

Zur Frage der künstlichen Fleischreifung mit papainhaltigen Präparaten

Von

W. PARTMANN

Mitteilung aus der Bundesforschungsanstalt für Lebensmittelfrischhaltung, Karlsruhe

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. April 1955)

Einleitung

An anderer Stelle haben wir wahrscheinlich gemacht, daß der unter wesentlicher Beteiligung der Proteine Actin und Myosin wirkende kontraktile Mechanismus der Muskulatur gegen normal vorkommende postmortale Veränderungen autolytischer und bakterieller Art eine unerwartet hohe Stabilität aufweist. Als Kennzeichen dieser Stabilität war das Kontraktionsvermögen auf Adenosintriphosphat(ATP)-Zusatz gewählt worden¹. Die früheren Beobachtungen hatten schon erkennen lassen, daß offenbar ein Zusammenhang zwischen der Kontraktionsfähigkeit und der Erhaltung der Feinstruktur im Muskel besteht.

Damit erscheint die benutzte Methode geeignet, die Einwirkung von Fermenten proteolytischer Art auf die Muskulatur post mortem zu studieren. Ganz besondere Beachtung verdienen in diesem Zusammenhang Fermente aus der Gruppe der Papaine, die als Mittel zur künstlichen Fleischreifung benutzt werden. Abgesehen von der praktischen Bedeutung sind diese Fermente pflanzlichen Ursprungs für den angeschnittenen Fragenkomplex besonders interessant, weil sie natives Kollagen nicht angreifen², infolgedessen auch die Kollagenfasern des Bindegewebes durch Papain nicht abgebaut werden sollten.

Mit dieser Untersuchung ist beabsichtigt, die Frage zu klären, welche Beziehungen zwischen dem fortschreitenden künstlichen Reifungsvorgang nach Zusatz eines Papainpräparates zum frischen Rindermuskel und der Feinstruktur und Kontraktionsfähigkeit der Muskelfasern bestehen. Außerdem sollte die strittige Frage beantwortet werden, ob die Zartheit des künstlich gereiften Fleisches durch Veränderungen des Bindegewebes oder der Muskelfasern erfolgt.

Methode

Enzympräparat

Als Enzymmaterial wurde das für die künstliche Fleischreifung verwandte „Ingelheimer Zartsalz“ der Fa. C. H. Boehringer Sohn (Ingelheim a. Rhein) benutzt³. Es kam in Konzentrationen von 1 und 2% (bezogen auf das Muskelgewicht) zur Anwendung.

¹ PARTMANN, W.: Naturwiss. 42, 161 (1955).

² GRASSMANN, W., J. JANICKI u. F. SCHNEIDER: STIASNY-Festschrift S. 74, Darmstadt 1937.

³ Proben des Zartsalzes wurden uns freundlicherweise von der Lieferfirma kostenlos zur Verfügung gestellt, wofür ihr an dieser Stelle gedankt sei.

Reifungsbehandlung der Muskelproben

Von Rindern, die einen Tag bei + 2° C abgehangen worden waren, wurde der *Musculus gastrocnemius* entnommen und von Sehnen und Bindegewebe so gut wie möglich befreit. Zur Herstellung einer größeren Durchschnittsprobe wurde das bindegewebsarme Muskelfleisch 3 mal durch den Fleischwolf getrieben. Davon wurden 5 g-Proben mit jeweils 50 oder 100 mg „Ingelheimer-Zartsalz“ innig gemischt und bei Temperaturen zwischen 21 und 22° C verschieden lange Zeiten (15 min bis zu 24 Std.) in der feuchten Kammer reifen gelassen. Für Rindsrouladen wird von der Lieferfirma bei einer ~ 1%igen Konzentration des Zartsalzes eine Einwirkungszeit von 30—50 min angegeben. Die Kontrollprobe erhielt bei sonst gleicher Vor- und Nachbehandlung keinen Zusatz des Enzympräparates.

3 g der gereiften Muskel- oder der Kontrollprobe wurden in 18 ml 0,16 m-KCl-Lösung im allgemeinen 15 sec mit dem Homogenisator der Fa. Bühler (Tübingen) homogenisiert. Das Homogenat wurde im Verhältnis 1:20 oder 1:50 mit 0,16 m-KCl-Lösung verdünnt. Ein Tropfen der Suspension wurde auf einen Hohlsliff-Objektträger aufgebracht und die zu messenden Faserbruchstücke im Blickfeld des Phasenkontrast-Mikroskopes scharf eingestellt. Das ATP-Na₄-Salz der Fa. Waldhof wurde in fester Form zugegeben. Hierdurch wird erreicht, daß selbst kleine aus wenigen oder nur einer Fibrille bestehende Faserfragmente ihre Lage im Blickfeld behalten. Der Beginn der ATP-Einwirkung kann sehr gut an dem Erscheinen der bei seiner Auflösung beginnenden Strömungswelle verfolgt werden, die kleinste Muskelpartikelchen mitreißt.

