

Diphosphate and autolysis of ATP.

1. Einleitung

Van Hoof, J. & Hamm, R.

Das hohe Wasserbindungsvermögen, welches Rindfleisch unmittelbar nach dem Schlachten des Tieres besitzt, kann durch Salzen des schlachtwarmen Fleisches über mehrere Tage erhalten werden. Von dieser günstigen Wirkung des "schlachtwarmen Vorsalzens" macht man in der Praxis der Brühwurstherstellung gerne Gebrauch. Entscheidend für den Effekt des Vorsalzens ist es, daß noch genügende Mengen an Adenosintriphosphat (ATP)\* vorhanden sind, wenn das zugesetzte NaCl das zerkleinerte Gewebe durchdringt. Das hohe Wasserbindungsvermögen des schlachtwarm gesalzenen Fleisches bleibt nicht etwa deswegen erhalten, weil NaCl den ATP-Abbau hemmt. Wir konnten zeigen, daß NaCl im Gegenteil die ATP-Hydrolyse post mortem beschleunigt (1), daß das Salz also die ATPase-Aktivität des Gewebes erhöht.

Es erhebt sich nun die Frage, ob der Abbau von ATP und Glykogen post mortem durch den gleichzeitigen Zusatz von Diphosphat und Kochsalz zum zerkleinerten schlachtwarmen Rindfleisch gehemmt werden kann. Eine solche Wirkung wäre aus verschiedenen Gründen zu erwarten. Einmal wurde bei gelöstem Actomyosin eine kompetitive Hemmung des ATP-Abbaues durch Diphosphat (PP) erreicht (2, 3). Zum anderen könnte eine Komplexbildung der die myofibrilläre ATPase aktivierenden Erdalkali-Ionen mit PP eine Verringerung der ATPase-Aktivität bewirken.

2. Material und Methoden

Als Untersuchungsmaterial diente der Longissimus dorsi-Muskel von drei Kühen, der nach Abtrennung von grobem Fett- und Bindegewebe im Fleischwolf (4,5 mm-Scheibe) so rasch als möglich nach dem Schlachten zerkleinert wurde. Durch sofortigen Zusatz von 10 % Wasser, in welchem NaCl bzw. NaCl und Diphosphat gelöst waren, wurden Proben mit a) 2 % NaCl, b) 2 % NaCl + 0,3 % PP, c) 2 % NaCl + 0,5 % PP und d) 2 % NaCl + 1 % PP hergestellt. Die Proben wurden bei +4°C aufbewahrt. Das verwendete Diphosphat war ein verhältnismäßig reines Handelspräparat der Zusammensetzung Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; die 1%ige wäßrige Lösung wies einen pH-Wert von 6,9 auf.

Sofort nach der Herstellung der Proben (innerhalb 1 Std.p.m.) wurden je 20 g in Folie verpackt, bei -80°C eingefroren und bis zur Analyse bei -30°C gelagert. Die Bestimmung von ATP, ADP, AMP, IMP, Inosin, Hypoxanthin, Glykogen, Hexosemonophosphat und Lactat erfolgte mittels der von HAMM und VAN HOOF (4) angegebenen Methoden.

3. Ergebnisse

Die mit den drei verschiedenen Muskeln erhaltenen Ergebnisse entsprachen einander so weitgehend, daß es genügt, hier nur die Resultate eines Versuchs anzuführen.

Die Anfangsglykogengehalte im unzerkleinerten M. longissimus dorsi lagen bei den drei untersuchten Tieren 1 Std.p.m. zwischen 7,0 und 8,4 mg/g (ausgedrückt in Glucose-Einheiten: 43 - 52 µMol Glucose/g). Innerhalb von 12 Stunden p.m. war der Abbau von Glykogen in allen Proben beendet. (Fig.1) In der Probe ohne PP-Zusatz blieb noch ein beachtlicher Gehalt an Rest-Glykogen übrig (13,5 µMol Glucose/g). Bei einem End-pH-Wert von 5,78 blieben 27,6 % des Glykogens nicht abgebaut. Wie wir bereits früher festgestellt hatten, bewirkt

\*) Abkürzungen: ATP = Adenosintriphosphat; ADP = Adenosindiphosphat; AMP = Adenosinmonophosphat; IMP = Inosinmonophosphat; PP = Diphosphat; p.m. = post mortem.

ein NaCl-Zusatz zu schlachtwarmem Fleisch einen unvollständigen Glykogen-Abbau (1). In den Proben mit PP-Zusatz verlief die Glykolyse unabhängig von der PP-Konzentration. rascher als in der Kontrollprobe. Die Gehalte an Restglykogen waren erheblich niedriger.

