

## Über die Hitzeinaktivierung des Apyrasesystems der Muskulatur

Von

G. NEMITZ und W. PARTMANN\*

*Mitteilung aus der Bundesforschungsanstalt für Lebensmittel/frischhaltung, Karlsruhe*

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. Juli 1958)

### *Einleitung*

In der biologischen Fachliteratur gibt es eine Reihe von Hinweisen dafür, daß sich manche lebenden Systeme tiefen und hohen Temperaturen gegenüber abweichend von der Norm als unerwartet widerstandsfähig erweisen. Viele Beobachtungen lassen

\* Frl. M. STROBEL und Herrn B. KLIEMANN sei für ihre gewissenhafte Mitarbeit bei der Durchführung der Messungen herzlich gedankt.

erkennen, daß derartige Resistenzanomalien mit einer Abnahme des Wassergehaltes oder einer Zunahme der Elektrolytkonzentration verbunden sind (Zusammenfassende Darstellung siehe bei PRECHT, CHRISTOPHERSEN und HENSEL<sup>1</sup>.) So ist z. B. bekannt, daß manche Tier- und Pflanzenarten bei lang anhaltenden Trockenzeiten Dauerformen bilden, die in vieler Hinsicht relativ unempfindlich sind und während der Ruhezeit einen außerordentlich geringen Stoffwechsel haben. So werden Bakteriensporen im allgemeinen im Gegensatz zu den vegetativen Formen erst bei Temperaturen über 100° C sicher abgetötet.

In den letzten Jahren hat man empirisch gefunden, daß bei der Gefriertrocknung vieler biologischer Objekte bei tiefen Temperaturen die langwierige und daher teure letzte Trocknungsphase wesentlich verkürzt werden kann, wenn das Gut während dieser Zeit vorsichtig erwärmt wird<sup>2</sup>.

Diese und andere Beobachtungen machen wahrscheinlich, daß bei schonendem Wasserentzug die Proteine oder zumindest gewisse Proteintypen bei kleinen Wassergehalten gegen irreversible Veränderungen durch hohe Temperaturen widerstandsfähiger werden und daher nicht so leicht denaturieren.

Eine saubere experimentelle Lösung des angeschnittenen Problems ist nicht nur für die Grundlagenforschung von beträchtlichem Interesse, sondern auch für die Lebensmitteltechnologie von Bedeutung. Lassen sich genauere Aussagen über den Zusammenhang zwischen Wärmeempfindlichkeit und Wassergehalt eines Produktes machen, wird sich ermitteln lassen, welche maximale Temperatur diesem Gut in den verschiedenen Phasen der Trocknung ohne schwerwiegende Veränderungen zumutbar ist.

Es schien uns daher lohnenswert, am Beispiel von normaler und gefriergetrockneter Fischmuskulatur ihre Hitzewiderstandsfähigkeit zu prüfen. Hierbei wurde das Apyrasesystem der weißen Seitenrumpfmuskulatur des Karpfens als Indicator für die Resistenz benutzt und seine Inaktivierung bei bestimmten Temperaturen in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit gemessen.

Bekanntlich erfolgt unter physiologischen  $p_H$ -Bedingungen die Adenosintriphosphat(ATP)-spaltung zu Adenosinmonophosphat im Fischmuskel (Apyrasewirksamkeit) bilanzmäßig in 2 Stufen. Die erste ist durch die Dephosphorylierung von ATP zu Adenosindiphosphat gekennzeichnet; sie wird vor allen Dingen durch die an das fibrilläre Protein Myosin gebundene und bisher von ihm nicht abtrennbare Myosinadenosintriphosphatase und zu etwa 10% durch die vermutlich in den Sarcosomen lokalisierte Mg-aktivierbare Adenosintriphosphatase von KIELLEY und MEYERHOF ermöglicht. In der zweiten Phase katalysiert die wasserlösliche Myokinase die Dismutation von Adenosindiphosphat in Adenosinmonophosphat und Adenosintriphosphat.

Es erschien uns sinnvoller, die Hitzeresistenz des Apyrasesystems im Muskelbrei zu prüfen als die Widerstandsfähigkeit der daran beteiligten isolierten reinen Fermente. Die bekannten, bisher über die Hitzeresistenz des Enzyms Myokinase erhaltenen Ergebnisse zeigen deutlich, daß unter den im frischen Muskel vorliegenden Bedingungen, vor allen Dingen durch die übrigen im Gewebsverband vorhandenen Eiweißkörper, eine Schutzwirkung unerwarteten Ausmaßes gegen höhere Temperaturen auftreten kann; da die Myokinase hierbei gegen hohe Temperaturen stabil ist und z. B. auch durch 20 min langes Kochen in 0,1 n-HCl nicht zerstört wird, ist anzunehmen, daß unsere Ergebnisse das Verhalten der übrigen Komponenten des Apyrasesystems gegen höhere Temperaturen und unter natürlichen Bedingungen erkennen lassen.