Längen- und Breitenmessung an Muskelfaserfragmenten

Veränderungen in der Länge und Breite der Muskelfragmente bei dem durch ATP bedingten Kontraktionsvorgang wurden mit Objekt- und Ocularmikrometer ausgemessen

Herstellung und Behandlung von nahezu muskelfaserfreien Bindegewebsproben

Ein Tag nach dem Schlachten wurden vom *Gastrocnemius* eines 9 Monate alten Stieres und im zweiten Fall einer ~ 5 Jahre alten Kuh lockeres Bindegewebe und Sehneteile vorsichtig präpariert, um die Verunreinigung durch angrenzende Muskelfasern gering zu halten. Gewichtsmäßig machten die Sehnen etwa 1/3 des präparierten Gesamtbindegewebes aus. Zur Verzerkleinerung und Herstellung einer Durchschnittsprobe wurde dieses Material dreimal durch den Fleischwolf getrieben. Proben des zähen und im Vergleich zum Muskelfaserbrei relativ trockenen Breies wurden mit „Ingelheimer-Zartsalz“ in Konzentrationen von 1 und 2% behandelt und nach 1, 4 und 24 Std. mit der 10-fachen Menge Wasser homogenisiert. Sinngemäß in der gleichen Weise wurde mit nahezu bindegewebsfreiem Muskelbrei der gleichen Tiere verfahren.

Bestimmung der freien Aminosäuren

Die Ermittlung des Gehaltes an freien Aminosäuren erfolgte nach der Methode von POPE und STEVENS¹, wobei das Kupfer der löslichen Kupferaminat mit Diäthylthiocarbamat colorimetrisch bestimmt wurde.

Ergebnisse

1. Strukturveränderungen und Kontraktionsvorgänge in den Muskelfaserfragmenten

Die Deutung der Ergebnisse wird dadurch etwas erschwert, daß schon in frischen Muskelfasern einer Probe relativ große Unterschiede in der Feinstruktur auftreten, z. B. Längs- und Querstreifung verschieden stark ausgeprägt sein können.

Diese Unterschiede des Ausgangsmaterials bleiben natürlich in allen Proben bestehen. Hinzu kommt aber ein möglicherweise eng hiermit zusammenhängender Effekt, daß bei fermentativen Angriffen auf die Muskelfasern einer Probe in bezug auf die Strukturerhaltung außerordentlich große Unterschiede beobachtet werden. Wir konnten darüber schon bei den durch Bakterientätigkeit bedingten histologischen Veränderungen berichten² und fanden es bei der Untersuchung von Veränderungen im Karpfenmuskelbrei nach langer Lagerung bei — 3,5° C und ebenfalls bei diesen Reifungsversuchen bestätigt.

Trotzdem ergibt sich doch ein verhältnismäßig klares Bild der Reifungsveränderungen:

¹ POPE, C. G., u. M. F. STEVENS: *Biochemic. J.* **33**, 1070 (1939).

² PARTMANN, W., u. N. MALTSCHESKY: *Diese Z.* **93**, 121 (1951).

Die bei einer Zartsalz-Konzentration von 1% bei verschiedenen Reifungszeiten durchgeführten Messungen sind in den Tab. 1 und 2 zusammengefaßt. Bei allen geprüften Reifungszeiten bis zu 3 Std. war im allgemeinen die Feinstruktur in den Muskelfaserfragmenten verhältnismäßig gut erhalten. In diesen Faserbruchstücken wurde bei ATP-Zusatz ein gutes Kontraktionsvermögen gefunden (Tab. 1 und 2).