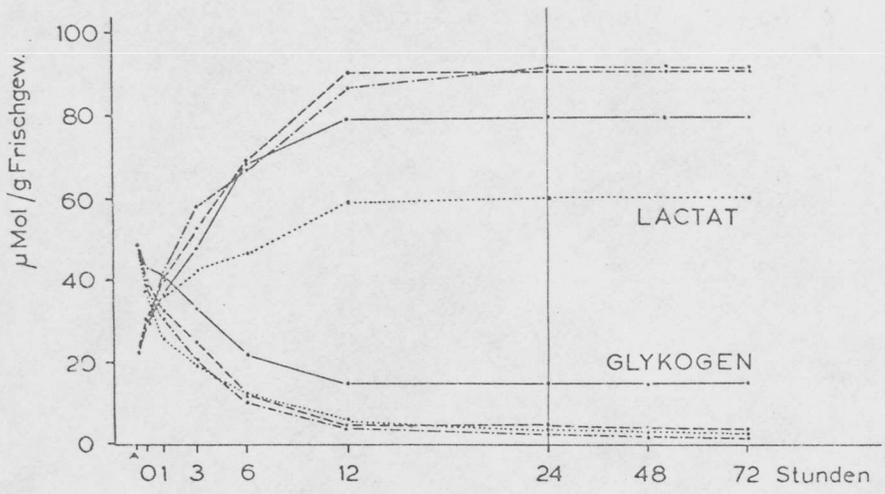


Fig. 1 Einfluß von Diphosphat (PP) auf die Geschwindigkeit der Umwandlung von Glykogen in Lactat im zerkleinerten, gesalzenen Rindermuskel. Der erste Punkt jeder Kurve bezeichnet den Wert für das unzerkleinerte, schlachtwarme Gewebe, der zweite Punkt gibt den Wert für das frisch zerkleinerte Gewebe nach Zusatz der Salze an. Die Zeit post mortem ist vom Zeitpunkt der Zerkleinerung an gerechnet.

Influence of diphosphate (PP) on the time-course of the transformation of glycogen to lactate in minced salted beef. First point of each curve: intact muscle; second point: freshly minced tissue (with added salts); abscissa: hours after grinding.

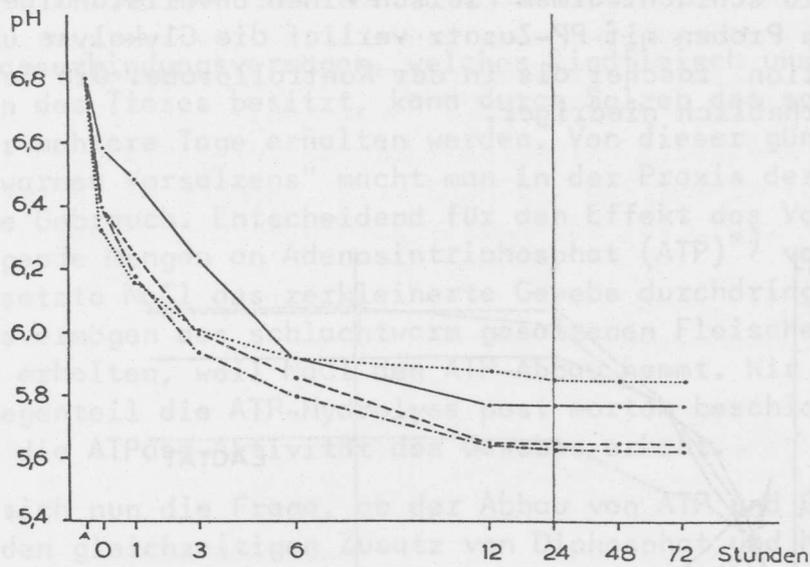
○---○: 2 % NaCl; ○---○: 2 % NaCl + 0,3 % PP; ○---○: 2 % NaCl + 0,5 % PP; ○---○: 2 % NaCl + 1,0 % PP.\*

