

Verhalten von Sarkoplasma beim Erhitzen.von F.A.Lee¹⁾ und R.Grau²⁾

(vorgetragen von R. Grau)

Die Einwirkung von Wärme auf Fleisch ist ein wichtiges technologisches Problem, einmal von der wirtschaftlichen Seite her gesehen, nämlich ~~der~~ in bezug auf die auftretenden, hauptsächlich durch Wasserverlust bedingten Gewichtsverluste, zum andern ernährungsmäßig betrachtet z.B. im Hinblick auf die Bildung neuer Aromastoffe und das Auftreten von zarten, saftigen Fleischgerichten durch Gelatinierung der Bindegewebe.

Die hauptsächlichsten, beim Erhitzen auftretenden inneren Veränderungen spielen sich im Eiweiß ab. Hierüber gibt es viele eingehende Untersuchungen, von denen die von Drosdow, Anson, Stauff, Deatherage, Wierbicki, Hamm u.a. genannt werden mögen. Sie alle befaßten sich mit dem Muskelfleisch als ganzem Muskel. Fleisch aber ist ein sehr komplex aufgebautes Eiweiß; es besteht neben unlöslichen, bindegewebsartigen Eiweißstoffen aus wasser- bzw. salzlöslichen Proteinen und den erst bei höheren Ionenstärken löslichen strukturellen Proteinen.

Untersuchungen über Einzeleiweiße oder Gruppen von Eiweißstoffen sind indessen bisher weniger ausgeführt worden.

Es lag nahe, den Einfluß der Temperatur auf das Verhalten der einzelnen Eiweißstoffe des Muskels näher zu studieren: Die Verwendung der Elektrophorese, insbesondere die der Gelelektrophorese erwies sich hierbei als sehr förderlich. Wir fanden in der von O. Smithies angegebenen Methode der Stärkegel-Elektrophorese ein ausgezeichnetes Mittel. Während unserer Arbeit erschien von B.G.Giles eine Veröffentlichung über die elektrophoretische Trennung der Eiweißstoffe des Sarkoplasmas verschiedener Tierarten auf Streifen aus Stärkegel.

Wir haben ausschließlich mit Rindfleisch gearbeitet und benutzten den Rückenmuskel, m. longissimus dorsi. Das Fleisch wurde dem bei 0°C 1 Woche nach dem Schlachten gelagertem Tierkörper entnommen und in Würfel von 2,5 cm Kantenlänge geschnitten. Die Kontrollproben wurden bei 4°C gehalten, während die anderen Proben auf Temperaturen von 30°, 40°, 50°, 60°, 63°, 66° und 70° erhitzt wurden. Die Temperaturablesung erfolgte mittels eines Thermoelements, dessen Lötstelle sich in der Mitte des Fleischwürfels befand.

¹⁾ Gegenwärtige Anschrift: Prof. Dr. A. Lee, Cornell University, New York State Agricultural Exp. Stat. Geneva, N.Y. (USA).

²⁾ Gegenwärtige Anschrift: Prof. Dr. R. Grau, Kelkheim/Ts., Gimbacher Tann 9 Westdeutschland.

Nach Erreichung der gewünschten Temperatur wurde das Erhitzen 30 min lang fortgesetzt. Während des ganzen Erhitzungsvorganges befand sich das Fleisch in einem geschlossenen Glasbecher. Mit Ausnahme der Erhitzung betrug die Temperatur bei allen anderen Arbeitsvorgängen 4°C . Anschließend wurde aus dem erwärmten Fleisch mit Hilfe einer hydraulischen Presse Fleischsaft ausgepreßt und dieser über Nacht gegen Boratpuffer (pH 8,99) dialysiert. Der so vorbereitete Fleischsaft wurde der Stärkegel-Elektrophorese^{x)} nach Smithies (24 Std, 220 V, 0,5 mA) unterworfen; die Gelstreifen waren 20cm lang, 2 cm breit und 0,5 cm dick. Die Probe wurde mit Stärke^{x)} vermischt und in den 6 cm vom Ende des Gelstreifens eingekerbten Trog eingefüllt. Die entstehenden Eiweißbanden wurden durch Anfärben mit Amidoschwarz sichtbar gemacht.

Bei einer anderen Untersuchungsart wurde aus dem Muskelstück zunächst durch hydraulische Pressen der Fleischsaft, das Sarkoplasma, hergestellt und dieser allein, also nicht im Muskelverband, den angegebenen Temperaturen unterworfen und anschließend elektrophoretisch untersucht.

