

SEVENTH MEETING OF EUROPEAN MEAT
RESEARCH WORKERS Warszawa, Sep-
tember 18th to 23rd, 1961.

ÜBER FREIE AMINOSAUREN WÄHREND DER REIFUNG DER ROHWURST.

L. Körmendy und Gy. Gantner^x

Die Zahl der sich mit der Änderung des Nicht-Protein-Aminosäuregehaltes in Fleisch und Fleischerzeugnissen befassenden Mitteilungen erhöhte sich in den letzten Jahren wesentlich /1-9/. Auf die Wichtigkeit dieses Problems weist auch jene Tatsache hin, dass die organoleptischen Eigenschaften durch den bei der Reifung des Fleisches und der Fleischerzeugnisse sich abspielenden Eiweissabbau und durch die biochemische Umgestaltung der Aminosäuren empfindlich beeinflusst werden können. Grau und Böhm untersuchten den Gehalt an freien Aminosäuren in frischem Fleisch und in gepökelten /geräucherten, gekochten/ Fleischwaren /1,2/. Locker /3/ ferner Babin und Lazarjev /4/ verfolgten die bei der Lagerung des Rindfleisches auftretende Proteolyse.

Wood /5/ analysierte die Stickstoff enthaltenden Komponenten der Fleischextrakte mittels Papierchromatographie. Hughes /6/ untersuchte den Gehalt an freien Aminosäuren in Hering in Abhängigkeit der Lagerungszeit. Nach den Feststellungen von Vas /7/ ist ein wesentlicher Eiweissabbau während der Reifung der Rohwurst nicht nachweisbar. Biserte /8/ und seine Mitarbeiter erwähnen Untersuchungen über den Gehalt an freien Aminosäuren vom Schweinemuskelfleisch. Pohja und Niinivaara /9/ haben die proteolytische Aktivität mancher Bakterienarten bei der Reifung von Salami bestimmt.

In dieser Mitteilung berichten wir über die Untersuchung mancher in den Rohwürsten sich abspielenden biochemischen Änderungen.

x./ Ungarisches Forschungsinstitut für Fleischwirtschaft
P. P. Niinivaara

Untersuchungsmethoden.

Das abgekühlte, entknochte Schweinefleisch wurde in Kutmix mit Speck, Pökelsalz und Gewürzen vermennt, und bis zur entsprechenden Konsistenz zerkleinert. /Fleisch-Speck Verhältnis etwa 7 : 3/. Die Rohmasse wurde mit Hilfe einer Vakuumfüllmaschine in Kutisiñ-Kunst Darm mit einem Durchmesser von etwa 7 cm gefüllt, /Die vor dem Füllen der Rohmasse entnommene Probe wurde mit I. bezeichnet/

Die in Darm gefüllte Masse wurde 8 - 10 Tage geräuchert /die nach dem Räuchern entnommene Probe wurde mit II. bezeichnet, alsdann in den Reifungsraum überbracht./

Die Temperatur stieg so beim Räuchern als auch bei der Reifung nicht über 15° C. In der Mitte der Reifungsperiode d.h. am 45sten Tag, und später am 100sten Tag wurden wieder Proben entnommen /die Bezeichnung dieser Proben ist III. bzw. IV/. Die am 100sten Tag entnommenen Proben entsprachen den Bedingungen der "Schnittreifen Ware" in jeder Hinsicht.

Die Bestimmung des Wasser-, Eiweiss-, Fett- und Kochsalz-Gehaltes wurde nach den üblichen Methoden durchgeführt. /10/. Der pH-Wert wurde mit Glaselektrode mittels des Messgerätes "Radiometer" gemessen.

Die Bestimmung des Gehaltes an Ammonium-N + flüchtigem Amino-N /angegeben in mg% N/ wurde aufgrund der Vorschrift von Hughes durchgeführt /10 g Fleisch wurden mit 5 %-iger Trichloressigsäure bis zu 100 ml aufgefüllt, über Nacht in Kühlschrank aufbewahrt, filtriert; 10 ml des Filtrates wurden in Parnas-Wagner Apparat alkalisch gemacht und in eine Vorlage mit 0,01 nH₂SO₄ destilliert. Rücktitrierung mit 0,01 nNaOH/.