Die Zunahme an Lactat während der Glykolyse post mortem ist ebenfalls aus Fig. 1 zu ersehen. Wie bei den von HAMM und VAN HOOFF (4) beschriebenen Versuchen, war auch hier die Umwandlung von Glykogen in Lactat nicht vollständig. In der Kontrollprobe (2 % NaCl) wurden bei den drei untersuchten Muskeln durchschnittlich 81 % des abgebauten Glykogens als Lactat wiedergefunden; bei Zusatz von 0,3 bzw. 0,5 % PP waren es 77,5 % bzw. 74,0 %, bei Zusatz von 1,0 % PP nur 38,5 %. Es sei erwähnt, daß ein Zusatz von 1 % PP die enzymatische Lactatbestimmung nicht stört. Auch um eine unvollständige Extraktion des Lactat kann es sich hier, wie Kontrollversuche ergaben, nicht handeln.

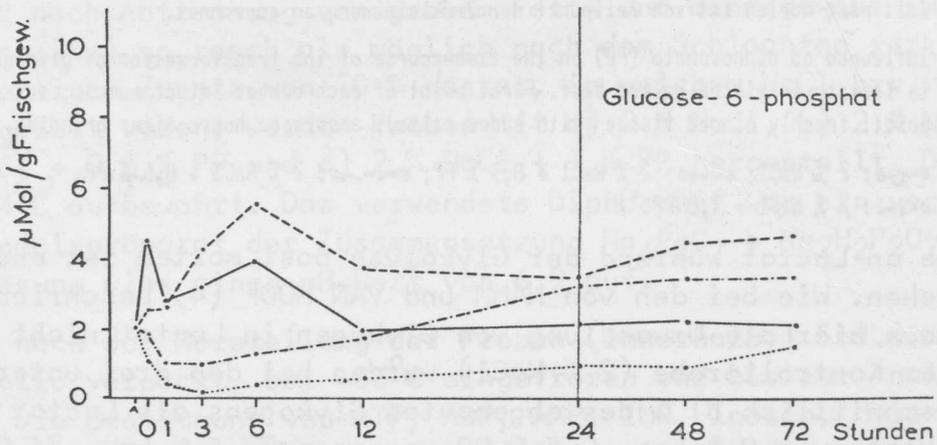
Der zeitliche Verlauf der pH-Änderung post mortem (Fig. 2) entsprach dem Verlauf der Milchsäurebildung. Die pH-Abnahme war nach 12 Stunden p.m. beendet. Sie verlief während der ersten Stunden p.m. in der Kontrollprobe langsamer als in den Proben mit PP-Zusatz.

Während in den Kontrollproben und in den Proben mit 0,3 % PP die Menge an Hexosemonophosphat während der ersten Stunden p.m. etwas zunahm, sank er in den Proben mit 0,5 und 1,0 % PP ab. Im weiteren Verlauf der Lagerung p.m. stieg der pH-Wert in den letzteren beiden Proben an; in der Kontrollprobe und in der Probe mit 0,3 % PP nahm er zunächst ab und blieb dann unverändert (Fig. 3).

\*) Diese Zeichenerklärung gilt auch für Fig. 2 - 6.



**Fig. 2** Einfluß von Diphosphat auf die Geschwindigkeit der pH-Abnahme im zerkleinerten, gesalzenen Rindermuskel.  
 Influence of diphosphate on the time-course of the change in pH in minced, salted beef muscle.



**Fig. 3** Einfluß von Diphosphat auf den Gehalt des zerkleinerten, gesalzenen Rindermuskels an Hexosemonophosphat zu verschiedenen Zeitpunkten post mortem.  
 Influence of diphosphate on the time-course of changes in the concentration of hexose monophosphate in minced, salted beef muscle.

