

H.-G. LIEBICH und E. MEIER

Institut für Tieranatomie, Lehrstuhl für Histologie und Embryologie, Universität München, BRD

Einleitung

Abweichend von der experimentell-wissenschaftlichen Zielsetzung in der Cryobiologie - weitgehende Funktionserhaltung von Geweben und Organen - existiert in der gewerblichen Gefrierkonservierung der Fleischtechnologie der Wunsch nach Überwindung des Zeitfaktors ohne Einbußen in der Verzehrqualität. Dies erscheint angesichts eines komplex geschichteten physikalischen bzw. physikochemischen Reaktionsablaufes als schwerlich realisierbar. (1, 3, 4, 13, 14, 15, 16, 17)

Die vor allem von der Größe des Schlachtkörpers (oder dessen Teilstücke) diktierten Behandlungsmethoden (z.B. niedrige Gefrier- und Auftaugeschwindigkeiten) bedingen irreparable Strukturveränderungen des Gewebes, die bis zur Desintegration von Zellsystemen bzw. -organellen reichen.

Die in diesem Zusammenhang vielfach erkannten Einflüsse auf die intrazellulär ablaufenden biochemischen Vorgänge (2, 7, 8, 9, 10, 11) stellen weiterhin noch aktuelle Problemkreise der Fleischforschung dar. Als sinnvolle Erweiterung hierfür bietet sich die morphologische Strukturanalyse an.

Durch die Darstellung der strukturellen Alterationen und deren Zuordnung zu den angewandten Gefrier- und Auftaumethoden, sollten Parameter erarbeitet werden, die eine eindeutige Differenzierung von unterschiedlich behandeltem Gefrierfleisch nach morphologischen Gesichtspunkten erlauben.

Material und Methoden

Als Probenmaterial diente der M. semitendinosus des Rindes, der durch seinen gemischt-faserigen Aufbau (alle drei Faserqualitäten) repräsentativen Charakter besitzt. Der Muskel wurde nach dem Schlachtvorgang in seiner Gesamtheit isoliert und den gewerblichen Konservierungsmethoden unterworfen.

Nach einer Vorkühlphase bei +4°C von 18 Std. mit einer Kerntemperatur von +5-7°C, wurde das Material zwei unterschiedlichen Gefriervorgängen unterworfen. Ein Teil der Muskelstücke wurde für 24 Std. bei -22°C ($V_G = -1^\circ\text{C}/\text{Std.}$), der andere für 10 Std. bei -45°C ($V_G = -5^\circ\text{C}/\text{Std.}$) gefroren bzw. schockgefroren. Im Anschluß daran wurden beide Untersuchungsproben bei der für Gefrierfleisch kommerziell praktizierten Temperatur von -22°C gelagert.

Nach einer Lagerdauer von 3 bzw. 6 Monaten wurden die Proben jeweils zwei unterschiedlichen Auftaumethoden unterworfen. Ein Teil wurde innerhalb 90 Min. bei Raumtemperatur (+22°C, d.h. $V_T = 0,5^\circ\text{C}/\text{min.}$), der andere innerhalb 18 Std. bei +4°C im Kühlschrank ($V_T = 0,025^\circ\text{C}/\text{min.}$) aufgetaut. Die Probenentnahmen erfolgten jeweils 2 Std. p.m., 24-28 Std. p.m. sowie nach 3 bzw. 6 Monaten Lagerdauer.

Die anschließende Fixation der isolierten Organproben (Kantenlänge 1 mm) erfolgte in einer 6%igen Glutaraldehyd-Lösung (0,1 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,2) für 3 Std. bei +4°C. Nach Kontrastierung in 1%iger Osmiumsäure (OsO_4 , 1 Std. bei +4°C) wurden die Proben in einer aufsteigenden Acetonreihe entwässert und in Araldit eingebettet. Die Ultradünnschnitte wurden mit Bleioxid und Uranylacetat nachkontrastiert und mit einem Elmiskop 101 untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