<sup>1</sup> PRECHT, H., J. CHRISTOPHERSEN u. H. HENSEL: Temperatur und Leben. 514 S. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.

<sup>2</sup> NORD, H.: Food Manufact. 27, 452 (1952). — NEUMANN, K.: Grundriß der Gefriertrocknung. 2. Aufl. Göttingen: Musterschmidt 1952.

## Methoden

### a) Messung der ATP-Spaltung

#### 1. Material

*Proben mit normalem Wassergehalt.* Da die Fischmuskulatur im Vergleich zur Säugetiermuskulatur gleichmäßiger zusammengesetzt ist und darin das Actomyosin sich mit etwa 72% an den gesamten Muskelproteinen beteiligt, ist sie für das Studium von äußeren Einflüssen auf die Apyrasewirksamkeit der quergestreiften Muskulatur besonders gut geeignet. Wir verwandten die weiße Seitenrumpfmuskulatur des frisch getöteten Karpfens. Gleich nach dem Ausblutlassen der Fische wurde der durch Myoglobin intensiv rot gefärbte *Musculus lateralis superficialis* mit dem Seitenliniennerv entfernt und die weiße Seitenrumpfmuskulatur sorgfältig präpariert. Die dreimal durch den Fleischwolf getriebene weiße Muskulatur wurde gut gemischt und in 2 Hälften geteilt. Von einer Partie wurden Breiproben von je 6 g in Reagenzgläser eingewogen, die am oberen Ende zugeschmolzen wurden. Dabei wurde eine Erwärmung des eingefüllten Muskelbreies über 25° C vermieden. Die Proben wurden zur Spaltung der noch vorhandenen und im Verlauf der Glykolyse nachgebildeten energiereichen Nucleosid-di- und triphosphate und des Kreatinphosphates 4 Std in einem Kühlschrank bei +4° C aufbewahrt und anschließend bei -24° C gelagert. Es stand damit über Monate ein Breimaterial mit gleichbleibender Apyraseaktivität zur Verfügung. Der Wassergehalt der von verschiedenen Karpfen stammenden Breiproben war unterschiedlich und betrug 70—80%.

*Bestimmung des Wassergehaltes.* Zur Bestimmung des Wassergehaltes wurden etwa 2,5 g Muskelbrei in dünner Schicht in einem Wägglas von großem Durchmesser 2 Std lang im Trockenschrank bei +80° C vorgetrocknet und dann im Vakuumtrockenschrank bei etwa 10—20 mm Hg und 80° C auf Gewichtskonstanz getrocknet, was etwa 4 Std in Anspruch nahm.

*Gefriergetrocknetes Material.* Ein anderer Teil des Muskelbreies wurde in runden Plexiglaschalen mit einem Durchmesser von ~ 50 mm bei einer Schichtdicke von ~ 3 mm auf Trockeneis gefroren. Die gefrorenen „Breitabletten“ ließen sich nach kurzem Eintauchen der Schalen in Wasser mühelos herausnehmen. Sie wurden gleich auf dünnen Drahtnetzen aus rostfreiem Stahl in der Gefriertrocknungsanlage<sup>1</sup> bei einem Vakuum zwischen  $10^{-1}$  und  $4 \cdot 10^{-2}$  mm Hg innerhalb von etwa 8 Std auf einen vorgegebenen Wassergehalt von 3,4% getrocknet. Die Temperatur des Gutes betrug zu Beginn der Trocknung etwa -40° C und stieg im Verlauf des Trocknungsprozesses auf +20° C an.

Es kam uns von Anfang an darauf an, eine größere Menge gefriergetrockneten Materials von ~ 3% Wassergehalt zu erhalten. Daher erwies es sich als wünschenswert, den Trocknungsvorgang kontinuierlich überwachen und zum richtigen Zeitpunkt abbrechen zu können.