Beide Ergebnisse sind voneinander unterschiedlich. Hieraus kann geschlossen werden, daß das Verhalten der Eiweißstoffe des Sarkoplasmas von den strukturierten Eiweißstoffen der Muskelfibrille beim Erwärmen beeinflusst wird. Die nachstehend mitgeteilten Ergebnisse sind jedoch stets mit dem aus den erhitzten Fleischstücken ausgepreßten und dialysierten Sarkoplasma erhalten worden.

Aus einer früheren Untersuchung haben Grau und Lee angegeben, daß mit Erreichung von 70°C alle Eiweißstoffe des Sarkoplasmas ausgefällt waren; die Elektrophorese zeigte keine Eiweißbande mehr. Wie auch Giles bekannt gab, wandert ein beachtlicher Teil des Eiweißes zur Kathode; hierbei handelt es sich, fußend auf der Arbeit von Kronman u. Mitarb. um die Enzyme der Glykolyse, wie Aldolase, Phosphofruktokinase, Myokinase und, wie wahrscheinlich gemacht wurde, auch um wenig Myosin. Ob es sich hierbei um einen, während der Erhitzung entstandenen löslich gewordenen Anteil von Myosin handelt, wie es R.H.Locker beschreibt, wurde nicht näher nachgeprüft. Der restliche Eiweißanteil des Sarkoplasmas wandert zur Anode; von den insgesamt 8 Banden liegen 5 auf der anodischen Seite. Hierunter befindet sich auch der Muskel-farbstoff Myoglobin. Bei verschiedenen Proben von Sarkoplasma treten mitunter 2 gefärbte Banden auf der Anodenseite des Elektropherogrammes auf. Ob es sich hier, wie anfangs vermutet wurde, um Cytochrom handelt, oder ob die

^{x)} Die verwendete Spezial-Kartoffelstärke wurde von den Connaught Medical Research Laboratories of the University of Toronto (Canada) erhalten.

Bande von einem Rest Hämoglobin herrührt, wurde nicht geklärt. Giles, 1965, beobachtete gleichfalls 2 gefärbte Banden auf der Anodenseite. Durch Sephadex-Gelfiltration fand er, daß es sich bei dem stark gefärbten Band um Myoglobin (Oxymyoglobin) handle, während das schwächer gefärbte Band von einer Untereinheit des im Saft verbliebenen Restes von Hämoglobin herrühren müsse.

Ein Vergleich der Pherogramme von auf verschiedene Temperaturen erhitztem Sarkoplasma zeigt, daß die auf beiden Seiten am schnellsten wandernden Eiweißstoffe bei der Temperaturerhöhung auch am ehesten denaturiert werden, ferner hat es den Anschein, als ob die zur Kathode wandernden Eiweißbanden gegen Hitzeeinwirkung beständiger seien.

Die schon von Giles bemerkte Verschiedenheit der Elektropherogramme von Tier zu Tier konnte auch von uns festgestellt werden.

Auch die durch Erhitzen erfolgte Veränderung der Eiweißbanden ist abhängig vom Einzeltier.

Bemerkenswert waren die Ergebnisse der Untersuchungen, in welchen 2 verschiedene Trennverfahren miteinander verknüpft wurden. Durch Auspressen von Muskelfleisch (m. long.dorsi) und Zentrifugieren des so gewonnenen Fleischsaftes wurde ^{dieser} nach der klassischen Methode der Ammonsulfatfällung in 6 verschiedene Fraktionen aufgeteilt, die nach Reinigung naß gewogen, wieder aufgelöst und als Einzelfraktion der Elektrophorese auf Stärkegel unterworfen wurden; und zwar bei den Temperaturen 4, 30, 40, 50, 60, 63 und 66°C. Im einzelnen wurde so verfahren, daß 200 ml abgepreßter Fleischsaft mit 200 ml Phosphatpufferlösung (0,15m $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; wenn nötig, auch stärker) gemischt wurden. Diese Lösung wurde der Ammoniumsulfatfraktionierung unterworfen. Es wurden 6 verschiedene Konzentrationen verwendet, nämlich 14,2%, 16,7%, 20,9%, 33,4% und 41,7%, unter Verwendung eines Cellephansackes und 48stündiger Rotation. Danach wurde der entstandene Niederschlag durch Zentrifugieren (8000 g) abgetrennt. Die überstehende Lösung wurde mit soviel $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ behandelt, daß dessen Konzentration auf die nächsthöhere Stufe gehoben wurde. Der pH-Wert wurde auf 6,6 mittels Zugabe geringer Mengen gesättigter $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -Lösung eingestellt. Auf diese Weise war es möglich, die Zufuhr unnötig großer Wassermengen zu vermeiden.