Tabelle 1. Verkürzung von Faserfragmenten aus mit „Ingelheimer-Zartsalz“ (1%) künstlich gereiftem Rindermuskelbrei nach ATP-Zusatz

Einwirkungszeit des Reifungsmittels in min	Länge der Faserbruchstücke		Verkürzung der Ausgangslänge in %	Zeit seit Beginn der ATP-Einwirkung in sec
	vor	nach		
	ATP-Zugabe in			
	μ	μ		
0	665	475	29	20
0	437	209	52	30
0	380	152	60	25
15	285	95	67	—
15	380	171	55	20
15	475	190	60	20
30	475	114	76	30
30	513	171	67	25
30	475	152	68	65
45	532	133	75	28
45	323	76	76	24
45	92	23	75	15
90	665	190	71	25
90	39	7,7	80	10
180	418	133	68	60
180	85	23	73	—

Tabelle 2. Verkürzung und Verbreiterung von 2 Faserfragmenten aus mit „Ingelheimer-Zartsalz“ (1%; 2,5 Std.) künstlich gereiftem Rindermuskelbrei nach ATP-Zusatz

Material	Länge der Faserbruchstücke		Verkürzung der Ausgangslänge in %	Breite der Faserbruchstücke		Zunahme der Ausgangsbreite in %	Zeit seit Beginn der ATP-Einwirkung in sec
	vor	nach		vor	nach		
	ATP-Zugabe in			ATP-Zugabe in			
	μ	μ		μ	μ		
Faser Nr. 1		403	57		197	73	120
		288	69		220	93	240
	927	274	70	114	220	93	360
		235	75		220	93	540
Faser Nr. 2		167	66		152	54	120
	494	137	72	99	152	54	240
		129	74		159	61	360

Interessant ist, daß die Kontraktion gewöhnlich innerhalb 1 min ihren Maximalwert erreichte. Lediglich die beiden in Tab. 2 zusammengestellten Messungen an 2 Muskelfaserbruchstücken, die aus einem Präparat mit einer Reifungszeit von 2¹/₂ Std. stammen, beziehen sich auf eine wesentlich längere Kontraktionszeit. Wir wissen noch nicht, ob diese Unterschiede in den Kontraktionszeiten auf verschiedene innere Bedingungen des kontraktile Mechanismus oder auf die äußeren Bedingungen bei der Reaktion, z. B. Gesamtionenstärke oder ATP-Konzentration zurückzuführen

sind. Es ist jedoch wohl anzunehmen, daß wir hier den Kontraktionsvorgang im Zeitlupentempo ablaufen sahen. Eine Betrachtung der Werte in Tab. 2 lehrt, daß die Kontraktionsgeschwindigkeit im Verlauf der Kontraktion immer geringer wird und sich bei kurvenmäßiger Darstellung ein Verlauf ergibt, der an die ATP-Spaltung im Muskelbrei erinnert¹. Zu einer genaueren Analyse reichen die wenigen hier angegebenen Meßwerte, die mehr oder weniger als zufällig anzusehen sind, nicht aus. Die Daten zeigen, daß das Ausmaß der Kontraktion bei den größeren Reifungszeiten im Mittel nicht geringer ist als bei den kleineren Reifungszeiten oder bei der Kontrolle. Dagegen macht der Muskelbrei in dieser Zeit schon nach dem Aussehen und in seiner Konsistenz sehr starke Veränderungen durch. Sie äußern sich darin, daß der zunächst trockene und „krümelige“ Brei schon bald nach dem Durchmischen weich, pastenartig wird, sich leicht in dünne Schichten ausstreichen läßt und transparent und lackartig glänzend erscheint. Etwa 5 min nach Zugabe tritt eine deutliche Dunkel-färbung auf.

Mit zunehmender Reifungszeit haben wir auch bei dem künstlich gereiften Muskel eine weitgehendere Zerkleinerung bei dem in gleicher Weise durchgeführten Homogenisierungsprozeß festgestellt als im frischen Muskel. Daher wird gerade das Verhalten der kleinsten Muskelfaserfragmente, die aus wenigen oder nur einer Fibrille bestehen, bei den künstlich gereiften Stadien interessant. Wie Tab. 1 lehrt, ist auch die Verkürzung bei den weniger als 100 μ langen Bruchstücken mit über 70% der Ausgangslänge sogar wesentlich größer als dem Mittelwert der Verkürzung der größeren Fragmente entspricht. Noch eindrucksvoller ist die Erhaltung des kontraktiven Mechanismus kleinster Fibrillenbündel und Einzelfibrillen neben einem Faserbruchstück im Homogenat von 1 Std. gereiftem Muskelbrei aus den Abb. 1 und 2 zu entnehmen. Nach ATP-Zusatz haben sich die stäbchenförmigen Fibrillen zu nahezu kugelförmigen Gebilden zusammengezogen. Damit dürfte der mögliche Einwand hinfällig sein, daß wir bei den Messungen der Tab. 1 nur solche größeren Faserbruchstücke geprüft haben, die zufällig mit dem Reifungsmittel nicht in Berührung gekommen sind.

