

## Der Einfluß des Gefrierens und der Gefrierlagerung auf die Apyraseaktivität der Fisch- und Rindermuskulatur.

Von

W. PARTMANN\*.

*Mitteilung aus der Bundesforschungsanstalt für Lebensmittelfrischhaltung, Karlsruhe.*

(Eingegangen am 1. April 1954.)

Für die Messung des Qualitätsabfalles von Fleisch und Fisch bei längerdauernder Gefrierlagerung fehlt es immer noch an geeigneten objektiven Testmethoden. Möglichkeiten können sich aus den neueren kanadischen Forschungsergebnissen über die Denaturierung der Fischmuskelproteine bei der Lagerung von Gefrierfischen ergeben<sup>1</sup>, wonach in erster Linie die Actomyosinfraktion, die ja den Hauptbestandteil der Muskelfibrillen darstellt und in der Fischmuskulatur etwa 70% des Gesamtproteins ausmacht, Veränderungen erfährt. Für das Ausmaß dieser Denaturierung in der Muskulatur sind die Gefriereschwindigkeit, Lagertemperatur und Lagerzeit<sup>1</sup> verantwortlich zu machen. In der Heilbuttmuskulatur nahmen die gesamten löslichen Proteine bei Lagertemperaturen um  $-20^{\circ}\text{C}$  in 20 Wochen von 90 auf etwa 70% des Gesamtproteins und des in 5% Kochsalz löslichen Myosin von 64 auf etwa 45% ab. Im gleichwertigen Material bei gleicher Lagerzeit und  $-12^{\circ}\text{C}$  erreichten die Werte für die gesamten löslichen Proteine etwa 60% und für Myosin etwa 40% des Gesamtproteins.

Da das Myosin zugleich Träger eines wesentlichen Teiles der Adenosintriphosphatase-Aktivität der Muskulatur ist, liegt es nahe, daran zu denken, daß bei der weitgehenden Denaturierung der Actomyosinfraktion im Verlauf der Gefrierlagerung auch die Enzym-Aktivität der Muskulatur in Mitleidenschaft gezogen werden könnte. Das müßte bei der Messung ihrer „Gesamtapyraseaktivität“ zum Ausdruck kommen.

Bekanntlich erfolgt in der Muskulatur der ATP-Abbau zur Adenylsäure (AMP) in 2 Stufen über das Adenosindiphosphat (ADP). Dabei katalysiert die wasserlösliche Myokinase der Muskulatur die Dismutation von ADP in AMP und ATP. Da vermutlich keine nennenswerte ADP-Anhäufung im Muskel stattfindet, wie BAILEY am Kaninchenmuskel beobachtet hat<sup>2</sup> und auch gemäß dem EMBDEN-MEYERHOF-Schema der Glykolyse der ATP-Abbau durch das ATP-Enzym-system die Geschwindigkeit der glykolytischen Prozesse bestimmt<sup>2</sup>, können wir durch Verfolgung des ATP-Abbaues zu AMP — also durch Bestimmung der „Apyraseaktivität“ — auch zu Aussagen über die Wirksamkeit des daran beteiligten ATP-Enzymsystems gelangen.

Es wurde daher untersucht, ob Proben der Seitenrumpfmuskulatur von Schleien und *Gastrocnemius*-Muskulatur von Rind durch Einfrieren bei verschiedenen Gefriereschwindigkeiten und anschließender Gefrierlagerung eine Veränderung ihrer

\* Frl. M. STROBEL sei für ihre gewissenhafte Mitarbeit herzlich gedankt.

<sup>1</sup> Annual Rep. Fish. Res. Board Canada 1950, 75; 1951, 120.— SNOW, J. M.: J. Fisheries Res. Board Canada 7, 599 (1950). — DUERR, J. D., u. W. J. DYER: J. Fisheries Res. Board Canada 8, 325 (1952).

<sup>2</sup> BAILEY, K.: Biochemic. J. 42, 58 (1948). — BATE-SMITH, E. C., u. J. F. BENDALL: J. of Physiol. 110, 47 (1949).

Apyraseaktivität erkennen lassen, die Rückschlüsse auf die Behandlungsweise gestattet und evtl. als Testmethode zur Bestimmung von Gefrieränderungen in diesen Geweben dienen kann.