Da die einzelnen Breitabletten geometrisch gleich und während der gemeinsamen Trocknung den gleichen Bedingungen (Vakuum und Umgebungstemperatur) ausgesetzt waren, wurde eine Tablette zur Kontrolle des Trocknungsverlaufes herangezogen. Zu diesem Zweck wurde im Rezipienten der Gefriertrocknungsanlage eine empfindliche Federwaage aufgestellt. An diese Waage wurde vor dem Trocknen eines der dünnen Edelstahlnetze mit der daraufliegenden gefrorenen Breitablette angehängt, während die Netze mit den übrigen Tabletten an ein feststehendes Gestell gehängt wurden. Durch die Messung des Ausschlages der Federwaage konnten zu jedem Zeitpunkt der Trocknung die Gewichtsabnahme der angehängten Tablette und daraus ihr momentaner mittlerer Wassergehalt berechnet werden. Der Gefriertrocknungsprozeß wurde abgebrochen, wenn der Wassergehalt einen Wert von etwa 3% erreicht hatte.

Der Fischmuskelbrei zeigte nach der Gefriertrocknung und unter geeigneten Versuchsbedingungen (0,16 m-KCl-Lösung und etwa  $5 \cdot 10^{-3}$  m-ATP-Zusatz) Kontraktilität. Die ATP-Spaltung betrug noch 85% der vor der Gefriertrocknung ermittelten Spaltung durch den Fischmuskelbrei. Die getrockneten „Breitabletten“ wurden im Mörser zerrieben. Das erhaltene Pulver wurde nach gründlichem Durchmischen in Portionen von ~ 0,7 g, die zum einmaligen Füllen der Erhitzungszelle ausreichen, in Reagenzgläser eingefüllt, die durch Gummistopfen verschlossen und bei -24° C im Exsiccator über Silica-Gel gelagert wurden. Die Lagerung bei tiefen Temperaturen erwies sich als notwendig, da sich die Experimente mit diesem Material über mehrere Monate erstreckten und in einer früheren Untersuchung festgestellt worden war, daß gefriergetrocknete Fischmuskulatur bei Lagertemperaturen über 0° C in Gegenwart von Luft schon nach 1 oder 2 Wochen Lagerung eine deutliche Abnahme der Apyraseaktivität zeigte. Daß der Luftsauerstoff wesentlich an diesen Veränderungen beteiligt ist, geht daraus hervor, daß

<sup>1</sup> Es handelte sich um eine modifizierte, in der Institutswerkstatt umgebaute G 02 der Firma Leybold, Köln.

bei den in Stickstoff aufbewahrten Proben, die unerwünschten, auch geruchlich wahrnehmbaren Veränderungen wesentlich langsamer auftraten<sup>1</sup>.

### Bestimmung des Wassergehaltes

Die Bestimmung des Wassergehaltes in der gefriergetrockneten Muskulatur erfolgte titrimetrisch nach KARL FISCHER, wobei die *dead-stop*-Methode angewendet wurde<sup>2</sup>. Zu diesem Zweck wurden jeweils 0,1 g gefriergetrocknete Muskulatur und als Lösungsmittel 10 ml Methanol bekannten Wassergehaltes verwendet.

## 2. Enzymsatz

Zur Ermittlung der Apyrasewirksamkeit von Karpfenmuskelbrei mit normalem Wassergehalt und gefriergetrocknetem Material nach Einwirkung höherer Temperaturen folgten wir im einzelnen der in einer früheren Veröffentlichung angegebenen Arbeitsvorschrift<sup>1</sup>. Der Enzymsatz enthielt infolgedessen im allgemeinen 0,5 g Muskulatur oder die äquivalente Menge an gefriergetrocknetem Material, 1 g Seesand, 25 ml Veronalpuffer  $p_H$  7 und 15 mg ATP-Na<sub>4</sub>-Salz (Reinheit > 80%). Die Reaktionszeit betrug 70 sec bei einer Temperatur von +20° C. Zur Bestimmung des anorganischen P wurde eine Modifikation der Methode von BERENBLUM und CHAIN benutzt<sup>3</sup>. Jeder der in den Abb. 2 und 4 dargestellten Punkte stellt einen Mittelwert aus mindestens 4 Einzelbestimmungen dar.

## b) Erwärmung der Proben

### 1. Ermittlung der Hitzeresistenz

Zur Ermittlung der Hitzeresistenz der Muskulatur wurde diese verschieden lang auf bestimmte Temperaturen erhitzt. Hierbei kam es besonders darauf an, daß die Erwärmung möglichst schnell erfolgte, die gewünschte Temperatur genau konstant gehalten wurde und die Muskulatur nach Beendigung der Temperatureinwirkung schnell wieder abgekühlt wurde. Dies wurde durch Verwendung einer Erhitzungszelle nach Abb. 1 gewährleistet. Schale (1') und Deckel (1) bestehen aus verchromtem Messing. Das Verschließen erfolgt durch 6 Flügelschrauben (2). Durch ein kalibriertes Röhrchen (3) kann ein Thermoelement (4) eingeschoben werden. Dieses dient zum Messen des Temperaturverlaufes im Zentrum der eingefüllten Muskulatur (5). Die Schichtdicke der Muskulatur in der Zelle beträgt 1,5 mm.

