurs du phosphate riche d'énergie étaient encore en général 50 à 100% de la valeur de sortie.

Une diminution du pH est parallèle à la décomposition d'ATP au tissue musculaire.

L'accélération de la décomposition d'ATP pendant la décongélation est expliquée comme un effet de lésions („Verletzungseffekt“) par la congélation. C'est probable que la dissociation d'ATP est aussi fortement activée par le broyage aux températures plus de 0°C.

Les teneurs en ~ P montaient à la carpe (1,4 kg) et à la truite d'arc-en-ciel (0,26 kg), congelée à une heure après la mortification au courant d'air, après la congélation encore à peu près la moitié de la valeur de sortie. Les valeurs ne furent que mesurées entre 0,04 et 0,13 mg P/g musculature aux filets d'eglefin de Norvège congelés en pleine mer. On peut conclure qu'il n'y a qu'un point de contracture insignifiant à la décongélation des poissons de mer.

La teneur d'ATP du poisson, congelé immédiatement après la mort, pouvait être utilisée le cas échéant comme indicateur pour le contrôle des élévations de température indésirables.

#### *Schrifttum*

1. BENDALL, J. R. und MARSH, B. B., Proc. 8th Intern. Congr. Refrig. London 351 (London 1951). — 2. SHARP, J. G. und MARSH, B. B., Whalemeat: Production and preservation. DSIR Food Invest. Spec. Rep. No. 58, 47 S. (London 1953); TANAKA, T. und TANAKA, K., Contribution to 9th Intern. Congr. Refrig (Paris 1955). — 3. BENDALL, J. R., Contribution to the meeting of the Intern. Inst. Refrig (Madrid 1954); SZENT-GYÖRGYI, A. G., Enzymologia **14**, 252—253 (1950); SZENTKIRÁLYI, E. M., Arch. Biochem. Biophys. **67**, 298 (1957); BRITO, M. und AMANO, K., Vortr. geh. auf d. Intern. Kältekongreß (Kopenhagen 1959). — 4. PARTMANN, W., Arch. Fischereiwiss. **11**, 81—105 (1960). — 5. BÁRÁNY, M. und JAISLE, F., Biochim. Biophys. Acta **41**, 192—203 (1960). — 6. LAWRIE, R. A., Nature **170**, 122 (1952). — 7. PARTMANN, W., Arch. Fischereiwiss. **5**, 159—170 (1954). — 8. NEMITZ, G. und PARTMANN, W., Z. Lebensmittel-Unters. Forschg. **109**, 121—129 (1959). — 9. BENDALL, J. R., J. Physiol. **114**, 71—88 (1951). — 10. MARSH, B. B., J. Sci. Food Agric. **5**, 70—75 (1954). — 11. NAGAI, T., MAKINOSE, M. und HASSELBACH, W., Biochim. Biophys. Acta **43**, 223—238 (1960). — 12. HAMOIR, G., Arch. Intern. Physiol. **63**, H. 4, Suppl., 1—152 (1955). — 13. MARSH, B. B. und THOMPSON, J. F., J. Sci. Food Agric. **9**, 417 (1958). — 14. HOWARD, A. und LAWRIE, R. A., Div. of. Food Preserv. and Transport. Austral. Technic. Paper No. 2, 72 S. (1956). — 15. MUELLER, H., Biochim. Biophys. Acta **39**, 93—103 (1960). — 16. LOVELOCK, J. E., Proc. Roy. Soc. London B **147**, 427—433 (1957). — 17. NORD, F. F., Naturwiss. **24**, 481—486 (1936).

#### Anschrift des Verfassers:

Dr. W. PARTMANN, Bundesforschungsanstalt für Lebensmittelfrischhaltung, Karlsruhe, Kaiserstraße 12