### Behandlung der Proben.

Um mit den praktischen Verhältnissen weitgehend übereinstimmende Bedingungen zu erhalten, gingen wir folgendermaßen vor: Die benutzte Muskulatur — beim *Gastrocnemius* des Rindes verwandten wir nur bindegewebsarmes Gewebe — wurde nach Entnahme aus dem kurze Zeit zuvor getöteten Tier lediglich mehrfach durch den Fleischwolf getrieben, gut gemischt und zu Proben von je 1 g in Reagensgläser eingewogen. Die Reagensgläser wurden am offenen Ende zugeschmolzen, ohne daß eine wesentliche Erwärmung der darin befindlichen Muskulatur eintrat. Durch dieses Verfahren wurde ein Gewichtsverlust der im Glas eingeschlossenen Probe bei der späteren Gefrierlagerung ausgeschlossen. Nach 3 Std. Stehen im Kühlschrank wurde auf evtl. noch vorhandene labile Phosphorsäureester (7 min Hydrolyse in n-HCl bei 100° C) geprüft.

Es wurde zwar auch jetzt noch eine konstante Differenz zwischen P-Werten nach der Hydrolyse und direkt bestimmbar P gefunden, die aber im Verlauf der Gefrierlagerung konstant blieb. Über lange Zeiten erfolgt also fermentativ keine Aufspaltung, so daß es sich bei diesem Phosphorsäureester wohl nicht um ATP handeln kann, das bei einer derart niedrigen Konzentration infolge der völligen Unwirksamkeit des MARSH-BENDALL-Faktors bald gespalten sein würde<sup>1</sup>. Der Differenzbetrag beider P-Werte, der sich bei Schleien- und bei Rindermuskulatur auf etwa 0,1 mg/g belief, muß bei Ausrechnung der ATP-Spaltung berücksichtigt werden. Im übrigen wurde auf diese Erscheinung schon von MEYERHOF hingewiesen<sup>2</sup>.

Einige Proben wurden noch am gleichen Tage zur Bestimmung der Spaltung von zugesetztem ATP benutzt, um ein Maß für die Apyraseaktivität im frischen Muskelbrei zu erhalten. Ein Teil der übrigen Proben wurde in Luft bei -18° C, ein anderer im Kohlensäure-Methanolbad bei -76° C und ein weiterer Teil der Proben in flüssiger Luft bei -190° C sehr schnell eingefroren. Ein Teil der Fischmuskelpollen wurde schließlich in Luft bei -5° C gefroren, um auch eine Temperatur in dem für Denaturierungsvorgänge so wichtigen Temperaturbereich zwischen -2° und -10° C zu haben. Hierbei sollte die Frage studiert werden, ob ein Einfluß der Gefriereschwindigkeit, der Gefrier- und Lagertemperatur und der Lagerdauer auf die Apyraseaktivität der Muskulatur besteht oder nicht. Während die bei -190° und -76° C gefrorenen Proben nur wenige Tage bei diesen Temperaturen gehalten werden konnten, wurden die übrigen Proben bei den zum Einfrieren benutzten Temperaturen während längerer Zeit gelagert. Maximal betrug die Lagerzeit für Fischmuskulatur 94 Tage und bei Rindermuskulatur 189 Tage.

### Bestimmung der ATP-Spaltung im Muskelbrei.

*Prinzip:* Die Differenz der direkt bestimmbar P-Menge in einem aliquoten Teil des Trichloroessigsäurefiltrates eines Muskelansatzes (Summe von anorganischem P und Phosphagen P) und der nach 7 min Hydrolyse in n-HCl bei 100° C in einem anderen aliquoten Teil ermittelten P-Menge (Summe von anorganischem P, Phosphagen P und ATP-P) gibt den P der Adenosin-triphosphorsäure an. Dabei ist zu berücksichtigen, daß durch die Säurehydrolyse 2 P des ATP abgespalten werden, und zwar in 7 min zu 97%. Eine weitere Heraufsetzung der Hydrolysenzzeit empfiehlt sich nicht, da dann auch die Abspaltung anderer, möglicherweise vorhandener Phosphorsäureester, wie z. B. der Glucose-1-Phosphorsäure, beginnt.

*Arbeitsvorschrift:* 1 g Muskulatur wurde mit 1 g Sand fein zerkleinert und mit 25 cm<sup>3</sup> Veronalpuffer (p<sub>H</sub> 7) in einen 50 cm<sup>3</sup>-Meßkolben übergespült. Hierzu wurden 15 mg ATP-Na<sub>2</sub>-Salz der Fa. Schuchardt (München) in 5 cm<sup>3</sup> Wasser gegeben. Bestimmungen des anorganischen — säurelabilen — und Gesamt-P ergaben eine Reinheit des Präparates von über 80%. ATP

<sup>1</sup> WEBER, H. H.: *Biochim. et biophysica Acta* (Amsterd.) **12**, 150—161 (1953).