Was die postmortale Hydrolyse von ATP betrifft, so ist der rasche ATP-Abbau in der Kontrollprobe der Gegenwart von NaCl zuzuschreiben (1). Ein Zusatz von 0,3 % PP zu dem schlachtwarm zerkleinerten, gesalzenen Rindfleisch hatte nur wenig Einfluß auf die Geschwindigkeit der ATP-Spaltung (Fig. 4). In den Proben mit 0,5 und 1,0 % PP verlief der ATP-Abbau in den ersten Stunden p.m. wesentlich rascher als in der Kontrollprobe. Da sich die ATP-Abnahme nach dieser ersten raschen Phase etwas verzögerte, waren die letzten nachweisbaren ATP-Mengen im Gewebe auch in Gegenwart von PP nicht rascher

verschwunden als in der Kontrollprobe. In der Probe mit 0,5 % PP war die Verzögerung der zweiten Abbauphase so stark, daß hier im Gegensatz zu den drei übrigen Proben 12 Stunden p.m. noch 0,32 µMol ATP/g nachzuweisen waren.

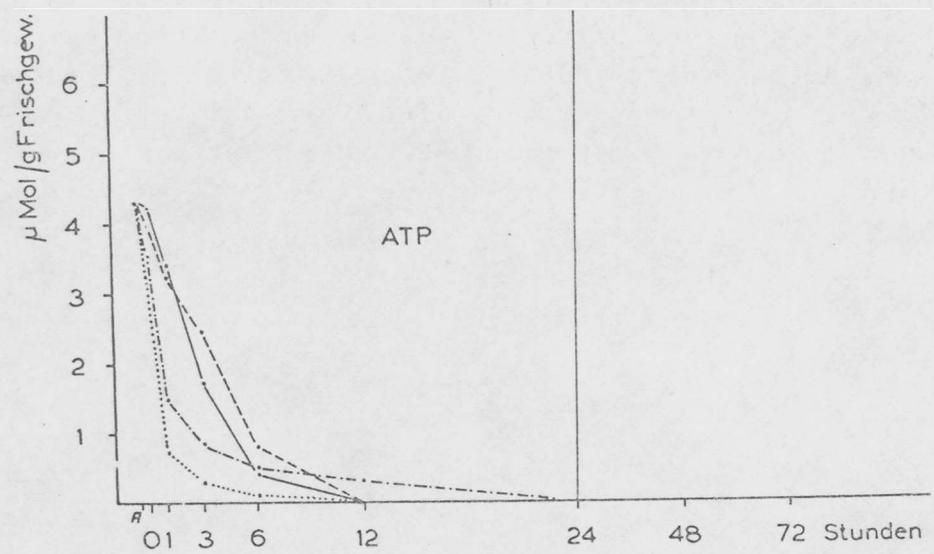


Fig. 4 Einfluß von Diphosphat auf die Geschwindigkeit des ATP-Abbaues in zerkleinertem, gesalzenem Rindermuskel.

Influence of diphosphate on the time-course of changes in the concentration of ATP in minced, salted beef muscle.

Der ADP-Gehalt des Gewebes nahm in der Kontrollprobe von 1,16 µMol/g allmählich auf 0,43 µMol/g (72 Stdn. p.m.) ab (Fig. 5). Mit zunehmender Menge an zugesetztem PP nahm die Geschwindigkeit dieses Abbaues in der ersten Stunde p.m. zu. Nach einer gewissen Zunahme dieser Werte im Zeitraum zwischen 1 und 6 Stdn.p.m. wiesen die ADP-Gehalte in den vier Proben keine nennenswerten Unterschiede mehr auf.

