

Veränderungen einiger Proteinfractionen im Rindermuskel post mortem

H. GÜNTHER

Bundesanstalt für Fleischforschung, Institut für Chemie und Physik, Kulmbach und Institut für Physiologische Chemie der Universität Würzburg
Bundesrepublik Deutschland

DAS PROBLEM

Über die post mortem Veränderungen von Proteinen im Rindermuskel sind in der Literatur widersprechende Angaben zu finden (1 2). Sicher scheint jedenfalls der Abbau von Myosin sowohl in freier Form als auch in Actomyosin zu sein (1 3). Während der Lagerung nimmt ferner der Anteil an leichtlöslichem Kollagen zu (4 5). Da ein Kenntnis der post mortalen Proteinveränderungen für die Verarbeitungseigenschaften des Fleisches wichtig ist, wurden einige dieser Veränderungen näher untersucht.

DIE ANGEWANDTEN METHODEN

Der M. semi tendineus von Rind (Jungbulle) wurde auf dem Schlachthof ca 20–30 Min. nach dem Schlachten entnommen, und in einem Glasgefäß mit einem Körnchen Thymol bei $+2$ – $+4^{\circ}$ C im Kühlraum gelagert. Die bakteriologischen Untersuchungen (Dr. K. Coretti, Kulmbach) wurden von Ablatschpräparaten von der Oberfläche und aus 1 cm Tiefe an drei verschiedenen Stellen des Muskels vorgenommen. Zur Untersuchung wurden 5–8 g Muskel (frisch, 5 und 7 Tage alt) durch eine Gewebspresse (Tissue press, Harvard App. Comp. Dover, Mass. USA) bei einer Lochgröße von 1,0–1,5 mm gegeben, 2 x mit einem Puffer (0,5 M KCl, 0,001 M Tris und 0,01 M Pyrophosphat) von pH = 7,0 je 10 Min. im Verhältnis 3:1 extrahiert und 10 Min. bei 20 000 g zentrifugiert. Der das Myosin enthaltende Überstand wurde bei 100 000 g ultrazentrifugiert. Eine 0,5 g Muskel entsprechende Menge des Überstandes wurde auf eine Sephadex-Säule G 200 (100 x 2,5 cm) gegeben und mit dem oben genannten Puffer (ohne Pyrophosphat) bei einer Durchflussrate von 12–15 ml/h gefiltert. Der Rückstand wurde mit Weber-Edsall Lösung versetzt und 24 Std. lang unter Rühren bei $+2$ – $+4^{\circ}$ C stehen gelassen. Das in Lösung gegangene Actomyosin wurde bei 100 000 g 60 min. ultrazentrifugiert und anschliessend ebenfalls gefiltert. Die Bestimmungen des Proteingehaltes erfolgte bei den einzelnen Fraktionen