<sup>2</sup> MEYERHOF, O.: *Die chemischen Vorgänge im Muskel*. S. 126. Berlin: Springer 1930.

und ADP wurden nicht getrennt bestimmt. Der ATP-Abbau wurde nach den von uns gewählten Zeiten von 3, 10 oder 30 min durch Zusatz von Trichloressigsäure gestoppt. Die Endkonzentration an Trichloressigsäure betrug nach Auffüllung mit Wasser 10%. Nach Filtrieren wurden zwei aliquote Teile des Filtrates n-salzsauer gemacht und auf gleiche Volumina gebracht. Eine der Proben wurde bei 100° C 7 min hydrolysiert. Zur P-Bestimmung benutzten wir eine Modifikation der Methode von BERENBLUM und CHAIN<sup>1</sup>. Die durch Reaktion mit Molybdänsäure erhaltene gelbe Komplexverbindung wurde mit Butylalkohol ausgeschüttelt und durch Reduktion mit Zinn(II)-chlorid zu Molybdänblau reduziert. Die Konzentration der blauen Lösung wurde im Elko II der Fa. Zeiss-Opton mit Filter S 72 colorimetrisch bestimmt. Die Extinktionen sind im Zeitraum zwischen 30 und 90 min nach Farbentwicklung ausreichend konstant. Die Methode weist neben großer Empfindlichkeit gegenüber den Methoden, in denen das Molybdänblau in wäbriger Phase entwickelt wird, u. a. den Vorteil auf, daß das Medium in der Zusammensetzung konstant ist, was auch von SCHAFFER und Mitarbeitern betont wird<sup>2</sup>.

Der enzymatische ATP-Abbau wurde bei allen Versuchen im Temperaturbereich zwischen 21,5 und 23,5° C durchgeführt. Über die Temperaturabhängigkeit der ATP-Spaltung unter den angegebenen Bedingungen soll an anderer Stelle ausführlich berichtet werden. Wie aus dem Verhalten der Myosin-Adenosintriphosphatase<sup>3</sup> und des ATP abbauenden Enzyms von KIELLEY und MEYERHOF<sup>4</sup> zu erwarten war, ist das Ausmaß der ATP-Spaltung durch die Muskulatur außerordentlich  $p_H$ -abhängig und nimmt auf saurem Gebiet mit sinkendem  $p_H$ -Wert sehr stark ab<sup>5</sup>. Es wurde daher in allen Ansätzen unter Verwendung von Veronalpuffer bei  $p_H$  7 gearbeitet.

*Auswertung:* Der enzymatische ATP-Abbau durch Muskelbrei wurde nach 3, 10 und 30 min gemessen. In diesem Zeitabschnitt verläuft die Spaltung unter den hier gewählten Bedingungen, wie auch die aus unseren Versuchen erhaltenen Mittelwerte (Tab. 1 und 2) erkennen lassen, nach dem Schema einer Reaktion 1. Ordnung. Bei halblogarithmischer Darstellung liegen die in Abhängigkeit von der Zeit eingezeichneten Logarithmen der noch vorhandenen ATP-Menge etwa auf einer Geraden, wenn diese auch nicht in den Ordinatenwert 100% ig einmündet.

*Ergebnisse:* Bei Enzymsansätzen mit Muskelgewebe, das keine besondere Vorbehandlung erfahren hat, ist von Probe zu Probe mit kleinen Unterschieden zu rechnen, die durch Differenzen in ihrer chemischen Zusammensetzung bedingt sind. Insbesondere wird der Bindegewebsanteil in verschiedenen Proben nicht genau übereinstimmen. Es war also zunächst zu ermitteln, welche Schwankungsbreite der Ergebnisse zu erwarten ist, wenn wir den durch verschiedene Proben des gleichen Muskelansatzes bedingten ATP-Abbau unter unseren Versuchsbedingungen messen. In der Fischmuskulatur haben wir bei verschiedenen 1 g-Proben des gleichen Ausgangsmaterials und bei 3, 10 und 30 min dauernder Reaktionszeit unter sonst gleichen Bedingungen in der ATP-Spaltung maximal Abweichungen von  $\pm 6\%$  vom Mittelwert erhalten. In der Rindermuskulatur betrug die maximale Abweichung vom Mittelwert sogar  $\pm 15\%$ . Wir möchten annehmen, daß diese deutliche Differenz im Verhalten des Muskelgewebes beider Tiergruppen z. T. darauf zurückzuführen ist, daß der Stromagehalt in der Säugetiermuskulatur sehr viel höher ist als in der Fischmuskulatur. Für letztere wird ein Actomyosingehalt von 70% und bei Kaninchenmuskulatur von 52% der Muskelproteine angegeben<sup>6</sup>.