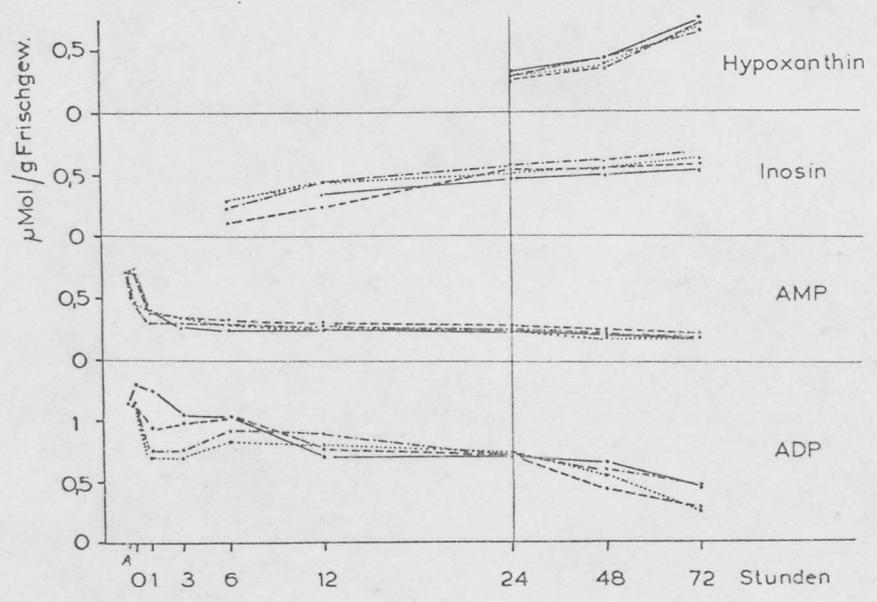


Fig. 5 Einfluß von Diphosphat auf den Gehalt des zerkleinerten, gesalzenen Rindermuskels an ADP, AMP, Inosin und Hypoxanthin zu verschiedenen Zeitpunkten post mortem.

Influence of diphosphate on the time-course of changes in the concentrations of ADP, AMP, inosine and hypoxanthine in minced, salted beef muscle

Die Menge an AMP (0,49 - 0,71  $\mu\text{Mol/g}$ ) nahm während der ersten Stunde p.m. etwas ab, um sich dann im Verlauf der weiteren Lagerung nicht mehr zu ändern (Fig. 5). Ein Einfluß von Diphosphat war hier nicht zu erkennen.

Die postmortale Zunahme der im Gewebe enthaltenen Menge an IMP ist aus Fig. 6 zu ersehen. Die IMP-Konzentrationen erreichten jeweils ein Maximum, wenn ATP nahezu völlig abgebaut war (Fig. 4). Die Geschwindigkeit der IMP-Bildung post mortem in den verschiedenen Proben entsprach der Geschwindigkeit des ATP-Abbaues, d.h. in den Proben mit 0,5 und 1,0 % PP nahm die IMP-Konzentration rascher zu als in denen ohne PP oder mit 0,3 % PP.

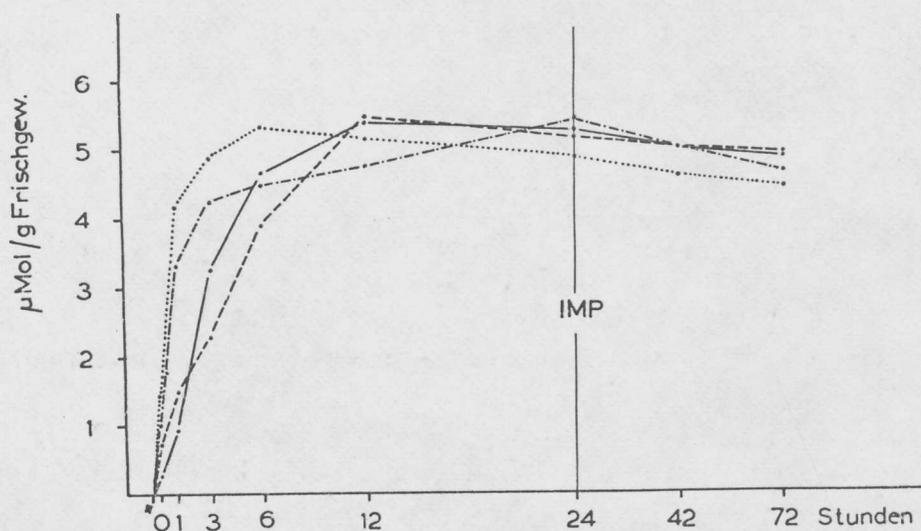


Fig. 6 Einfluß von Diphosphat auf die Geschwindigkeit der IMP-Bildung in zerkleinertem, gesalzenem Rindermuskel.