Die gefüllte geschlossene Zelle wurde vor dem Erhitzen in ein Eisbad gebracht. Die Erhitzung erfolgte durch Eintauchen der Zelle in das Bad eines Höppler-Thermostaten. Das Zentrum der Muskelschicht innerhalb der Zelle erreichte etwa 15–20 sec nach dem Eintauchen die Temperatur des Thermostaten. Die Abkühlung erfolgte wieder im Eisbad. Auch für das Abkühlen auf etwa 0° C waren etwa 10–20 sec erforderlich. Die angegebenen Erhitzungszeiten zählen vom Zeitpunkt des Eintauchens der Zelle in das temperierte Bad bis zum Beginn der Abkühlung im Eisbad.

### 2. Bestimmung der Temperaturleitzahl

Die Bestimmung der Temperaturleitzahlen erfolgte durch mathematische Auswertung eines Erwärmungsversuches. Hierfür wurde ein zylindrisches Gefäß mit einer Bezugssubstanz von bekannter Temperaturleitzahl gefüllt. Nachdem das gefüllte Gefäß auf eine konstante Temperatur gebracht worden war, wurde es einer konstanten höheren Temperatur ausgesetzt und die Geschwindigkeit des Temperaturanstiegs im räumlichen Mittelpunkt des Gefäßes bestimmt. Nach dieser Eichmessung wurde das Gefäß mit den zu untersuchenden Substanzen, d. h. mit Muskulatur von normalem Wassergehalt bzw. gefriergetrockneter Muskulatur gefüllt. Für diese wurden die Geschwindigkeiten des Temperaturanstiegs im Zentrum ermittelt. Aus den gemessenen Werten ließen sich die Temperaturleitzahlen errechnen. Eine ausführliche Darstellung dieser Methode erfolgt an anderer Stelle.

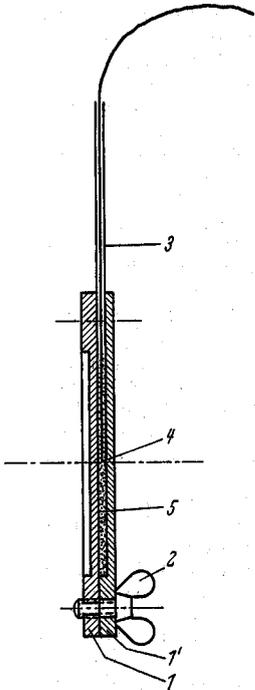


Abb. 1. Erhitzungszelle (Erläuterung vgl. Text)

<sup>1</sup> PARTMANN, W., u. A. BERGER: Diese Z. 107, 327 (1958).

<sup>2</sup> NEMITZ, G.: Chemiker-Ztg. 82, 222 (1958).

<sup>3</sup> BERENBLUM, J., u. E. CHAIN: Biochem. J. 32, 295 (1938).

Ergebnisse

a) Muskulatur mit normalem Wassergehalt

Die bei der Erhitzung von weißer Seitenrumpfmuskulatur mit normalem Wassergehalt erhaltenen Meßpunkte für die Inaktivierung des Apyrasesystems in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit bei verschiedenen Temperaturen sind in Abb. 2 dargestellt. Als Maß für die Inaktivierung des Apyrasesystems wurde die ATP-Spaltung zu Adenosinmonophosphat auf die unter gewählten Standardbedingungen ohne Erhitzung stattfindende Spaltung bezogen und in % derselben ausgedrückt. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Hitzeinaktivierung des Apyrasesystems dem Schema einer Reaktion 1. Ordnung folgt. In der Hitzeresistenz des Apyrasesystems der weißen Muskulatur scheinen bei Karpfen keine großen Unterschiede zu bestehen,