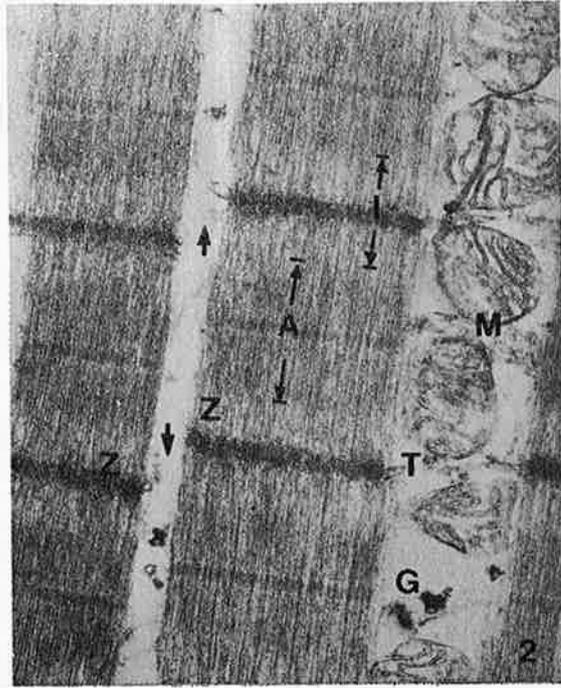
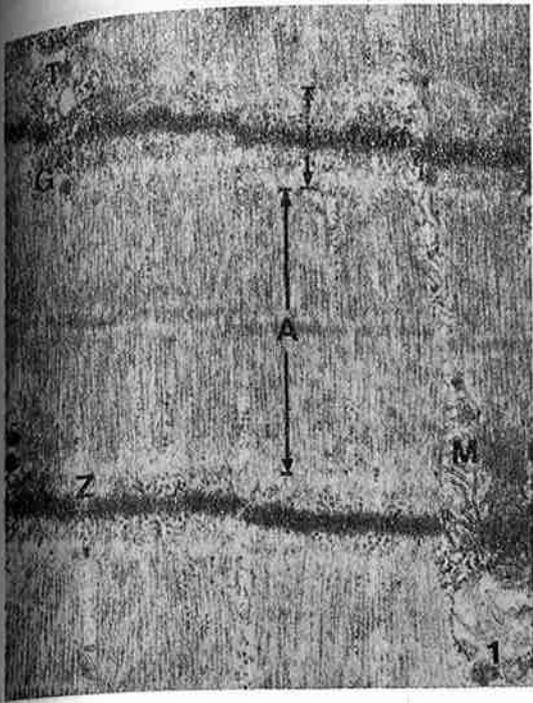
STRUKTURVERÄNDERUNGEN AN SARKOMEREN UND ORGANELLEN BEI FRISCHFLEISCH (FF)

I. 2 Std. post mortem bei Schlachthoftemperatur (FF₀) (Abb. 1)

Die Sarkomerlänge von 2,0 µm setzt sich aus einer A-Bande von 1,52 µm und myosinfreien Zonen von 0,44 µm zusammen. Diese geringfügige Verkürzung kann auf die rasche Abkühlung der Muskelproben durch die Fixierlösung (+4°C) zurückgeführt werden. M- und H-Streifen sind deutlich ausgebildet. Strukturelle Veränderungen an Mitochondrien sowie innerhalb des T- bzw. L-Systems können nicht beobachtet werden, Glykogengranula treten frei zwischen den Myofibrillen auf.

II. 24-28 Std. post mortem nach kommerzieller Vorkühlung bei +4°C (FF₁) (Abb. 2)

Die Sarkomere weisen eine Länge von 1,17-1,42 µm auf, wobei 0,72-0,83 µm auf die A-Bande und 0,44-0,54 µm auf die myosinfreien Zonen entfallen. Diese morphometrischen Beobachtungen lassen den Rigor unter neuen Gesichtspunkten erscheinen. Danach verkürzen sich, bei gleichbleibenden Größenwerten (früh-postmortal) der I-Bande, die Myosinfilamente. Als Ursache hierfür muß der absinkende pH-Wert des Fleisches angesehen werden. Der Z-Streifen mit einer Breite von 0,09 µm bleibt unverändert. Durch Zerstörung der "intermediate filaments" (100 Å) (5) verlieren benachbarte Z-Streifen ihren Kontakt, es bilden sich interfibrilläre Spalträume unterschiedlicher Größenordnung aus. Die mitochondriale Matrix und Teile der Membransysteme stellen sich als geringfügig verändert dar, der Glykogengehalt ist reduziert.