Der Niederschlag der ersten Ammoniumsulfatfällung wurde 3mal mit der verwendeten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration in Sørensen-Puffer (pH 6,6) gewaschen und jeweils von der Waschlösung durch Zentrifugieren getrennt, der Überstand wurde jedes Mal verworfen. Dann wurde das Präzipitat in Sørensen-Puffer (pH 6,6) gelöst und mit soviel $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt, bis die vorgesehene Konzentration sich eingestellt hat. Die Mischung wurde über Nacht stehen gelassen. Danach wurde der Niederschlag bei 8000 g 20 min lang zentrifugiert. Der ge-

Das Verhalten von Sarkoplasma beim Erhitzen
 sante Vorgang wurde wiederholt. Schließlich wurde das Gewicht des zentrifugierten Präzipitats festgestellt. Der gewogene Niederschlag wurde in Boratpufferlösung suspendiert, mit Stärke gemischt und wie vorher beschrieben der Stärkegel-Elektrophorese unterworfen.

Die bereits früher (Grau und Lee) mitgeteilten Ergebnisse lassen ein recht gutes Bild der Hitzeveränderungen der Sarkoplasma-Eiweißstoffe erkennen.

Bereits bei 30°C treten ungünstige Beeinflussungen auf, die mit Erhöhung der Temperatur stärker werden. Ab 50°C wird der größte Teil der Sarkoplasmaeiweiße niedergeschlagen, doch selbst bei 66°C ist noch nicht alles Eiweiß denaturiert. Ferner zeigten die Versuche, daß die mit ansteigender Konzentration an Ammoniumsulfat fällbaren Eiweißfraktionen ständig hitzestabiler werden. Selbst der nach der Behandlung mit gesättigter (NH₄)₂SO₄-Lösung verbleibende "Überstand" ist nicht frei von Eiweiß. Die Gelelektrophorese zeigt ein Einzelband, dessen Wanderungsgeschwindigkeit von 50°C an ständig ansteigt, ein Zeichen für den weiteren Zerfall dieses Eiweißkörpers.

Ähnliche Erscheinungen fanden Fujimaka u. Deatherage; nach ihren Versuchen beruht das Altern des Fleisches möglicherweise auf einer Denaturierung des Sarkoplasmas; bei der Elektrophorese solcher Plasmaeiweißstoffe beobachteten sie eine Verringerung der Bandenzahl.

Weiterhin sollen noch die Ergebnisse der Messung der Absorptionsspektren der einzelnen (NH₄)₂SO₄-Fällungsfraktionen mitgeteilt werden. Aus der graphischen Auftragung der Abb.1 ist zu erkennen, daß das durch Tyrosin und Tryptophan hervorgerufene Absorptionsmaximum bei 280 nm mit Erhöhung der Temperatur bei einigen Fraktionen flach wird und fast verschwindet. Es hat somit den Anschein, als ob auch eine echte Schädigung der Eiweißinnenstruktur aufgetreten ist.

Abschließend sind einige Vorversuche mit Sephadex unternommen worden, die zu einer recht brauchbaren Trennung der Eiweißkörper geführt ^{haben} ~~hat~~. Die Arbeiten hierüber wurden jedoch nicht fortgesetzt. Unsere damaligen Ergebnisse stimmen im übrigen recht gut mit Ergebnissen von Giles überein, die er 1965 bekannt gab (siehe Abb.2). (Es wurde versucht, die verschiedenen Maßstäbe der beiden Messungen in Einklang zu bringen).