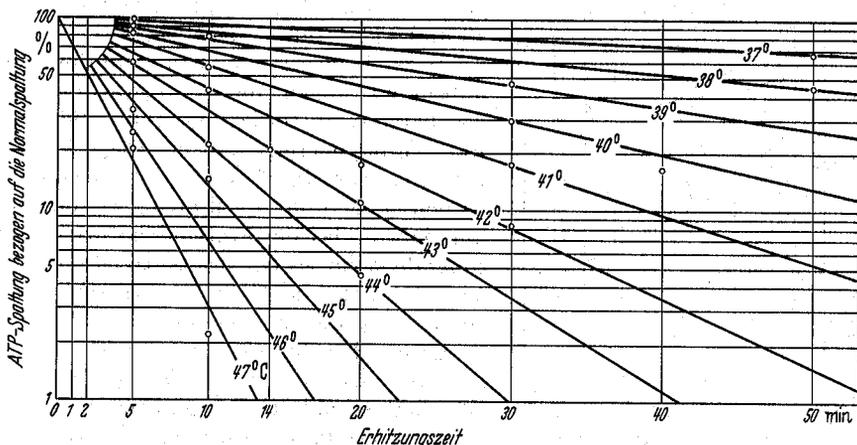


Abb. 2. Inaktivierung des Apyrasesystems der weißen Seitenrumpfmuskulatur des Karpfens mit normalem Wassergehalt bei bestimmten Temperaturen in Abhängigkeit von der Erhitzungszeit

da die in Abb. 2 dargestellten Meßpunkte mit dem Muskelbrei von drei verschiedenen Tieren erhalten wurden. Es ist weiterhin zu erkennen, daß die Hitzeinaktivierung schon bei Temperaturen unter 40° C beginnt, daß also eine oder mehrere Komponenten des Apyrasesystems außerordentlich wärmeempfindlich sein müssen.

In Abb. 3 sind die aus den Hitzeinaktivierungskurven berechneten Halbwertszeiten, Temperaturquotienten und Aktivierungsenergien dargestellt.

Die Temperaturquotienten,  $Q_{10}$ -Werte, wurden nach der Formel von KANTZ<sup>1</sup> berechnet:

$$\log Q_{10} = \frac{K_1 + 10}{K_1} = \frac{10 (\log K_2 - \log K_1)}{t_2 - t_1}$$

Darin bedeuten  $K_1$  und  $K_2$  die Reaktionsgeschwindigkeiten bei den Temperaturen  $t_1$  und  $t_2$  und  $Q_{10}$  den Temperaturquotienten für einen Temperaturbereich von 10° C. Die Geschwindigkeitskonstanten  $K_2$  und  $K_1$  wurden nach der Formel für die Geschwindigkeitskonstanten bei der monomolekularen Reaktion berechnet  $K = -\frac{2,3}{z} \cdot \log \frac{C_z}{C_0}$  in der  $z$  die Reaktionszeit,  $C_0$  die Anfangskonzentration und  $C_z$  die Endkonzentration am Ende der Zeit  $z$  bedeuten. Durch Einführung der Halbwertszeit  $z_{0,5}$ , bei der  $\frac{C_z}{C_0} = 0,5$  ist, ergibt sich

$$K = \frac{0,693}{z_{0,5}}$$

<sup>1</sup> KANTZ, A.: Biol. Zbl. 27, 11 (1907).

Zur Berechnung der scheinbaren Aktivierungsenergie aus zwei Beobachtungspunkten wurde die Gleichung von ARRHENIUS verwendet:

$$E_a = 2,303 \cdot R \cdot \frac{T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \cdot \log \frac{K_2}{K_1}$$

Darin bedeuten  $R$  die Gaskonstante = 1,987 cal/mol.grad und  $T_1$  und  $T_2$  die beiden absoluten Reaktionstemperaturen mit den zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten  $K_1$  und  $K_2$ .

Wie Abb. 3 erkennen läßt, nehmen nicht nur die  $Q_{10}$ -Werte, sondern auch die Werte für die scheinbare Aktivierungsenergie mit steigender Temperatur ab. Ferner fällt auf, daß die  $Q_{10}$ -Werte speziell zwischen 38 und 42° C ungewöhnlich hoch sind, z. B. zwischen 38 und 39° C den Wert von über 130 erreichen. Entsprechend sind auch die Beträge für die scheinbare Aktivierungsenergie mit über 200 kcal/mol im Bereich zwischen 38 und 39° C und 110 kcal/mol zwischen 46 und 47° C außerordentlich groß.

Diese in der klassischen Reaktionskinetik unbekannt hohen und infolgedessen schwer deutbaren Werte für Temperaturquotienten und Aktivierungsenergie sind wichtige kinetische Kriterien für die Eiweißdenaturierung. Insbesondere EYRING u. Mitarb.<sup>1</sup> weisen darauf hin, daß die bei der Proteindenaturierung auftretende hohe scheinbare Aktivierungsenergie nach der Arrhenius-Gleichung als Aktivierungswärme aufgefaßt werden kann.