Zur Bestimmung des Alanin Gehaltes wurde das Kupferkomplex-Verfahren von Spies und Chambers /11/ angewendet /10 g Fleisch + 40 ml Wasser wurden in Turmix vermennt, danach 2,5 ml einer 50 %-igen Trichloressigsäurelösung zugegeben. Nach den Filtrieren wurden zu 10 ml des Filtrates die zur Neutralisierung nötige nNaOH Menge und 10 ml Cu₂/PO₄/₂-Suspension zugefügt und mit Boratpuffer /pH = 3,2/ bis zu 30 ml ergänzt. Nach 10 min Schütteln wurde filtriert und zu 10 ml des Filtrates 0,2 g Alanin zugegeben, in Photometer bei 610 m gemessen. /Der Gehalt an Alaninostickstoff wurde in mg% Alanin ausgedrückt.

Zur Bestimmung des Gehaltes an freien Aminosäuren wurde nach Grau und Böhn /2/ ein alkoholischer Auszug verfertigt /10 g Fleisch wurden mit 100 ml 75%igen Etanol über Nacht in Kühlschrank aufbewahrt. Das Filtrat wurde nach einem vorsichtigen Einengen an Wasserbad mit 30%-iger Etanol aufgenommen und filtriert. Die von Fette und Eiweissbefreite, jedoch noch Kochsalz enthaltende Lösung wurde in Kühlschrank aufbe-

- 3 -

wahrt. Die Extrakte wurden mit den üblichen Verfahren nicht entsalzt /8, 16, 17/, da dies bei der Elektrophorese sowieso erfolgt. Ein Nachteil dieses Verfahrens liegt jedoch darin, dass die Zone der Amine denzufolge diffus wird.

Die Trennung der Aminosäuren wurde nach der Anleitung von Biserte und seinen Mitarbeitern /12/ mit der Kombination der Papierelektrophorese und der Papierchromatographie durchgeführt.

Die Elektrophorese der basischen Aminosäuren erfolgte in einer 0,025 M Na_2CO_3 Puffer nach den Vorstellungen von Harris und Warren /13/.

Von dem Extrakt wurden - auf 22 % Eiweißgehalt bezogen - 20 l auf einen 4 cm breiten Filtrierpapierstreifen /Whatman No 1/ gebracht. Die Elektrophorese wurde in "Labor"-Apparat /hergestellt in Ungarn/ bei 300 V durchgeführt /Feldstärke annähernd 10 V/cm/.

Die grundlegende Trennung /Asparaginsäure, Glutathion, Glutaminsäure, Zone der neutralen Aminosäuren, Zone der basischen Aminosäuren, Amine /erfolgte in Pyridin-Eisessig Pufferlösung /pH = 3,9 / in 2 bzw. 4 Stunden. Nach der Hydrolyse /Extrakt - 20 %-ige Salzsäure Verhältnis 1 : 1, 100 °C, 20 min/ erschien bei der Elektrophorese /pH = 3,9/ des alkoholischen Extraktes zwischen der neutralen und basischen Zone auch das bei der Hydrolyse des Carnosins und Anserins entstandene - Alanin.

Im Interesse der Identifizierung der γ -Aminobuttersäure wurde nach der Anleitung von Jirgl /14/ zu einem in Pufferlösung mit pH-Wert 3,9 elektrophoretisch behandelten Filterpapier ein Whatman No 1 Papierstreifen genäht und senkrecht zur Richtung der Elektrophoresis chromatographiert /Butanol:Eisessig: Wasser = 4:1:5/.

Die Trennung der Zone der neutralen Aminosäuren wurde nach Eluierung des Fleckes und nach Elektrophorese in n-Essigsäure /pH = 2,4/ auch auf papierchromatographischem Wege durchgeführt /Butanol:Eisessig: Wasser = 4 : 1 : 5/.

Die Flecken wurden mit 2 %iger Ninhydrinlösung entwickelt /65 °C, 30 min/, als dann ^{nach} Giri /15/ mit 75%igen, 5 mg% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ enthaltenden Ethanol eluiert und bei 530 m photometriert. Dieses Verfahren kann jedoch nur als ein halbquantitatives angesehen werden !