Ultrastrukturelle Ausschnittsvergrößerungen von Frischfleisch 2 Std. p.m. (Abb. 1). Die zelluläre Organisation ist unversehrt, fixationsbedingte Verkürzung der I-Bande.
 24-28 Std. p.m. (Abb. 2) treten Zusammenhangstrennungen benachbarter Z-Streifen (→), leichte Irritationen der Mitochondrien und extreme myosinbedingte Verkürzungen der Sarkomere auf.
 (A A-Bande, I I-Bande, Z Z-Streifen, M Mitochondrium, T Tubuläres System, G Glykogen) Vergrößerungen 36000fach

STRUKTURVERÄNDERUNGEN AN SARKOMEREN UND ORGANELLEN NACH GEFRIEREN DES FLEISCHES (GF)
 UND EINER LAGERUNG VON 3 MONATEN

I. Einfriertemperatur von -22°C

1) Einfluß einer Auftautemperatur von +4°C (Abb. 3)

Die Sarkomere erreichen eine durchschnittliche Länge von 1,54 µm, sie setzt sich aus einer A-Bande von 1,3 µm und myosinfreien Zonen von 0,2 µm unter weitgehender Strukturhaltung des M- bzw. H-Streifens zusammen. Die Breite der Sarkomere verjüngt sich in Richtung auf die Z-Streifen (0,06 µm Breite). Die Mitochondrien-Cristae erscheinen vakuolär erweitert, die Mitochondrienaußenmembranen rupturiert.

2) Einfluß einer Auftautemperatur von +20°C

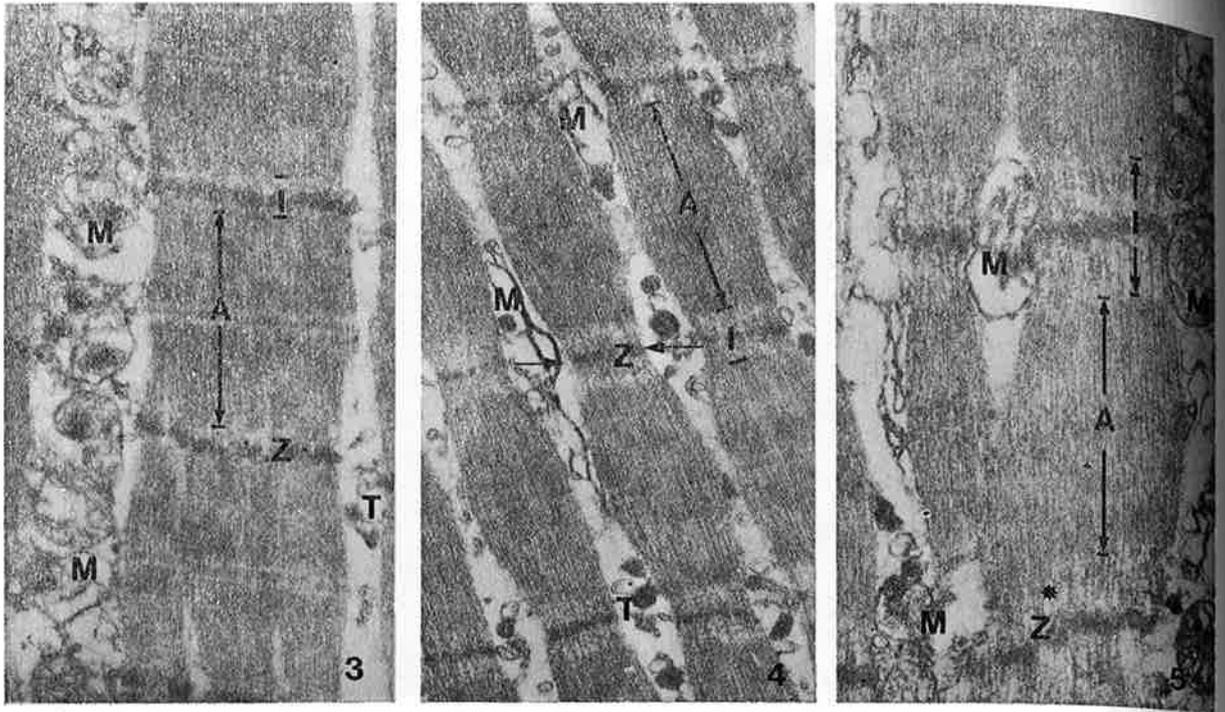
Die Sarkomerenlänge von 1,57 µm und die Länge der A-Bande von 1,30 µm entspricht den bei einer Auftautemperatur von +4°C gefundenen Größenwerten. Strukturell erscheint lediglich die I-Zone deutlicher abgesetzt, Z-Streifen und M-Zone sind gegenüber +4°C unverändert ausgebildet. Die Mitochondrien erscheinen hier ebenfalls vakuolär verändert, ihre Membranen bleiben jedoch besser erhalten.