Bei längeren Einwirkungszeiten wurde dann eine immer deutlicher werdende Auflösung der Feinstruktur der Faserfragmente beobachtet. Die Anzahl der relativ kurzen an den Rändern häufig nicht scharf konturierten Bruchstücke war nach fünf-stündiger Einwirkung des Reifungsmittels deutlich größer als nach dreistündiger. Diese Faserteile hatten wohl stets eine unregelmäßig granuliert Feinstruktur, ähnlich der im angelsächsischen Schrifttum als „disintegrated“ bezeichneten, die nur in seltenen Fällen das alte Muster der Querstreifung verschwommen erkennen ließ. In diesen Fragmenten mit starker Zerstörung der Feinstruktur konnte keine oder zumindest keine nennenswerte Kontraktion beobachtet werden. Die Strukturen werden bei ATP-Zusatz optisch leerer. Zum Schluß hat man Mühe, sie überhaupt noch zu sehen. Offenbar finden Auflösungserscheinungen unter Zurücklassung eines Gerüsts statt. In den wenigen Muskelfaserbruchstücken mit gut erhaltener Feinstruktur erfolgt dagegen der Kontraktionsvorgang in normaler Weise.

Die besonders in den zuletzt untersuchten Stadien erhaltenen Beobachtungen erscheinen uns so wesentlich, daß wir die Reifungsprozesse und ihre Einwirkung auf den kontraktiven Mechanismus der Muskulatur bei Verwendung der doppelten Enzymkonzentration und wesentlich längerer Einwirkungszeit nochmals wiederholten.

Nach zweistündiger Reifungszeit führte auch in diesem Fall der Homogenisierungsprozeß zu einer weitgehenderen Zerkleinerung als bei Verwendung des frischen, unbehandelten Muskels. Immerhin war die Erhaltung der Feinstruktur in den

¹ PARTMANN, W.: Biochem. Z. 326, 260 (1955).

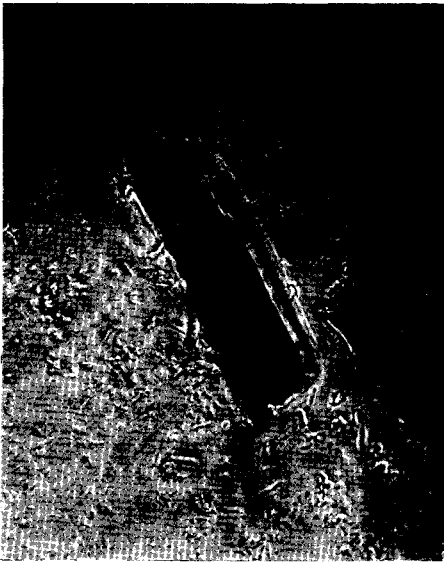


Abb. 1. Vor ATP-Zusatz

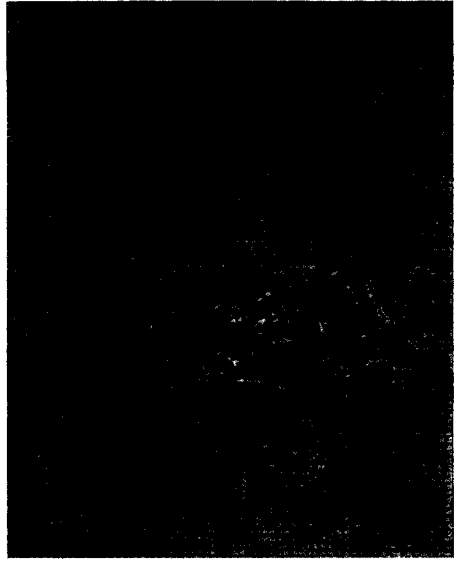


Abb. 2. Nach ATP-Einwirkung

Abb. 1. u. 2. Muskelbrei 1 Std. mit „Ingelheimer-Zartsalz“ (1%) behandelt, ein größeres Faserbruchstück