Unsere Ergebnisse lassen erkennen, daß es sich bei dem bereits im Temperaturbereich zwischen 35 und 40° C beginnenden Inaktivierungsprozeß um einen echten Denaturierungsvorgang handelt. Es ist anzunehmen, daß der hitzeempfindliche Faktor des Apyrasesystems das Myosin ist, das zugleich den Hauptteil der im weißen Seitenrumpfmuskel vorhandenen Adenosintriphosphatase-Aktivität liefert. Die

in den Sarcosomen lokalisierte ATPase von KIELLEY und MEYERHOF macht nur einen Bruchteil der gesamten ATPase-Aktivität des Karpfenmuskels aus. Die außerdem am Apyrasesystem beteiligte Myokinase ist unter natürlichen Bedingungen gegen weit höhere Temperaturen stabil<sup>2</sup>.

Die an reinen Myosinlösungen gewonnenen Ergebnisse über die Hitzeempfindlichkeit dieses Proteins sind nur mit Vorbehalt auf sein Verhalten gegen höhere Temperaturen in situ zu übertragen, wie gerade das Beispiel der Myokinase lehrt. Trotz dieser Einschränkung weisen die Ergebnisse von LOCKER in die gleiche Richtung. Nach diesen Untersuchungen erfolgte mit anderen Methoden an reinen Myosinlösungen innerhalb von 30 min bei 40° C noch keine Coagulation, jedoch eine Viscositätszunahme der Lösung. Bei 44° C trat die Coagulation in 8 min auf<sup>3</sup>. Wenn man auch berücksichtigt, daß Eiweißkonzentration und Ionenmilieu die Hitzeresistenz

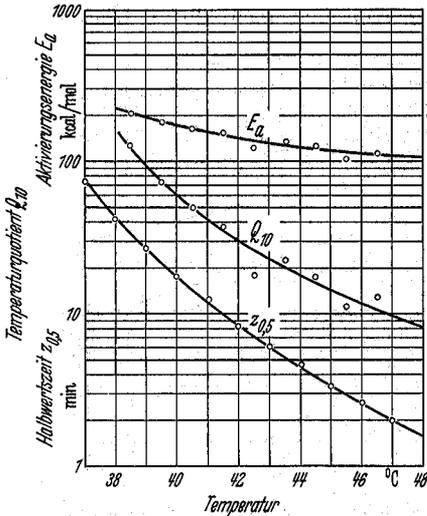


Abb. 3. Aktivierungsenergie  $E_a$ , Temperaturquotient  $Q_{10}$  und Halbwertszeit  $z_{0.5}$  für den Hitzeinaktivierungsprozeß des Apyrasesystems der weißen Seitenrumpfmuskulatur des Karpfens in Abhängigkeit von der Erhitzungstemperatur

<sup>1</sup> GLASSTONE, S., K. J. LAIDLER u. E. H. EYRING: The Theory of Rate Processes. New York: McGraw Hill 1941. — EYRING, H., u. A. E. STEARN: Chem. Rev. 24, 253 (1939).

<sup>2</sup> COLOWICK, S. P., u. H. M. KALCKAR: J. biol. Chem. 148, 117 (1943). — CALLAGHAN, O. H.: Biochem. J. 67, 651 (1957).

<sup>3</sup> LOCKER, R. H.: Biochim. biophys. Acta 20, 514 (1956).

von Eiweißen mitbestimmen können, so bestärken uns diese unseren eigenen Ergebnissen nahekommenden Befunde doch in der Annahme, daß Myosin der temperaturlabile Faktor des Apyrasesystems der Karpfenmuskulatur ist.

b) Gefriergetrocknete Muskulatur

Beim Erhitzen der auf 3,4% Wasser gefriergetrockneten Muskulatur fiel auf, daß bei Temperaturen über 70° C eine mit steigender Erhitzungszeit zunehmende Verfärbung des Gutes eintrat. Die zunächst weiße mit einem Stich ins Sandfarbene gehende Färbung änderte sich stärker nach gelblich (z. B. 20 min bei 80° C erhitzt) und