der Säulen durch Messung der Absorption bei 280 nm und mit der Folin-Reaktion (6). Das Actinbindungsvermögen liess sich durch Zugabe von Kaninchenactin (7) und durch Zugabe von ATP unter Beobachtung der Viskositätsveränderung prüfen (8). Auf die gleiche Weise wurde eine Beimengung von Actin zum Myosin ausgeschlossen. Peptidkarten wurden auf Dünnschichtplatten von Cellulosapulver MN 300 HR (Machery und Nagel, Düren 516 Deutschland) entwickelt, in der 1. Richtung mit der Hochspannungselektrophorese in Pyridin-Acetat Puffer bei 70 V/cm (pH = 6,5), in der 2. Richtung durch Chromatographie im System Butanol: Pyridin-Eisessig-Wasser 30: 20: 6: 24 (9). Das Kontraktionsvermögen von Actomyosin mit ATP wurde nach Turba (10) geprüft. Die ATP-ase Bestimmung wurde nach Kielley und Bradley (11) durchgeführt, der Gehalt an SH-Gruppen nach Benesch (12) amperometrisch bestimmt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Gelfiltration der »Myosinfraktion« zeigt 3 Hauptgipfel: Myosin, Hämaproteine und niedermolekulare Substanzen wie u.a. Nucleotide, Kohlenhydrate und Aminosäuren. 5 Tage post mortem ist die Menge der Myosinfraktion um 25 % vermindert, am 7. Tage post mortem ist sie völlig verschwunden, gleichzeitig sind andere Proteine aufgetreten, die nach der Lage im Elutionsprofil ein niederes Molekulargewicht aufweisen. Sowohl als auch das Hauptspaltstück wurden mit verschiedenen Methoden näher charakterisiert. Myosin war frei von Actin. Die »Fingerprints« der beiden Proteine wiesen deutliche Verwandtschaft auf. Beim Spaltstück fehlten einige saure Peptide, einige basische treten neu auf. Insgesamt ging die Zahl der Peptide von 75 (73) auf 63 (61) zurück. Das Spaltstück enthält noch einen Teil der ATP-ase Aktivität vom Myosin wie auch einen verminderten Gehalt an SH-Gruppen. Es reagierte auch, obwohl schwächer, als Myosin, mit Actin. Der letzte Gipfel der Gelfiltration der Myosin enthaltenden Fraktion enthält u.a. auch die Nucleotide, unter denen die Inosinsäure als Geschmacksstoff bekannt ist. Das Verhältnis der 280/260 nm Absorption steigt von anfangs 0,22 in frischem Muskel auf 0,4 im 7 Tage alten Muskel als Zeichen für das Auftreten von Pyrimidinderivaten an. Die Menge nimmt ebenfalls zu. Einen Anstieg von freien Zuckern während der Reifung hatten Grau und Günther im Kalbfleisch schon früher festgestellt (13). Die Gelfiltration von Actomyosin zeigte gemessen an der Absorption bei 280 nm neben geringen niedermolekularen Anteilen keine wesentlichen Änderungen. Das Ausbleiben der Kontraktion des Gels nach Zugabe von ATP 7 Tage post mortem im Gegensatz zu der Reaktion bei den Proben von frischen und 5 Tage alten Muskel weist allerdings auf eine Veränderung im Molekül hin.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die mitgeteilten Ergebnisse erklären teilweise die Abnahme der Bindung in den ersten Tagen der Fleischreifung und die Zunahme der für die Ausbildung des Fleischaromas wichtigen Substanzen bzw. deren Vorläufer. Der endgültige Beweis über die Herkunft des Hauptspaltstücks kann erst nach einer mengenmässigen der anderen Proteine im Muskel erbracht werden.

DANK

Herrn Prof. Dr. Fritz Turba (gestorben am 25. 8. 1965) sei für seine freundliche Unterstützung der Arbeit herzlich gedankt.

LITERATUR

1. W. Solovyew, O. Tschegolewa und S. Agapowa, *Biokhimia* 29, 393 (1964).
2. R. Locker, *J. Sci. Food Agric.* 11, 520 (1960) zitiert nach CA 55, 836 f (1961).
3. M. Fujimaki, A. Okitani und N. Arakawa, *J. Agric. Biol. Chem.* 29, 581 (1965).
4. P. Mc. Clain, A. Mullins, S. Hansard, J. Fox und R. Boulware, *Proc. Soc. Exp. Biology and Medicine* 119, 492 (1965).
5. J. Cross, *J. of. Exper. Medicine* 107, 247 (1957).
6. O. Lowry, J. Rosebrough, A. Farr und R. Randall, *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1961).
7. W. Mommaerts, *J. Biol. Chem.* 198, 445 (1952).
8. G. Kuschinski und F. Turba, *Biochim. et Biophys. Acta* 6, 426 (1954).
9. F. Turba und H. Hilpert, *Biochem. Z.* 334, 507 (1961).
10. G. Kuschinski und F. Turba, *Biochem. Z.* 321, 139 (1961).
11. W. Kielley und L. Bradley, *J. Biol. Chem.* 218, 653 (1956).
12. R. Benesch und E. Benesch, *Arch. of Biochem. et Biophys.* 28, 43 (1950).
13. R. Grau und H. Günther, *Fleischwirtschaft* 12, 728 (1962).