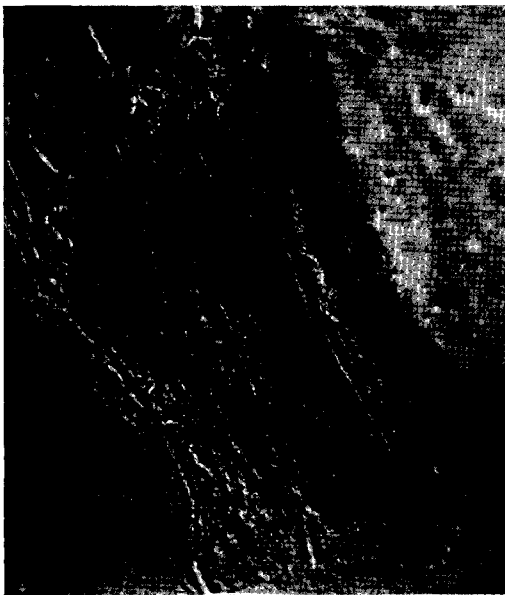


Abb. 3. Vor ATP-Zusatz

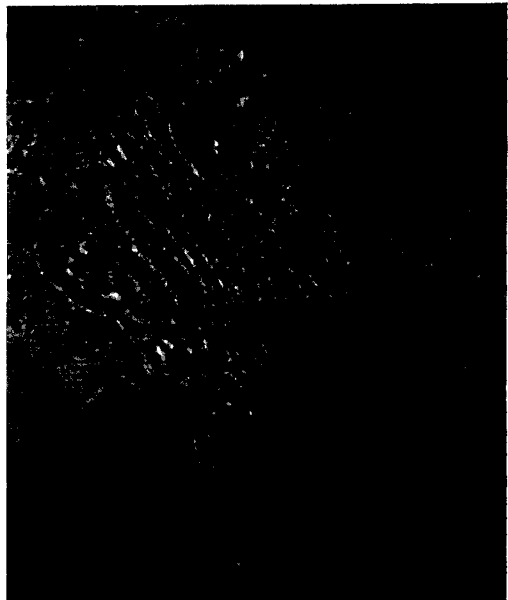


Abb. 4. Bei ATP-Einwirkung

Abb. 3 u. 4. Muskelbrei 24 Std. mit „Ingelheimer-Zartsalz“ 2% künstlich gereift, Muskelfragment mit drei Faserbruchstücken

Abb. 1—4. Faserbruchstücke von unter verschiedenen Bedingungen künstlich gereiftem Muskelbrei vom *Musculus gastrocnemius* des Rindes; alle Abb. Panphot, Phasenkontrast 165 mal

wenigen größeren Faserbruchstücken verhältnismäßig gut. Dementsprechend wurde auch die normale Kontraktionsfähigkeit gefunden. In einem Fall setzte sogar einige Sekunden nach dem Ende der Kontraktion um 74% eine deutliche Verlängerung ein, die mikroskopisch sichtbar mit einem eindrucksvoll in Erscheinung tretenden Strukturzerfall Hand in Hand ging. Nach vierstündiger Einwirkungszeit des Enzympräparates fiel es dann schon schwer, Faserbruchstücke von guter Feinstruktur zu finden. Die 4 dazugehörigen Messungen der Tab. 3 lassen vermuten, daß die Kontraktionsfähigkeit im allgemeinen schon wesentlich geringer geworden ist, was übereinstimmend mit dem mikroskopischen Bild auf einen intensiven proteolytischen Angriff auf die fibrilläre Proteinstruktur schließen läßt. In den Muskelfaserfragmenten mit deutlich „disintegrierter“ Struktur löst sich diese bei ATP-Einwirkung ohne nennenswerte Kontraktion mehr und mehr auf. Diese destruktiven Erscheinungen werden mit der Zeit immer ausgeprägter. Trotzdem gelang es uns nach langem Suchen, im 6 Std. gereiften Muskelbrei noch ein großes, gut konturiertes Faserfragment mit wohl ausgeprägter Feinstruktur zu finden, das sich auf ATP-Zusatz im Gegensatz zu den übrigen „disintegrierten“ Fasern im gleichen Gesichtsfeld in normaler Weise kontrahierte (Tab. 3).