Versuchsergebnisse:

Die Änderung des pH-Wertes, des Gehaltes an Ammonium-N+flüchtigen Amin-N, ferner an γ -Amino-N in Abhängigkeit der Reifungszeit ist in Abbildung 1.

dargestellt. Wie in der Abbildung ersichtlich, der pH-Wert vermindert sich einigermassen auf Wirkung des Räucherns, später aber, nimmt er in Laufe der Reifung wieder /monoton zu. Der α -Amino-N-Gehalt zeigt während der ganzen Reifungszeit und der Gehalt an Ammonium-N + flüchtigen-Amino-N von der Beendigung des Räucherns beginnend eine monotone Zunahme. Zu diesen Untersuchungen wurden in den verschiedenen Perioden der Reifung /Rohnasse, an 10-ten Tag nach den Räuchern, an 45sten Tag und an 100sten Tag/ mit der Hilfe der Zufallszahlentabelle stichprobennässig je 8 Proben ausgewählt. In den Diagrammen ist auch die Standardabweichung angegeben.

Die Identifizierung der einzelnen Aminosäuren wurde in einer besonderen Versuchsreihe durchgeführt. Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle 1, bzw. Abbildung 2. angegeben.

In der Tabelle 1. sind die Ergebnisse der chemischen Analyse zusammengefasst.

Die in der Tabelle 1. und Abbildung 2. dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf die gründlich homogenisierten Durchschnittsproben von je 12 stichprobennässig ausgewählten Würsten bzw. von der Rohnasse.

Die Änderung der chemischen Zusammensetzung ist die Folge der in Laufe des Reifens erfolgten Austrocknung. Nach Kárpáti /18/ tritt während des Reifens infolge der Bildung von NH_3 und CO_2 ein nahe 1%iger Trockensubstanzverlust auf. Bei der in Abbildung 1. dargestellten Versuchsreihe überstieg der Durchschnittswert des am 100sten Tag gemessenen α -Amino-N/Protein-Wertes den am 45sten Tag gemessenen Durchschnittswert signifikant / $P = 95\%$. Bei der in der Tabelle 1. angeführten Versuchsreihe ist der Wert α -Amino-N/Protein für die 100 Tage lang gereiften Probe in Vergleich zu der 45 Tage gereiften etwas niedriger, was darauf hindeutet, dass auch Abweichungen in einigen Fällen - trotz

der ansteigenden Tendenz der Durchschnittswerte - in diesen Bereich möglich sind. Die Richtung der Änderung des pH-Wertes und des Gehaltes an Ammonium-N - +flüchtigen-Amin-N stimmt mit jener der in Abbildung 1. dargestellten Versuchsreihe überein.

Abbildung 2. veranschaulicht die Änderung der einzelnen Aminosäuregruppen. Daraus ist ersichtlich, dass die Geschwindigkeit der Bildung bzw. Umwandlung der Aminosäuren in der ersten Periode der Reifung /bis zum 45sten Tag/ in allgemeinen grösser ist, als in der zweiten Periode/ zwischen dem 45sten und dem 100sten Tag/. Nach dem 45sten Tag ist entweder kaum eine Änderung /Asparaginsäure, Amine/ oder bloss eine geringe Verminderung /Zone der basischen und neutralen Aminosäuren/ zu beobachten.

Das Carnosin und Anserin zeigen während der Reifung praktisch keine Änderung.

Einen interessanten Zusammenhang zeigt die Gestaltung der Glutaminsäure und der γ -Aminobuttersäure. Nach einer am Anfang auftretenden Zunahme der Glutaminsäure erfolgt während des weiteren Verlaufes der Reifung eine Abnahme, danach wieder eine Zunahme /Abbildung 2/. Gleichzeitig mit der Abnahme der Glutaminsäure erscheint die γ -Aminobuttersäure, welche wir durch Kombination der Elektrophorese /pH = 3,9/ und der Chromatographie/ Butanol: Eisessig: Wasser = 4 : 1 : 5 / mit Sicherheit identifizieren konnten. Vermutlich entstand die γ -Aminobuttersäure in Laufe der Reifung durch die Dekarboxylierung der Glutaminsäure. Übrigens ist das Glutaminsäuredekarboxylase-Enzym in den tierischen und pflanzlichen Geweben sehr verbreitet. /19, 20, 21, 22, 23./ Diese Frage beansprucht jedenfalls noch weitere Untersuchungen. Die Wirkung der Salzigkeit /= Kochsalz %xloo /Wassergehalt % / auf die Enzymaktivität sollte den Gegenstand einer besonderen Forschungsarbeit bilden, da dieses Verhältnis infolge der Eintrocknung in

der Rohwurst erheblich zunimmt. Man kann nämlich annehmen, dass die in der Abbildung 2. dargestellten Vorgänge die Bildung bzw. Umwandlung der Aminosäuren in der zweiten Phase der Reifung auch durch die enzymaktivitätshemmende Wirkung des höheren Salzigkeitswertes "verzögert" werden.