Influence of diphosphate on the time-course of increase in the amount of IMP in minced, salted beef muscle.

6 Stdn. p.m. konnte in allen Proben Inosin in geringen Mengen nachgewiesen werden (Fig.5). Der Inosingehalt zu diesem Zeitpunkt war um so höher, je weiter ATP abgebaut war. Innerhalb von 72 Stdn.p.m. stieg der Inosingehalt allerdings nur noch auf Mengen zwischen 0,50 und 0,74  $\mu\text{Mol/g}$  an.

Hypoxanthin war in allen Proben erst etwa 24 Stdn.p.m. in meßbaren Mengen vorhanden. Im weiteren Verlauf der Lagerung nahm der Hypoxanthingehalt auf Werte zwischen 0,60 und 0,74  $\mu\text{Mol/g}$  zu. Ein Effekt des Diphosphats war hier nicht zu bemerken.

#### 4. Diskussion

Diphosphat beeinflusst den Abbau von ATP und Glykogen im zerkleinerten, gesalzenen (2 % NaCl) Rindermuskel nicht in der erwarteten Weise. Statt der vermuteten Verlangsamung des ATP-Abbaues beschleunigte ein Zusatz von 0,5 und 1,0 PP die ATP-Spaltung, während 0,3 % PP keine eindeutige Wirkung ausübte. Ein Zusatz von 40 mM PP (1,0 %) müßten bei weitem ausreichen, die freien Erdalkali-Ionen des Muskels komplex zu binden. Daß PP dennoch die ATP-Hydrolyse nicht hemmt, kann darauf beruhen, daß die Dissoziationskonstante des Calciumpyrophosphats zu hoch ist, um die  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration unter die kritische Konzentration von  $10^{-5}\text{M}$  (5) zu senken. Es ist jedoch bemerkenswert, daß

man bei Kaninchen und Schweinen durch Injektion der starken Komplexbildner EDTA und EGTA ante mortem zwar die postmortale Verkürzung, nicht aber den ATP-Abbau hemmen konnte (6, 7). Die Beschleunigung des ATP-Abbaues durch PP kann ebenso wie der analoge Effekt von NaCl (1) auf einer Aktivierung der ATPase durch das Alkali-Ionen beruhen. Diese Ergebnisse lassen bezweifeln, daß der ATP-Abbau im Muskel p.m. durch myofibrilläre ATPase erfolgt. Möglicherweise handelt es sich um die Wirkung alkali-aktivierbarer ATPasen.

Die Beschleunigung des ATP-Abbaues durch PP-Zusatz hängt möglicherweise auch mit der beobachteten Hemmung der Umwandlung von Glykogen zu Lactat zusammen, deren Ursache noch nicht geklärt ist. Um eine Hemmung der Phosphohexose-Isomerase kann es sich hier nicht handeln, da mit steigendem PP-Zusatz keine Anhäufung, sondern sogar eine Abnahme an Glucose-6-Phosphat eintrat. Ob die Glykolyse auf einer anderen Stufe durch PP gehemmt wird, ist noch festzustellen.

Literatur

1. VAN HOOF, J., R. HAMM u. K. POTTHAST: Fleischwirtschaft 50, 80 (1970)
2. MOMMAERTS, W.: J. Gen. Physiol. 31, 361 (1948)
3. HASSELBACH, W. u. A. WEBER: Pharmacol. Rev. 7, 97 (1955)
4. HAMM, R. u. J. VAN HOOF: Vortrag. 17th European Meeting of Meat Research Workers. Bristol, 1971
5. BENDALL, J. R.: "Muscles, Molecules and Movement". London, 1969
6. WEINER, P. D. and A. M. PEARSON: Proceed. Soc. Experim. Biol. Med. 123, 185 (1966)
7. WEINER, P. D. and A. M. PEARSON: J. Food Sci. 34, 592 (1960)

Glycolytic activity in a salted and matured pork product.

E. Maggi.

A 10.