Tabelle 3. Verkürzung und Verbreiterung von Faserfragmenten aus mit „Ingelheimer-Zartsalz“ (2%) künstlich gereiftem Rindermuskel nach ATP-Zusatz

Einwirkungszeit des Reifungsmittels in Std.	Länge der Faserbruchstücke		Verkürzung der Ausgangslänge in %	Breite der Faserbruchstücke		Zunahme der Ausgangsbreite in %	Zeit seit Beginn der ATP-Einwirkung in sec
	vor	nach		vor	nach		
	ATP-Zugabe in			ATP-Zugabe in			
	μ	μ		μ	μ		
0	579	318	45	94	131	39	48
0	304	205	33	38	61	61	40
0	61	19	69	7,6	15,2	100	55
0	46	15	67	1,5	7,6	407	40
0	76	24	68	3,8	8,3	119	40
0	280	150	46	70	70	—	—
1	630	200	68	95	170	79	75
1	310	210	32	110	160	45	75
2	329	84	75	68	129	90	50
4	304	220	28	—	—	—	30
4	288	213	26	121	121	—	40
4	430	94	78	75	131	75	70
4	410	281	31	129	167	29	75
6	380	120	68	70	100	43	—

Nach einer Einwirkungszeit des Enzympräparates von 24 Std. war die Anzahl der größeren Faserbruchstücke noch mehr zurückgegangen. Fibrillenbündel mit gut ausgeprägter Querstreifung wurden nicht mehr gefunden. Mikroskopisch sind — wahrscheinlich von dem Strukturzustand der frischen Muskelfaser abhängig — 2 Haupttypen deutlicher Feinstrukturzerstörung zu sehen. Bei dem einen, der auf frische Muskelfasern mit gut ausgeprägter Querstreifung zurückzuführen ist, werden diese als „disintegration“ bezeichneten Veränderungen sichtbar. Beim anderen sehr viel selteneren Typus, der vermutlich bei Muskelfasern, in denen im frischen Zustand nur die Längsfibrillierung zu sehen ist, auftritt, bleibt diese noch verhältnismäßig lange erhalten. Man sieht deutlich, daß die „Kittsubstanz“ des Sarcoplasmas schon herausgelöst ist und daß auch die stabileren aus Actomyosin bestehenden Fibrillen schon

nicht mehr einwandfrei sind. In beiden Fällen sind aber nach ATP-Zusatz deutlich übereinstimmende Vorgänge zu beobachten: Die Struktur wird immer unschärfer und durchsichtiger. Es bleibt nur ein Gerüst übrig, dessen Sichtbarmachung schwer gelingt. Die zur Auflösung der disintegrierten Struktur führenden Vorgänge werden in den Abb. 3 und 4 deutlich, die von einem aus 3 Faserbruchstücken bestehenden, 24 Std. gereiften Muskelfragment gemacht wurden. Bei ATP-Einwirkung strömen Bestandteile des Faserinneren an den abgebrochenen Enden unter allmählicher Auflösung nach außen. Wir vermuten, damit ein Modell für Plasmaströmungen innerhalb lebender Zellen gefunden zu haben, also für Bewegungsvorgänge, die nicht an eine Kontraktion gebunden sind. So sehr sich diese beiden Bewegungstypen in ihrer äußeren, durch die Eigenart der beteiligten Proteine bedingten Erscheinung unterscheiden, so große Übereinstimmungen mögen in dem ihnen zugrundeliegenden Mechanismus bestehen.

Zusammenfassend kann somit gesagt werden, daß sich auch bei den Reifungsvorgängen mit papainhaltigen Fermentpräparaten die fibrillären Proteine der Muskelfasern als relativ stabil erweisen. Bei mehrstündiger Einwirkung werden sie unter unseren Bedingungen aber schließlich doch angegriffen, was in Zerstörungen der Feinstruktur und im Nachlassen und schließlich im Verlust der Kontraktionsfähigkeit bei ATP-Zusatz zum Ausdruck kommt.

Es ist jedoch zu betonen, daß dieser künstliche Reifungsvorgang über mehrere Stunden mit einer Intensität abläuft, wie er bei der natürlichen Reifung nicht auftritt. Bei den autolytischen Veränderungen wird man derartige Konsistenz- und Feinstrukturveränderungen, wie sie hier nach einer Einwirkungszeit von mehr als 1 Std. beobachtet wurden, nicht feststellen. Dieses müßte auch im kommenden Abschnitt an der Zunahme der freien Aminosäuren zu erkennen sein. Außerdem ist noch die Frage zu beantworten, ob die Veränderungen bei der künstlichen Fleischreifung mit papainhaltigen Enzymen nur an den Muskelfasern stattfinden oder ob auch das Bindegewebe daran beteiligt ist.