Die Rohmasse enthält die Amine in einer nicht nachweisbaren Menge; während der Reifung nahm der Gehalt an Aminen monoton zu, was auch auf die Tätigkeit der Dekarboxylase-Enzyme hindeutet.

In der Zone der basischen Aminosäuren nimmt die Intensität des Fleckes Arginin + Histidin + Lysin + Ornithin bis zum 45sten Tag erheblich zu.

Die weitere Trennung der /bei pH = 3,9, elektrophoretisch behandelten/ Aminosäuregruppen wurde auch durchgeführt, die Ergebnisse wurden aber nur qualitativ ausgewertet. Zur quantitativen Auswertung haben wir mehrere bekannte Verfahren erprobt /24, 25, 26, 27/, unserer Meinung nach sind diese jedoch nicht zuverlässig. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle 2. zusammengefasst.

Das Glutathion konnte nur in der Rohmasse identifiziert werden; in Laufe der Reifung war es aber nicht mehr nachweisbar.

Von den neutralen Aminosäuren waren Leucin, Phenylalanin, Valin, Prolin, Tyrosin, Alanin, Glycin, Threonin, Serin, Taurin und in geringer Menge Methionin und Tyrosin nachweisbar.

Interessanterweise nahm die Menge beinahe jeder zu der neutralen Zone gehörenden Aminosäure während der Reifung gleichmäßig zu, bzw. verminderte sich einigermassen zwischen dem 45sten und 100sten Tag. Die Anwesenheit von Taurin konnte durch die Kombination von Elektrophorese /pH = 2,4/ und Chromatographie /Butanol : Eisessig : Wasser = 4 : 1 : 5 /, ferner durch Trennung mittels Ionenaustauschers /Dowex 50/ nachgewiesen werden /28/. - Alanin und freies Histidin waren in bedeutender

Menge nur in dem hydrolysierten Extrakt nachweisbar /sie entstehen bei der Hydrolyse des Carnosins und Anserins/. Von den basischen Aminosäuren war das Arginin nur in der Rohmasse auffindbar. Dagegenüber entstand in Laufe der Reifung Ornithin. Es ist möglich, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen den beiden Erscheinungen besteht.

Wir konnten in der neutralen Zone einen Fleck und in der basischen Zone zwei Flecke nicht identifizieren. Die in der basischen Zone gefundenen und nicht identifizierten Flecke stammen wahrscheinlich von Peptiden.

Cystein und Cystin waren mit der von uns angewandten Methode nicht nachweisbar.

Durch die Zunahme der Menge der basischen Zone und der Amine, ferner durch die eventuelle Erhöhung des Gehaltes an Ammonium-N+flüchtigen-Amin-N kann die Erhöhung des pH-Wertes in der ersten Phase der Reifung teilweise erklärt werden. Die in der zweiten Phase der Reifung /zwischen den 45sten und 60sten Tag/ auftretende weitere pH-Erhöhung weist hingegen auf die Rolle anderer ungeklärten Faktoren hin /strukturelle Änderungen in Eiweiss usw./.

Die Änderung des Gehaltes an Ammonium-N+flüchtigen-Amin-N beeinflusst allein den pH-Wert nicht eindeutig. Die Feststellung der Herkunft der Enzymaktivität /bakterielle bzw. Gewebeenzyme/ sollte den Gegenstand besonderer Untersuchungen bilden.

Wir möchten noch erwähnen, dass die Zusammensetzung der einzelnen Schichten auch innerhalb einer und derselben Wurst verschieden ist, wie es in der Abbildung 3 ersichtlich ist.