Als Ursache für die sekundäre Streckung der Sarkomere einschließlich des Myosins gegenüber FF₁ wird die physikalische Wirkung des Gefriervorganges angesehen. Danach muß dieser Vorgang als ein zusammengesetzter Reaktionsablauf betrachtet werden: der relativ starken Myosinausdehnung steht eine geringere Sarkomerenelongation gegenüber. Danach schieben sich Myosinfilamente zwischen Aktinfilamente und führen somit zu einer Reduktion der I-Bande. Die Verkürzung der Z-Streifen könnte auf eine generelle Größenabnahme zurückzuführen sein. Die ausschließlich im Randbereich schräg verlaufenden Aktinfilamente weisen jedoch auf eine ausschließliche Kontraktion der Peripherie der unterschiedlich aufgebauten Z-Scheibe hin (6, 12). Die graduell unterschiedlichen Membranschäden an Mitochondrien sind auf das Phänomen der Rekristallisation zurückzuführen, das bei einer Auftautemperatur von +4°C stärker zum Ausdruck kommt.

II. Einfriertemperatur -45°C (Schockgefrieren)

1) Einfluß einer Auftautemperatur von +4°C (Abb. 4)

Die morphometrischen Daten für die Länge eines Sarkomeres von 1,46 µm und dessen einzelne Abschnitte (Länge der A-Bande 1,2 µm und Länge der I-Bande 0,24 µm) entsprechen weitgehend den bei -22°C Einfrier-



Ultrastrukturelle Ausschnittsvergrößerungen von aufgetautem Gefrierfleisch nach 3-monatiger Lagerung bei -22°C . **Abb. 3:** Einfriertemperatur -22°C , Auftautemperatur $+4^{\circ}\text{C}$. **Abb. 4:** Einfriertemperatur -45°C , Auftautemperatur $+4^{\circ}\text{C}$. **Abb. 5:** Einfriertemperatur -45°C , Auftautemperatur $+20^{\circ}\text{C}$. Vergrößerungen 36000-fach.

temperatur beschriebenen Veränderungen. M- und H-Streifen sind andeutungsweise ausgebildet. Der Z-Streifen erscheint sowohl in Breite ($0,05\ \mu\text{m}$) als auch in Länge ($0,73\ \mu\text{m}$) reduziert (\rightarrow). Die Mitochondrien lassen keinerlei Innenstrukturen erkennen, ihre Außenmembranen liegen fragmentiert im interfibrillären Spalt.

2) Einfluß einer Auftautemperatur von $+20^{\circ}\text{C}$ (Abb. 5)