2. Die Beteiligung des Bindegewebes an den Reifungsveränderungen

Wie wir schon weiter oben erwähnten, gilt als gesichert, daß Papaine die Kollagenfasern des Bindegewebes nicht angreifen. Es wäre daher durchaus möglich, daß unser Enzympräparat die künstliche Reifung lediglich auf Kosten der Muskelfasern durchführt. Dafür spricht einerseits der Befund, daß auch bei unseren längsten Reifungszeiten von 24 Std. bei einer Zertsalz-Konzentration von 2% und 21° C noch sehr große, makroskopisch sichtbare Bindegewebsstücke in dem Homogenat vorhanden waren.

Zu einem klareren Ergebnis müßte man gelangen, wenn man die Reifungsveränderungen im bindegewebsarmen Muskelbrei und im möglichst muskelfaserfreien Brei aus Bindegewebe verfolgt.

Schon beim Durchmischen des Bindegewebes wird deutlich, daß der zu Beginn sehr zähe und trockene Brei mit zunehmender Reifungszeit immer weicher und plastischer wird. Auch beim Homogenisieren fällt auf, daß der zunächst im sehnhaltigen Bindegewebe nur mit großer Mühe durchführbare Homogenisierungsprozeß mit zunehmender Reifungsdauer immer besser und müheloser gelingt. Dabei sind allerdings nach langen Reifungszeiten immer noch recht große Bindegewebssteilchen im Homogenat festzustellen. Daß dieser bei +21° C durchgeführte künstliche Reifungsprozeß sowohl die angreifbaren Proteine des Bindegewebes wie auch die der Muskelfasern betrifft, darf mit großer Wahrscheinlichkeit aus der intensiven

Tabelle 4. Zunahme der freien Aminosäuren bei der künstlichen Reifung von Gewebestandteilen der Rindermuskulatur mit „Ingelheimer-Zaritsalz“ bei einer Temperatur von 21° C

Material	Gehalt an Amino-N nach							
	1 Tag natürlicher Reifung bei +4° C in mg/100 g		1 Std.		4 Std.		24 Std.	
	künstlicher Reifung bei einer Zaritsalzkonzentration von							
	1% in mg/100 g	2% in mg/100 g	1% in mg/100 g	2% in mg/100 g	1% in mg/100 g	2% in mg/100 g	1% in mg/100 g	2% in mg/100 g
Bindegewebe mit wenig Muskelfasern verunreinigt	26,8	48,3	53,4	83,3	62,2	105,5		
Bindegewebsarme Muskulatur	29,4	42,2	44,7	68,1	64,0	113,3		
	63,8	88,0	99,0	128,6	134,2	197,0		
	61,6	89,1	99,0	112,2	154,0	204,6		

und bei beiden Gewebetypen etwa in gleichem Maße erfolgten Zunahme der freien Aminosäuren (Tab. 4) geschlossen werden.

Es ist wohl unwahrscheinlich, daß die Zunahme der freien Aminosäuren in unseren Bindegewebsansätzen zu einem wesentlichen Teil auf die geringen Reste von darin vorhandenen Muskelfasern zurückzuführen ist.

Wir möchten aus diesen Versuchsergebnissen schließen, daß bei dem Reifungsprozeß Proteine von Muskelfasern und Bindegewebe betroffen werden.

Diskussion

Theoretisch ist von den erhaltenen Befunden von besonderem Interesse, daß bei weitgehender Zerstörung der Muskelfeinstruktur durch die proteolytische Aktivität unseres Fermentpräparates bei ATP-Zusatz eine Auflösung der von den fibrillären Muskelproteinen gebildeten Reststruktur erfolgt und lediglich ein optisch kaum noch in Erscheinung tretendes Gerüst übrigbleibt. Wir möchten annehmen, daß nach genügend intensiver Einwirkung des Reifungsmittels die Myosinfilamente und eventuell auch andere diese begleitende und noch nicht identifizierte Eiweißstoffe¹ durch den ATP-Zusatz leicht herausgelöst werden können. Bekanntlich werden die Actomyosinfilamente durch ATP zur Dissoziation gebracht. Die Erhöhung der Ionenstärke durch das ATP selber scheint dann nach der „Reifung“ eine leichte und hier in Erscheinung tretende Extrahierbarkeit des „Myosin“ zur Folge zu haben, während das Actin als „Gerüst“ zurückbleibt. Diese Deutung stimmt mit den Vorstellungen von HANSON und HUXLEY über Veränderungen der Feinstruktur von Muskelfasern nach Glycerin- bzw. Trypsinbehandlung überein².