Der Kochsalzgehalt nimmt nach dem Mittelpunkt zu; die Salzigkeit ist dagegen beinahe konstant. Diese Beobachtung stimmt mit den früheren Feststellungen von Zukál /29/ und Kárpáti /18/ überein. Der Grund der

relativen Beständigkeit der Salzigkeit liegt nach Zukál darin, dass die infolge der Trocknung auftretenden Salzgehaltsunterschiede in den Schichten durch die Diffusions-Salznigrationsvorgänge beinahe ausgeglichen werden, und dies deutet darauf hin, dass die nach dem Mittelpunkt erfolgte Salznigration schneller vorgeht, als die Migration des Wassers nach aussen. Im Gegenfall sollte nämlich die Salzigkeit der äusseren Schichten erheblich zunehmen. Der Unterschied beträgt in gegebenen Fall 0,148 bzw. 0,132. d.h. etwa 12 %.

Die Menge des α -Amino-N und des Ammonium-N+flüchtigen Amin-N erhöht sich nach dem Mittelpunkt monoton. Die auf den Wassergehalt bezogenen Werte aber zeigen in Falle des Ammonium-N+flüchtigen Amin-N in derselben Richtung eine monotone Abnahme. Die Erklärung dieser letzteren Erscheinung ist nicht einfach. Einerseits ist es möglich, dass die Diffusionsgeschwindigkeit dieser Stoffe erheblich kleiner, als die Geschwindigkeit der Wassermigration ist, andererseits kann die Aktivität der das Ammoniak und die flüchtigen Amine erzeugenden Enzyme /Desaminase und Dekarboxylase/ schichtenweise verschieden sein. Die Wassergehaltsunterschiede zwischen den einzelnen Schichten können auch auf die Löslichkeitsverhältnisse eine Wirkung ausüben. Während der Trocknung entweicht von der Oberfläche der Ware auch Ammoniak in den umgebenden Lagerungsraum. Es ist höchst wahrscheinlich, dass die angeführten Faktoren gleichzeitig auftreten und ihre Wirkungen übereinanderlagert werden.

Der pH-Wert zeigt auch eine monotone Abnahme nach dem Mittelpunkt. /Die mehrmalige Wiederholung dieser Untersuchung mit anderen Wurststücken ergab in allen Fällen ähnliche Ergebnisse./ Es wäre noch vorzeitig für diese Erscheinung eine Erklärung zu geben. Beachtenswert ist es aber, dass die Konzentration an Ammonium-N+flüchtigen Amin-N in der äusseren Schicht mit einem höheren pH-Wert verhältnismässig höher ist.

Nach den Untersuchungen von Szeregy /30/ ist die Säurezahl des Fettes in den mittleren Schichten niedriger. Nach ihrer Feststellung kann in Laufe der Reifung eine sehr erhebliche Säurezahlerhöhung nachgewiesen werden.

Zusammenfassung.

Es wurden einige, bei der Reifung der längere Zeit hindurch gelagerten Rohwürste auftretenden biochemische Änderungen untersucht. In Laufe der Untersuchungen wurde neben der chemischen Zusammensetzung die Änderung des pH-Wertes, des α -Amino-N, des Ammonium-N + flüchtigen Amin-N, und der Aminosäuren verfolgt. Die Trennung und Identifizierung der Aminosäuren erfolgte durch die Kombination der papier-elektrophoretischen und papierchromatographischen Verfahren. Die Auswertung der Ergebnisse wird in der Mitteilung eingehend besprochen.