Das Verhalten von Rindersarkoplasma beim Erhitzen

von F.A.Lee und R. Grau

Zusammenfassung

1. Die auf die Eiweißstoffe des Sarkoplasmas des Rindermuskels Longissimus dorsi angewandte Stärkegel-Elektrophorese nach Smithies ergab, daß der aus erhitztem Fleisch ausgepreßte Fleischsaft sich etwas anders verhält als ein aus rohem Fleisch hergestellter und dann erhitzter Fleischsaft. Die Eiweißstoffe der Muskelfibrille erscheinen mithin von Einfluß auf das Verhalten der Sarkoplasma-Eiweißstoffe beim Erhitzen zu sein.
2. Die Eiweißstoffe lassen sich unter den verwendeten Versuchsbedingungen elektrophoretisch in 8 Banden zerlegen, 3 davon wandern zur Kathode, 3 zur Anode.
3. Die am schnellsten wandernden Eiweißstoffe sind am empfindlichsten gegen Hitzeeinwirkung.
4. Die zur Kathode wandernden Eiweißstoffe sind thermostabiler als die anodisch wandernden.
5. Die Erhitzung der mittels verschiedener Ammoniumsulfat-Konzentrationen aufgetrennten Eiweißkörper des Sarkoplasmas auf verschiedene Temperaturen und die anschließende Stärkegelelektrophorese der Einzelfractionen zeigt, daß die ungünstige Temperatureinflussung bereits mit 30°C deutlich wird; bei 50°C und darüber tritt der stärkste Temperatureinfluß auf, und über 66°C ist noch nicht alles Eiweiß denaturiert.
6. Ein auch mit gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung nicht mehr fällbarer Eiweißanteil läßt sich elektrophoretisch noch feststellen. Oberhalb 50°C zerfällt dieser Anteil in mehrere Eiweißbruchstücke, die eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit aufweisen.
7. Das UV-Spektrum der Lösungen der verschiedenen Fractionen der Ammonsulfat-fällung zeigt deutliche Temperatureinflüsse; das durch Tyrosin und Tryptophan bedingte Maximum bei 280 nm wird bei einigen F_r-aktionen flach und verschwindet fast, was auf eine Schädigung der Eiweißstruktur schließen läßt.
8. Die Elektropherogramme des Sarkoplasmas vom Rind zeigen von Tier zu Tier qualitative Unterschiede, das gilt sowohl für nichtdenaturiertes als auch für hitzeverändertes Sarkoplasma.
9. An Sephadexsäulen läßt sich Rindersarkoplasma in einzelne Fractionen trennen, deren Anzahl und Maxima sich mit Anstieg der Temperatur ändern.

On the influence of temperature on the behavior of soluble proteins of beef

by F.A.Lee and R.Grau

Summary

1. Starch gel electrophoresis according to Smithies of the proteins of sarcoplasma of beef muscle *M. longissimus dorsi* showed a small but clear difference between the juice pressed out of cooked meat and the cooked juice of raw meat. There seems to be an influence of the proteins of the myofibrils on the behavior of the sarcoplasma proteins.
2. The applied method gives 8 bands of proteins from which 3 migrate to the cathode and 5 to the anode.
3. The proteins migrating the most quickly are also the proteins the most affected against arising temperature.
4. The cathodic proteins are more thermostabil than the anodic ones.
5. The proteins of beef sarcoplasma fractionated by means of several concentrations of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -solutions and than heated on several temperatures show by starch electrophoresis, that the influence of temperature is already seen at 30°C . The higher the temperature, the more is heat denaturation; it is the highest at 50°C and more, but is not finished at 66°C and somewhat more.
6. There will be a part of protein which is not precipitated by saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -solutions. At more than 50°C this protein will be broken up to proteins of smaller size and minor molecular weight, having a higher velocity in the starch gel electrophoresis.
7. The UV-spectra of solutions of the different protein fractions of the $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -precipitation shows the influence of temperature. The maxima of tyrosine and tryptophane at 280 nm become flatter and almost disappear, it may be concluded that there is an damage of the proteinstructure.
8. The electropherograms of the beef sarcoplasma have differences from animal to animal and is valid as well for the native as the heat denaturated sarcoplasma.
9. The fractionation on sephadex columns shows the influence of higher temperature in numbers, sizes, and maxima of peaks in the single fractions.

Literature

- Anson, M.L.: Advances in Protein Chemistry 2, 361 (1945)
- Drosdow, N.S.: Biochem. J. (ukrain.) XII, 2.S. 435-441 (1938)
- Fujimaka, M. u. F.E.Deatherage: J.Food Sci. 29, 316-326 (1964).
- Giles, B.G.: J. Sci.Food Agric. 13, 264-268 (1962); XI.Kongr.europ.Fleischforscher, Belgrad, 1965.
- Grau, R. u. F.A.Lee: Naturwiss. 50, 379 (1963)
- Hamm, R. u. F.E.Deatherage: Food Res. 25, 587-610 (1960). (hier auch reiche Literaturangabe).
- Hamm, R. u. H. Iwata: Z. Lebensmittel-Unters. u. Forsch. 117, 20-23 (1962)
- Hamm, R.: Z.Lebensmittel-Unters.u.Forsch.117 (1962)
- Kronman, M.J., L.E.Weinberger u. R.J.Winterbottom: Arch.Biochem.Biophysics 86, 238-250 (1960).
- Locker, R.H.: Biochim.Biophys.Acta 20, 514 (1956).
- Smithies, O.: Biochem.J. 61, 629 (1955); 71, 585 (1959).
- Stauff, J., H.Barthel, R.Jaenicke, R.Krekel u. E.Ühlein: Kolloid-Z. 178, 128-142 (1961)
- Strobl, A.: Inaug. Diss. München 1957.
- Wierbicki, E., L.E.Kunkle u. F.E.Deatherage: Food Technol. 11, Heft 2, s.69-72 (1957).