Wie wir schon an anderer Stelle ausführten<sup>5</sup>, wird in übereinstimmenden Reaktionszeiten bei Zimmertemperatur durch Rindermuskulatur weniger ATP gespalten

<sup>1</sup> BERENBLUM, J., u. E. CHAIN: Biochemic. J. **32**, 295 (1938).

<sup>2</sup> SCHAFFER, F. L., J. FOGU u. P. L. KIRK: Biochemic. J. **32**, 295 (1938).

<sup>3</sup> HASSELBACH, W.: Z. Naturforsch. **7b**, 163 (1952).

<sup>4</sup> KIELLEY, W. W., u. O. MEYERHOF: J. of Biol. Chem. **176**, 591 (1948).

<sup>5</sup> PARTMANN, W.: Vortrag geh. auf d. Internat. Fischsymposium in Göteborg am 18. November 1953.

<sup>6</sup> WEBER, H. H., u. H. PORTZEHL: Erg. Physiol. **47**, 369 (1952).

als durch Schleienmuskulatur. Wir hatten darauf hingewiesen, wie auch schon von STEINBACH<sup>1</sup> betont wurde, daß die Temperaturabhängigkeit des gleichen Prozesses in beiden Tiergruppen unterschiedlich sein könnte.

Die Werte für die Spaltung des zugesetzten ATP liegen bei allen Rindermuskelproben unabhängig von der Lagerzeit (Tab. 1), die bis zu 189 Tagen ausgedehnt wurde, und unabhängig von den benutzten Gefriereschwindigkeiten und den jeweiligen Lagertemperaturen im Bereich der für frische Proben ermittelten Streuung von  $\pm 15\%$  vom Mittelwert.

Tabelle 1. *Spaltung von zugesetztem ATP durch Rindermuskulatur nach Gefrierlagerung.* (Zusatz: 15 mg des Na<sub>4</sub>-Salzes von ATP; vgl. Arbeitsvorschrift.)

Versuch Nr.	Lagerzeit Tage	Lagertemperatur °C	Gespaltene ATP nach		
			3 min %	10 min %	30 min %
1	Frische Muskelprobe vor dem Einfrieren		48,8	59,3	89,5
2	10	-18	53,2	55,3	78,7
3	66		50,6	67,1	71,8
4	86		53,8	61,5	79,5
5	126		53,8	64,1	77,0
6	189		57,4	62,7	70,7
7	6		-76	42,5	49,3
8	2	-190	52,3	54,6	79,0
Mittelwert aller Versuche			51,6	59,2	78,8

Tabelle 2. *Spaltung von zugesetztem ATP durch Schleienmuskulatur nach Gefrierlagerung.* (Zusatz: 15 mg des Na<sub>4</sub>-Salzes von ATP; vgl. Arbeitsvorschrift.)

Versuch Nr.	Lagerzeit Tage	Lagertemperatur °C	Gespaltene ATP nach		
			3 min %	10 min %	30 min %
1	Frische Muskelprobe vor dem Einfrieren		72,8	84,1	93,2
2	7	-4	75,0	82,5	98,7
3	29		68,3	83,0	97,6
4	66		59,1	57,0	87,1
5	145		58,8	58,8	91,2
6	198		66,3	77,6	84,2
7	8		-18	77,3	86,3
8	30	70,7		87,8	92,7
9	94	77,1		88,5	95,4
10	3	-76	76,8	88,4	97,7
11	2	-190	77,3	86,4	97,7
Mittelwert aller Versuche <sup>2</sup>			74,4	85,9	96,3

<sup>1</sup> STEINBACH, H. B.: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **33**, 123 (1949).

<sup>2</sup> Die Versuche Nr. 4, 5, 6 wurden bei der Mittelung nicht berücksichtigt. Näheres s. S. 345.