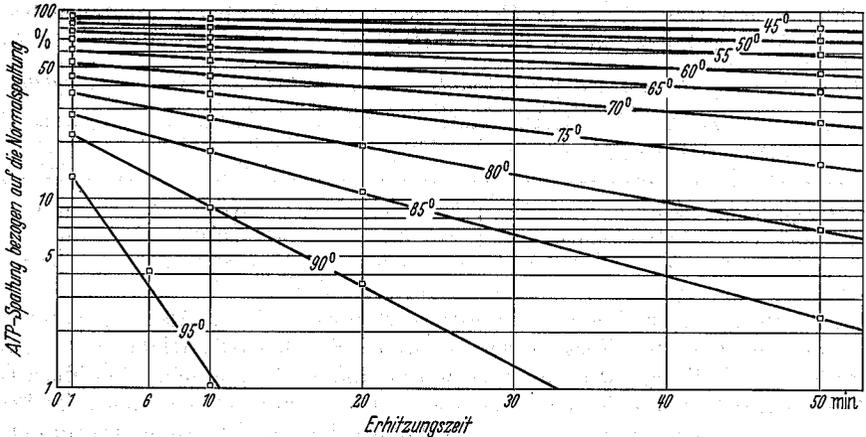


Abb. 4. Inaktivierung des Apyrasesystems der auf 3,4% Wassergehalt gefriergetrockneten weißen Seitenrumpfmuskulatur des Karpfens bei bestimmten Temperaturen in Abhängigkeit von der Erhitzungszeit

schließlich ins Bräunliche (z. B. 50 min bei 95° C erhitzt). Bei diesen Bräunungserscheinungen dürfte es sich in erster Linie um Reaktionen zwischen freien reduzierenden Zuckern mit Proteinen und mit Bestandteilen der Nichtproteinfraktion handeln, wie sie z. B. auch von SHARP bei der Lagerung von getrocknetem Schweinefleisch bei tropischen Temperaturen gefunden wurden<sup>1</sup>.

Trotz dieser erst bei hohen Temperaturen subjektiv feststellbaren Veränderungen ist die auf 3,4% Wasser gefriergetrocknete Seitenrumpfmuskulatur wesentlich hitzestabiler als die Muskulatur mit normalem Wassergehalt.

Während die Hitzeinaktivierung des Apyrasesystems der normalen weißen Seitenrumpfmuskulatur im gesamten Reaktionsablauf nach der 1. Ordnung erfolgt (Abb. 2), weist der Reaktionsverlauf dieses Prozesses bei dem gefriergetrockneten Material deutlich zwei Abschnitte auf. Der erste wurde in Abb. 4 nicht dargestellt, da er gleich zu Reaktionsbeginn innerhalb einer Minute sehr rasch abläuft und mit unserer Versuchseinrichtung Erhitzungszeiten, die kürzer als 1 min sind, nicht hinreichend exakt erfaßt werden konnten. Wir können daher nicht genau sagen, wann der Übergang vom ersten zum zweiten Reaktionsabschnitt stattfindet. Es steht jedoch mit Sicherheit fest, daß dieser Übergang innerhalb der ersten Reaktionsminute eintritt. Immerhin ist ersichtlich, daß die erste Reaktionsphase mit steigender Temperatur einen zunehmenden Anteil an der Gesamtreaktion erhält. Die zweite Reaktionsphase folgt wiederum recht genau dem Schema einer Reaktion erster Ordnung.

<sup>1</sup> SHARP, J. G.: J. Sci. Food Agric. 8, 14 (1957); 8, 21 (1957).

Es wäre denkbar, daß der charakteristische Verlauf der Temperaturkurven durch die möglicherweise geringere Temperaturleitfähigkeit der gefriergetrockneten Muskulatur, also rein methodisch bedingt sein könnte. Bei kurzen Erhitzungszeiten müßte dann der Kurvenverlauf mit der Zeit 0 beginnend zunächst eine Art Verzögerungsperiode oder anders ausgedrückt einen geringen Abfall der ATP-Spaltung aufweisen. Das bedeutet aber, daß die Kurven in diesem Bereich eine andere Krümmung haben müßten, als sie aus Abb. 4 folgt.

Wenn auch somit der Kurvenverlauf dafür spricht, daß durch die Wärmeleitfähigkeit die Ergebnisse nicht verfälscht werden, erschien es uns doch wünschenswert, für die frische und die gefriergetrocknete Muskulatur experimentell die Temperaturleitzahlen zu ermitteln, da sie die Geschwindigkeit des Temperaturanstieges bestimmen. Die Meßergebnisse sind in Tab. 1 enthalten.

Tabelle 1. Temperaturleitzahl und Wärmeleitzahl von gefriergetrockneter Karpfenmuskulatur und Karpfenmuskulatur mit normalem Wassergehalt

Untersuchungsmaterial	Wassergehalt %	Temperaturleitzahl cm <sup>2</sup> /min	Wärmeleitzahl kcal/m °C h
frische Karpfenmuskulatur . . . . .	70—79	0,082	0,40
gefriergetrocknete Karpfenmuskulatur .	3,4	0,080 <sup>1</sup>	0,036 <sup>1</sup>
Wasser . . . . .	100	0,088	0,54

Die Werte gelten im Bereich zwischen +20 und +50° C. Als Vergleich enthält die Tabelle die Daten für Wasser sowie die entsprechenden Wärmeleitzahlen.