Wie weiterhin gezeigt wurde, wird auch das Bindegewebe von den Reifungsveränderungen betroffen, obwohl das native Kollagen von Papain nicht angegriffen wird. Das ist verständlich, wenn man bedenkt, daß das Bindegewebe der Muskulatur in seiner Zusammensetzung sehr heterogen ist und z. B. allein bei Berücksichtigung

¹ SZENT-GYÖRGYI, A. G., D. MAZIA u. A. SZENT-GYÖRGYI: Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) **16**, 339 (1955).

² HANSON, J., u. H. E. HUXLEY: Nature (London) **172**, 530 (1953).

der Fasern neben den Kollagenfasern davon in chemischer Hinsicht verschiedene elastische und Reticulinfasern enthält. Es ist also auch aus theoretischen Gründen anzunehmen, daß das Bindegewebe den Papainen eine ganze Reihe von Angriffspunkten liefert. Ferner ergab eine Rückfrage bei der Lieferfirma, daß das Zartsalz an Fermenten neben Papainen noch einen kleinen Anteil an anderen Enzymen pflanzlichen Ursprungs enthält. Es wäre also auch denkbar, daß von dieser Seite her ein proteolytischer Angriff auf die Kollagenfasern erfolgen könnte. Weitere Untersuchungen mit reinen Papainen sind in Angriff genommen.

Möglicherweise werden während der natürlichen Fleischreifung — abgesehen von der unvergleichlich viel geringeren Intensität dieses Prozesses — die verschiedenen Gewebekomponenten in ganz anderer Weise verändert. Das ist deshalb sehr wahrscheinlich, weil hierbei proteolytische Fermente aus der Gruppe der Kathepsine mit anderen Substratansprüchen aktiv sind und die im Verlauf der postmortalen Glykolyse auftretende Säuerung offenbar sowohl bezüglich der Aktivität wie der Substratvorbereitung von großer Bedeutung ist.

Die hier angegebene Methode der Prüfung der Kontraktionsfähigkeit von Muskelfasern bei ATP-Zusatz ist geeignet, auch durch andere Eingriffe bedingte Einflüsse auf die fibrillären Muskelproteine zu verfolgen. Es ist beabsichtigt, mit ähnlicher Methodik die Vorgänge bei der natürlichen Fleischreifung zu prüfen und die umstrittene Frage zu klären, ob dabei das Bindegewebe oder die Muskelfasern oder beide Gewebearten verändert werden.

Zusammenfassung

Im Brei aus dem *Musculus gastrocnemius* des Rindes wurden die Veränderungen bei der künstlichen Reifung mit „Ingelheimer-Zartsalz“, das in Konzentrationen von 1 und 2% zur Anwendung kam, untersucht. Als Maß für diese Veränderungen wurden das Erhaltenbleiben der Kontraktionsfähigkeit der Muskelfibrillen auf Adenosintriphosphatzusatz, Veränderungen der Feinstruktur und die Zunahme der freien Aminosäuren im bindegewebsarmen Muskelbrei und im nahezu muskelfaserfreien Bindegewebsbrei gewählt.

Bei Reifungszeiten bis zu 1 Std. wurden wesentliche Veränderungen der Feinstruktur der Muskelfasern und ein Nachlassen der Kontraktionsfähigkeit nicht festgestellt. Bei weiter zunehmenden Reifungszeiten führte der auf diese folgende Homogenisierungsprozeß zu einer immer weitgehenderen Zerkleinerung. Die Feinstruktur der spärlicher werdenden größeren Faserbruchstücke wies bei längeren Reifungszeiten im allgemeinen starke Zerstörungen auf, die sich u. a. in einem Verlust der Querstreifung und der scharfen Konturen äußerten. Diese Veränderungen gingen Hand in Hand mit einem Nachlassen der Kontraktionsfähigkeit. An ihrer Stelle wurden schließlich bei ATP-Zusatz starke Auflösungserscheinungen an den Faserbruchstücken unter Zurücklassung eines vermutlich aus Actin bestehenden Gerüstwerkes beobachtet. Aus der Zunahme der Plastizität im künstlich gereiften Bindegewebsbrei und dem etwa im gleichen Maße wie im bindegewebsarmen Muskelbrei erfolgten Anstieg der freien Aminosäuren wird geschlossen, daß bei der künstlichen Fleischreifung mit vorwiegend Papaine enthaltenden Präparaten nicht nur die Proteine der Muskelfasern, sondern auch solche des Bindegewebes abgebaut werden.