Auch mit der gefrierengelagerten Fischmuskulatur wurde das entsprechende Ergebnis (Tab. 2) erzielt, so daß die ATP-Spaltung durch Muskelbrei sich nach Lagerung bei Temperaturen unter  $-18^{\circ}\text{C}$  innerhalb des von uns mit der lebendfrischen Muskulatur gefundenen Streubereichs von  $\pm 6\%$  bewegte. Für die Fischmuskulatur hatten wir, abweichend von der Rindermuskulatur, noch eine Lagertemperatur von im Mittel  $-4^{\circ}\text{C}$  einbeziehen können; leider traten gerade bei dieser Temperatur gelegentlich Temperaturschwankungen von  $\pm 2^{\circ}\text{C}$  auf. Bei Berücksichtigung der normalen Abweichung stimmen bis zu 29 Lagertagen die mit der bei  $-4^{\circ}\text{C}$  gelagerten Muskulatur gespaltenen Substratmengen mit den von frischer Muskulatur abgebauten überein. Bei längeren Lagerzeiten war eine Abnahme in der Aktivität dieses Enzymsystems festzustellen, die aber keine direkte Beziehung zur Lagerzeit erkennen ließ.

Es wird vermutet, daß dieses Ergebnis nicht auf Gefrierdenaturierung der Eiweiße zurückzuführen ist, sondern auf bakteriell bedingte Vorgänge. Bekanntlich vermag eine Lagertemperatur von  $-4^{\circ}\text{C}$  das Wachstum vieler Fischbakterien keinesfalls zu unterbinden. Für die hier gegebene Deutung der Abnahme der Apyraseaktivität spricht auch der sinnesphysiologische Befund an den gelagerten Fischmuskelpöben. Sie hatten sich etwas gelblich verfärbt, waren vielfach glasig durchsichtig geworden und wiesen einen deutlich tranigen Geruch auf. Untersuchungen, ob den bakteriellen Veränderungen der Eiweißsubstanzen oder oxydativen an den Fetten der Fischmuskulatur die größere Bedeutung für die Minderung der Apyraseaktivität der Fischmuskulatur zukommt, sind eingeleitet.

Zusammenfassend möchten wir aus diesen Befunden, die inzwischen von uns in weiteren Versuchsreihen bestätigt wurden, schließen, daß die Wirksamkeit der Apyrase der Rinder- und Schleienmuskulatur bei der Gefrierlagerung über 3 Monate keine Veränderungen erfährt, bzw. sind diese kleiner, als der Streubereich der Methode ist, so daß ihre Bestimmung nicht als Maßstab zur Ermittlung von Gefrieränderungen in der Fisch- und Warmblütermuskulatur geeignet ist.

### Diskussion der Ergebnisse.

Wie aus diesen Befunden ersichtlich ist, dürfte im Verlauf der Gefrierlagerung trotz beträchtlicher Denaturierung der fibrillären Eiweiße, deren Myosinkomponente zugleich ATP-ase-Aktivität besitzt, keine Veränderung der Apyraseaktivität der Muskulatur erfolgt sein.

Was die Myosin-ATP-ase angeht, wird dieses Ergebnis verständlich, wenn man die in der GYÖRGYSCHEN Schule gefundene Zusammensetzung des Myosinmoleküls aus 2 Komponenten berücksichtigt: dem L- und dem H-Meromyosin. Von beiden besitzt das H-Meromyosin die gesamte ATP-ase-Aktivität und praktisch alle freien SH-Gruppen des Myosin. Durch Gefrieren in Gegenwart von KCl wird das L-Meromyosin denaturiert, während das H-Meromyosin intakt bleibt<sup>1</sup>. Daß durch das Gefrieren der Fischmuskulatur die für die Myosin-ATP-ase wichtigen freien Thiolgruppen keine Veränderungen erfahren, dürfte auch aus einer Beobachtung von SNOW hervorgehen. Danach besitzt das aus gefrorenem Fisch extrahierte Myosin keine größere Anzahl freier Thiolgruppen als Myosin, das aus frischem Fisch extrahiert wurde<sup>2</sup>.