Die Werte der Temperaturleitzahlen zeigen, daß der Wassergehalt der Muskulatur die Geschwindigkeit des Temperaturanstieges nicht beeinflußt und somit die Frischmuskulatur und die gefriergetrocknete Muskulatur bei der Erhitzung die erforderliche Temperatur in gleicher Zeit erreichen. Damit dürften auch die in Abb. 4 dargestellten Temperaturinaktivierungskurven für gefriergetrocknetes Material und die daraus resultierende größere Stabilität der auf etwa 3% Wasser gefriergetrockneten Muskulatur ihre Gültigkeit behalten.

Die  $Q_{10}$ -Werte im zweiten Reaktionsabschnitt sind verhältnismäßig klein und bewegen sich zwischen 2 und 3, d. h. im Rahmen der bei üblichen chemischen Reaktionen gefundenen Werte. Das scheint darauf hinzudeuten, daß der eigentliche Denaturierungsprozeß, der ja durch große Temperaturquotienten gekennzeichnet ist, innerhalb der ersten Minute zum Stillstand kommt. Möglicherweise handelt es sich bei diesem zweiten Reaktionsabschnitt der Hitzeinaktivierung des Apyrasesystems der gefriergetrockneten Muskulatur um Coagulationsvorgänge, die einen verhältnismäßig kleinen Temperaturquotienten besitzen<sup>2</sup>, der bei der Muskulatur mit normalem Wassergehalt überlagert wird und nicht in Erscheinung tritt.

Insgesamt ergibt sich somit, daß die in der ersten Phase rasch verlaufende Hitzeinaktivierung des Apyrasesystems der auf rund 3% Wassergehalt gefriergetrockneten Karpfenmuskulatur in der zweiten Phase mit außerordentlich verminderter Reaktionsgeschwindigkeit nach der ersten Ordnung weitergeht. Es ist anzunehmen, daß bei der gefriergetrockneten Muskulatur im Gegensatz zur Muskulatur mit normalem Wassergehalt die Geschwindigkeit der Inaktivierungsreaktion dadurch plötzlich stark verringert wird, daß unter den jeweils herrschenden Temperaturbedingungen nicht mehr genügend Wasser für den normalen Ablauf zur Verfügung

<sup>1</sup> Schüttgewicht: 0,3 g/cm<sup>3</sup>.

<sup>2</sup> LEPESCHKIN, W. W.: Zell-Nekrobiose und Protoplasma-Tod. Protoplasma Monographien Bd. XII., S. 92. Berlin: Gebr. Bornträger 1937.

steht. Die experimentelle Überprüfung dieser Annahme und die Diskussion der damit zusammenhängenden Probleme erfolgen an anderer Stelle.

#### *Zusammenfassung*

Die Hitzeinaktivierung des Apyrasesystems der weißen Seitenrumpfmuskulatur des Karpfens mit normalem Wassergehalt und von gefriergetrockneter Muskulatur mit einem Wassergehalt von 3,4% wurde in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit gemessen.

Die für die Muskulatur mit normalem Wassergehalt erhaltenen Inaktivierungskurven folgen dem Schema einer monomolekularen Reaktion. Der Inaktivierungsprozeß beginnt im Temperaturbereich zwischen 35 und 40° C. Die  $Q_{10}$ -Werte und die Werte für die Aktivierungsenergie nehmen mit steigender Temperatur ab. Zwischen 38 und 39° C betragen der  $Q_{10}$ -Wert 133 und der Wert für die scheinbare Aktivierungsenergie 210 kcal/mol. Die ungewöhnlich hohen Werte zeigen, daß es sich bei dieser Hitzeinaktivierung um einen echten Denaturierungsvorgang handelt, der wahrscheinlich an dem fibrillären Muskelprotein Myosin stattfindet.

Das gefriergetrocknete Material ist wesentlich hitzestabiler. Die innerhalb der ersten Minute rasch verlaufende Inaktivierungsreaktion geht in einen wesentlich langsameren Abschnitt über, der dem Schema einer Reaktion erster Ordnung folgt. Die  $Q_{10}$ -Werte und die scheinbaren Aktivierungsenergien bleiben in diesem langsamen Reaktionsabschnitt im Rahmen der von normalen chemischen Reaktionen bekannten Werte. Durch Bestimmung der Temperaturleitzahl wurde ermittelt, daß bei der hier benutzten Versuchsanordnung der Wassergehalt den Temperaturanstieg in Muskulatur mit verschiedenem Wassergehalt nicht beeinflusst.