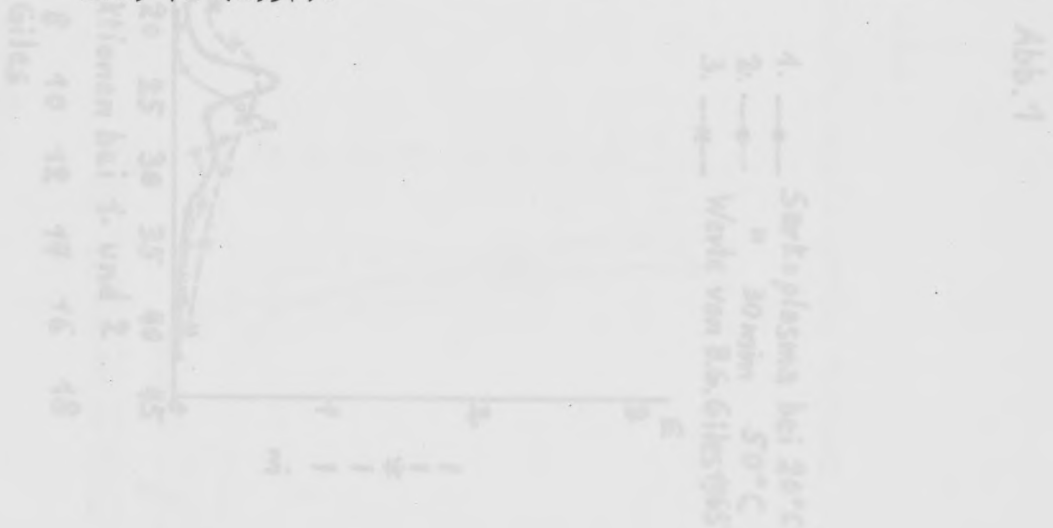


Abb. 1

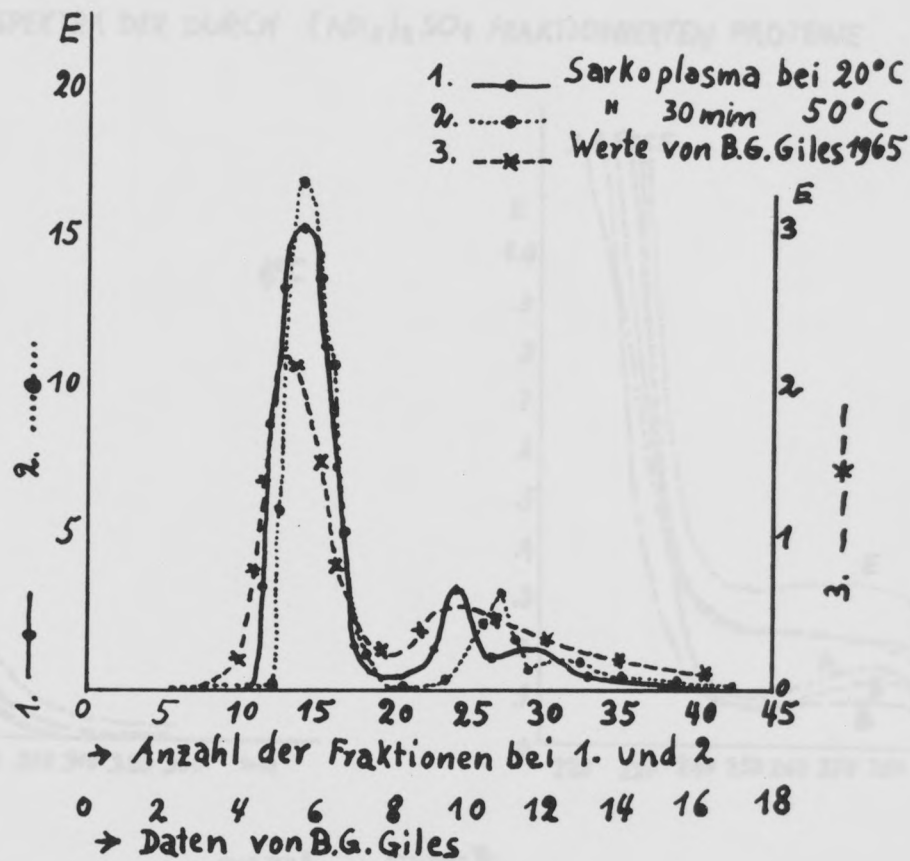
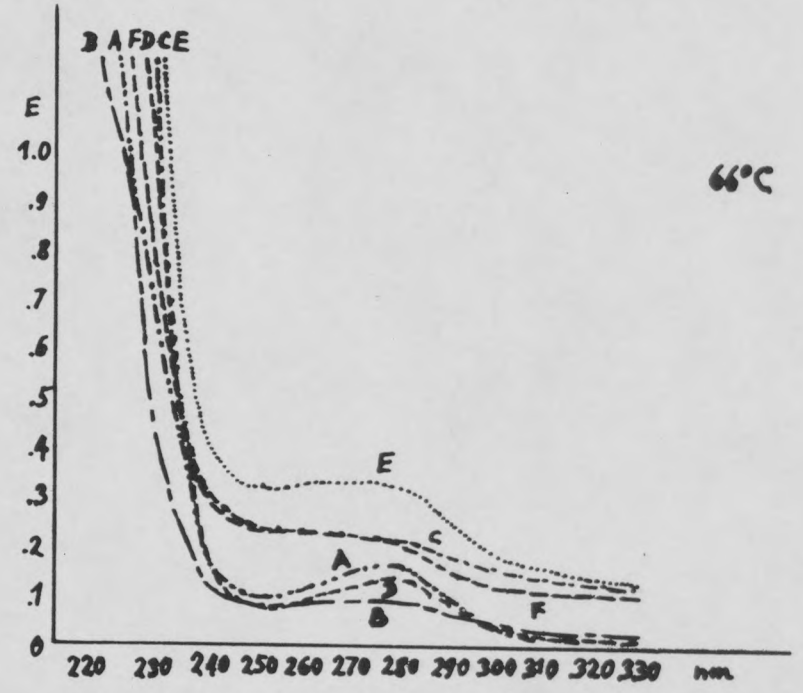