Neben der Myosin-ATP-ase kommt in der Muskulatur noch die Mg-aktivierbare ATP-ase von KIELLEY und MEYERHOF<sup>3</sup> vor, die nicht an Myosin oder Actomyosin gebunden ist. Der Anteil dieser ATP-ase an der gesamten ATP-ase-Aktivität im Kaninchenmuskel wird von B. A. und G. F. HUMPHREY<sup>4</sup> mit etwa 10% und von PERRY<sup>5</sup> mit mindestens 20—25% angegeben. In den indirekten Flugmuskeln von *Locusta migratoria* L. soll der Anteil der Myosin-ATP-ase

<sup>1</sup> SZENT-GYÖRGYI, A. G.: Arch. of Biochem. a. Biophysics **42**, 305 (1953).

<sup>2</sup> DUERR, J. D., u. W. J. DYER: Zit. S. 341, Anm. 1.

<sup>3</sup> KIELLEY, W. W., u. O. MEYERHOF: Zit. S. 343, Anm. 4.

<sup>4</sup> HUMPHREY, B. A., u. G. F. HUMPHREY: Biochem. J. **47**, 238 (1950).

<sup>5</sup> PERRY, S. C.: Biochim. et biophysica Acta (Amsterd.) **8**, 499 (1952).

an der Gesamtaktivität sogar nur zwischen 30 und 50%, im weniger aktiven Femurmuskel dagegen auch etwa 75% betragen<sup>1</sup>.

Die Beteiligung der Monoesterasen an der gesamten Apyraseaktivität der Muskulatur dürfte bei  $p_H$  7, wie auch von STEINBACH bei den  $p_H$ -Werten 7,8 und 9,4 gefunden<sup>2</sup>, gering sein, so daß sie in unserer Betrachtung vernachlässigt werden können. Unter den hier angegebenen Versuchsbedingungen ist also der Muskelbrei als ein ziemlich spezifisches Apyrasesystem anzusehen, an dem in der Hauptsache zwei verschiedene ATP-asen beteiligt sind. Beide werden durch das Gefrieren bei verschiedenen Gefriergeschwindigkeiten und durch Gefrierlagerung bei verschiedenen Temperaturen unterhalb von  $-18^\circ\text{C}$  in ihrer Wirksamkeit kaum verändert; sonst wäre es wohl in dem von uns gemessenen summarischen Effekt zum Ausdruck gekommen. Die verhältnismäßig große Stabilität des Apyrasesystems gegen tiefe Temperaturen dürfte verständlich sein, wenn man bedenkt, daß es sich hier um ein im Reich der Metazoen weit verbreitetes Enzymsystem handelt, dessen Stabilität Gefriertemperaturen gegenüber Vorbedingung dafür ist, daß manche Angehörigen speziell aus dem Stamm der Arthropoden Temperaturen weit unter  $0^\circ\text{C}$ , ohne Schaden zu nehmen, überstehen.

#### Zusammenfassung.

Aus Muskelbrei von *Gastrocnemius*-Muskulatur des Rindes und Seitenrumpfmuskulatur der Schleie wurden 1 g-Proben bei  $-18^\circ\text{C}$  in Luft,  $-76^\circ\text{C}$  im Trockeneis-Methanolbad und  $-190^\circ\text{C}$  in flüssiger Luft eingefroren. Die bei  $-18^\circ\text{C}$  gefrorenen Proben wurden bei dieser Temperatur mehrere Monate gelagert. Schleienmuskulatur wurde außerdem bei  $-5^\circ\text{C}$  in Luft eingefroren und bei im Mittel  $-4^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Messung der Adenosintriphosphatspaltung durch so behandelte Muskulatur ergab, daß weder die Gefriergeschwindigkeit noch die Gefrierlagerung bei  $-18^\circ\text{C}$  über die maximal geprüften Zeiträume von 94 Tagen bei Schleienmuskulatur und 189 Tagen bei Rindermuskulatur merkliche Veränderungen der Apyraseaktivität hervorrufen. Die bei  $-4^\circ\text{C}$  gelagerte Fischmuskulatur zeigte nach etwa 1 Monat ein Absinken der Apyraseaktivität, was auf bakteriell bedingte Eiweiß- oder Fettveränderungen zurückgeführt wird, aber nicht auf durch das Gefrieren hervorgerufene Denaturierungsvorgänge an der Myosinfraktion. Die beschriebene Methode ist als Test für Gefrierveränderungen der Muskulatur nicht geeignet, wird aber für weitere Untersuchungen an dem Apyrasesystem der Muskulatur von Nutzen sein.

<sup>1</sup> GILMOUR, D., u. J. H. CALABY: *Enzymologia* (Den Haag) 16, 23 (1953).

<sup>2</sup> STEINBACH, H. B.: *Zit. S. 344, Anm. 1.*