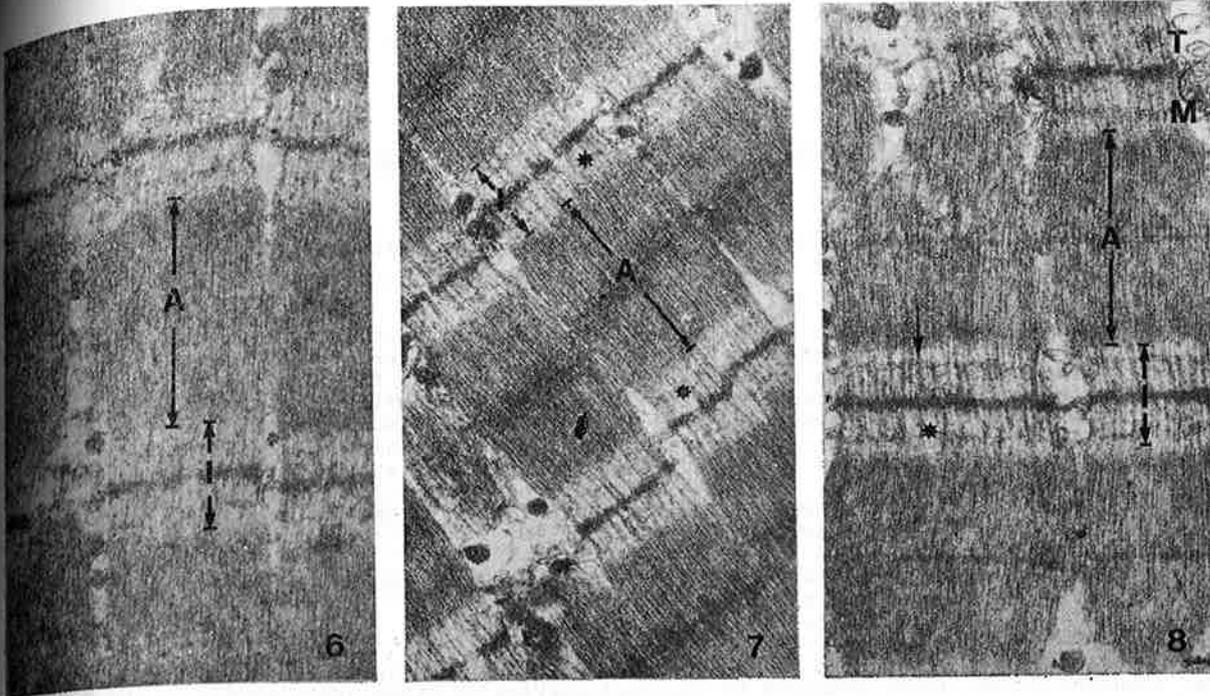
In dieser Versuchsgruppe erreichen Sarkomere eine Länge von durchschnittlich $1,97\ \mu\text{m}$, Myosinfilamente von durchschnittlich $1,30\ \mu\text{m}$. Auffallend bei dieser Auftautemperatur von $+20^{\circ}\text{C}$ ist jedoch die Dehnung der I-Bande bis zu $0,52\ \mu\text{m}$. Gerade in diesem Abschnitt eines Myokommas fallen die extremen Zusammenhängstrennungen unter gleichzeitiger spaltähnlicher Erweiterung anliegender Aktinfilamentbündel auf (*). Hier können elektronenoptisch dichte feinfibrilläre Bandenabschnitte beobachtet werden. Innerhalb der A-Zone werden nur gelegentlich M-Streifen sichtbar. Die Breite des Z-Streifens beträgt $0,1\ \mu\text{m}$. Neben weitgehend unveränderten Mitochondrienaußenmembranen reicht das Spektrum der Innenstrukturen von unzerstört bis extrem deformiert.

Bei der relativ schnellen Einfriergeschwindigkeit von $-5^{\circ}\text{C}/\text{Std.}$ wird intrazellulär mehr Wasser gefroren; die dabei ablaufenden Kristallisationsvorgänge bewirken eine mechanische Zerstörung der Aktinfilamente. Bei höherer Auftautemperatur von $+20^{\circ}\text{C}$ bleibt Wasser jedoch durch den nur geringgradigen Membranschaden weitgehend intrazellulär lokalisiert und wandert sekundär aus den interfibrillären Spalträumen in das kontraktile System. Dies führt zu einer Verbreiterung der I-Bande und damit zu einer Verlängerung der Sarkomere. Bei geringerer Auftautemperatur ($+4^{\circ}\text{C}$) bewirkt die zeitlich länger andauernde Rekristallisation erhebliche Membranschäden (Mitochondrien, Sarkolemm), denen zu folge Wasser aus der Zelle austritt. Die direkte Gegenüberstellung der unterschiedlichen Einfriergeschwindigkeiten zeigt bei -45°C erhebliche Veränderungen im M- bzw. H-Streifen und offensichtlichere Reduktionen der Z-Scheibe.