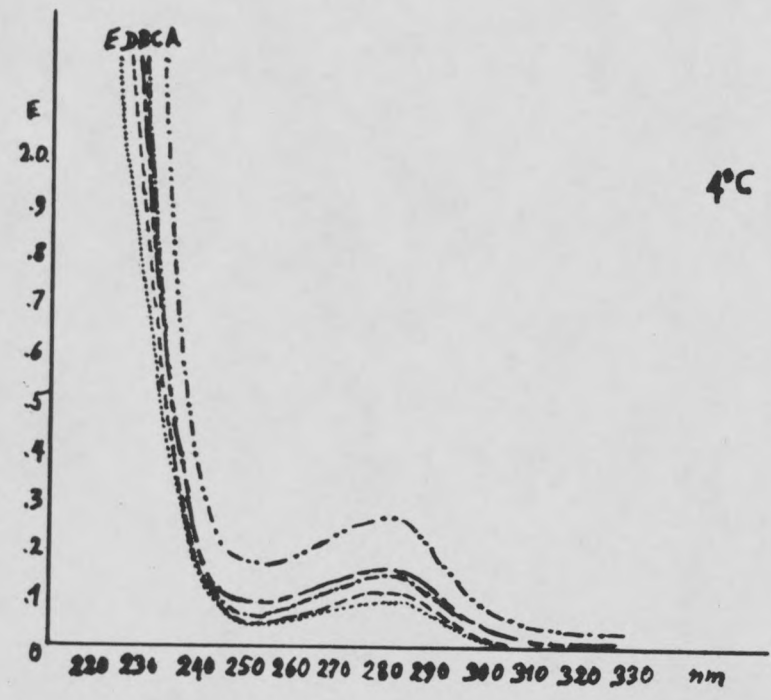


Abb. 2

ABSORPTIONSSPEKTRA DER DURCH $(NH_4)_2SO_4$ FRAKTIONIERTEN PROTEINE



- A
- B
- C
- D
- E
- F

g