STRUKTURVERÄNDERUNGEN AN SARKOMEREN UND ORGANELLEN NACH GEFRIEREN DES FLEISCHES (GF) UND EINER LAGERUNG VON 6 MONATEN

I. Einfriertemperatur -22°C (Abb. 6)

Die nach 3-monatiger Lagerzeit - trotz unterschiedlicher Auftauvorgänge - beobachteten Gemeinsamkeiten der strukturellen Veränderungen können auch nach 6 Monaten angetroffen werden. Lediglich in der Verlängerung der Sarkomere auf durchschnittlich $1,7\ \mu\text{m}$ bei gleichbleibender Myosinlänge von $1,3\ \mu\text{m}$ und



Ultrastrukturelle Ausschnittsvergrößerungen von aufgetautem Gefrierfleisch nach 6-monatiger Lagerung bei -22°C . Abb. 6: Einfriertemperatur -22°C , Auftautemperatur $+20^{\circ}\text{C}$. Abb. 7: Einfriertemperatur -45°C , Auftautemperatur $+4^{\circ}\text{C}$. Abb. 8: Einfriertemperatur -45°C , Auftautemperatur $+20^{\circ}\text{C}$. (\rightarrow feinfibrilläre Bande). Vergrößerungen 36000-fach.

einer Verbreiterung der I-Banden auf $0,4-0,5\ \mu\text{m}$ weichen sie voneinander ab. Als Ursache hierfür wird die lange Lagerdauer mit den dabei kontinuierlich ablaufenden Umkristallisationsvorgängen sowie enzymatische Reaktionsketten angenommen.

II. Einfriertemperatur -45°C (Abb. 7 und 8)

Die hierbei beobachteten Strukturveränderungen entsprechen grundsätzlich den 3-monatigen Vergleichsproben. Als besonderes Merkmal wird jedoch auch hier die Verbreiterung der I-Bande bis $0,5\ \mu\text{m}$ erkannt. M- und H-Streifen treten als diffus kontrastierte Zone auf. Auch hier muß das Phänomen der Umkristallisation und eine Enzymwirkung angeführt werden.

LITERATUR

- (1) ALKINK, G.M., *Cryobiology* 15, 44-58 (1978)
- (2) CALVELO, A., "Developments in Meat Science - 2" (R. Lawrie, ed.), S. 125. Applied Sci. Publ. London and New Jersey (1981)
- (3) DILLER, K.R., *Cryobiology* 9, 429-440 (1972)
- (4) FISCHER, C., K.D. HONIKEL und R. HAMM, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 171, 105-110 (1980)
- (5) GRANGER, B.L., LAZARIDES, E., *Cell* 15, 1253-1268 (1978)
- (6) GRANGER, B.L., LAZARIDES, E., *Cell* 18, 1053-1063 (1979)
- (7) HAMM R. und A.A. EL-BADAWI, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 150, 12-24 (1972)
- (8) HAMM, R., "Proteins at Low Temperatures" (O. Fennema, ed.), S. 191. Advances in Chemistry Ser. No. 180. Amer. Chem. Soc., Washington D.C. (1979)
- (9) HAMM, R. und KÖRMENDY, L., *Food Sci.* 34, 452 (1969)
- (10) HAMM, R., MASIC, D. und TETZLAFF, L., *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 147, 71 (1971)
- (11) HOFMANN, K., E. BLOCHEL und K. BANDISCH, XX. Europ. Fleischforscher-Kongress, Dublin (1974)
- (12) LAZARIDES, E., *International Cell Biology* 1980-81, S. 392-398
- (13) LUYET, B.J. und G.L. PAPANZ, *Biodynamica* 9, 297-303 (1965)
- (14) MOOR, H., *Z. Zellforsch.* 62, 546-580 (1964)
- (15) PUSHKAR, N.S., Y.A. ITHIN und V.L. BRONSTEIN, *Cryobiology* 13, 147-152 (1976)
- (16) WALTER, C., "Frozen Cell", Ciba Foundation Symposium, S. 271-290, Churchill, London (1970)
- (17) WILLIAMS, L. und S. HODSON, *Cryobiology* 15, 323-333 (1978)