Literatur

1. Grau, R., Böhn, A.: Die Fleischwirtschaft 10/1958/ 70
2. Grau, R., Böhn, A.: ZLUF 108/1958/ 135
3. Locker, R.H.: J.Sci.Food Agric. 9 /1960/ 520
4. Babin, F., Lazarjev, E.: Hologilnaja Technika 2/1960/47
5. Wood, T.: J.Sci. Food Agric. 7 /1956/ 196
6. Hughes, R.B.: J.Sci. Food Agric. 10 /1959/ 558
7. Vas, K., Pulay, G.: Élelmezési Ipar 8 /1954/87 /ungarisch/
8. Biserte, G., Boulanger, P., Paysant, P.: Bull, Soc. Chin.Biol. 12 /1958/ 2067
9. Pohja, M.S., Niinivaara, F.P.: Die Fleischwirtschaft 12 /1960/ 932
10. Tartósító és Husipari Minősítő Vizsgálatok /Élelmiszeripari és Begyűjtési Könyv és Lapkiadó V. Budapest 1952 /ungarisch/
11. Spies, J.R., Chambers, D.C.: J.Biol. Chem. 191/1951/ 707
12. Biserte G., Flaquet-Schonaert, T.: Boulanger P., Paysant, P.: J.Chromatog. 3 /1960/ 25
13. Harris, H., Warren, F.L.: Biochem. J. 32 /1954/ 57
14. Jirgl, V.: Experientia 15/6 /1959/ 235
15. Giri, K.V.: Anal.Chem. 24 /1952/ 1677
16. Mueller, G.C., Bowman G., Herranen, A.: Anal.Chem. 27 /1955/ 1357
17. Block.R.J., Durrum, E.L., Zweig, G.: A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis /Academic Press, New-York 1958/
18. Kárpáti, G.: Husipar 9/2 /1960/77 /ungarisch/
19. Krishnaswamy, P.R., Giri, K.V.: Biochem.J. 62/1956/ 301
20. Palmer, R.F.: Biochem. J. 78 /1961/ 839
21. Rohrlich, M.: ZLUF 105 /1957/189; 104 /1956/ 313
22. Davison, A.N.: Biochim. et Biophys.Acta 19/1956/ 66
23. Roberts, E., Frankel, S.: J.Biol.Chem. 190 /1951/ 505
24. Gerok, W.: Z.f.physiol.Chem. 299 /1955/ 112
25. Grassmann, W., Hannig, K., Pöckl, M.: z.f.physiol. Chem. 299 /1955/ 258
26. Smith, A.M.: Analyst 76 /1951/ 623
27. Smith, A.M., Agiza, A.H.: Analyst 76 /1951/ 19
28. Avapara, J.: J.Biol.Chem. 218 /1956/ 571
29. Zukál, E.: noch nicht veröffentlichte Angaben
30. Szeredy I.: Élelmezési Ipar 7 /1953/ 303, /ungarisch/
Élelmezési Ipar 8 /1954/ 158 /ungarisch/.

Zusammenfassung der Ergebnisse der chemischen Analyse

Bezeichnung	Zeitdauer der Reifung	Wasser- G e h a l t	Eiweiss G e h a l t	Fett- G e h a l t	Kochsalz- G e h a l t	pH	α -Amino-N Protein	Ammonium-N+flüchtiges-Amin-N. Protein
I	0/Rohmasse/	48,0	14,5	31,5	2,7	5,95	2,30	1,45
II	10 Tage /nach Räucherung/	43,4	18,1	31,0	3,4	5,45	2,57	1,28
III	45 Tage	32,2	19,2	40,0	4,1	6,10	3,36	4,57
IV	100 Tage /schnittreif/	21,8	23,1	45,0	4,7	6,75	2,84	5,06

Tabelle 2

Die im Laufe der Reifung identifizierten freien Aminosäuren.

Aminosäuren	I	II	III	IV
Asparaginsäure +	+	++	+++	+++
Glutathion	+	-	-	-
Glutaminsäure	+	+++	++	++
<u>Neutrale Aminosäuren:</u>				
Leucin +	++	++	+++	+++
Phenylalanin	+	+	+	+
Valin	++	++	+++	++
Prolin	+	+	+	+
Tyrosin	-	±	-	±
Alanin ✓	+	+++	+++	++
Glycin	+	+++	++	++
Threonin	+++	++	++	+
Serin ✓	++	++	+++	++
Taurin	++	+++	++	++
Methionin	±	-	-	-
<u>Zwischen der basischen und neutralen Zone:</u>				
β - Alanin /nach Hydrolyse/	++	++	++	++
γ - Aminobuttersäure	-	±	+++	++
<u>Basische Zone:</u>				
Carnosin + Anserin	+++	+++	+++	+++
Histidin	-	-	-	-
Histidin /nach Hydrolyse/	++	++	++	++
Lysin	+	++	++	++
Ornithin ✓	-	++	+++	+++
Arginin	+	-	-	-

Erläuterungen: +++ sehr stark
 ++ stark
 + in geringer Menge nachweisbar
 ± an der Grenze der Nachweisbarkeit.

Abbildung 1.: Änderung des pH-Wertes und der Verhältnisse Ammonium-N/Protein und Amino-N/ Protein während der Reifungsperiode.

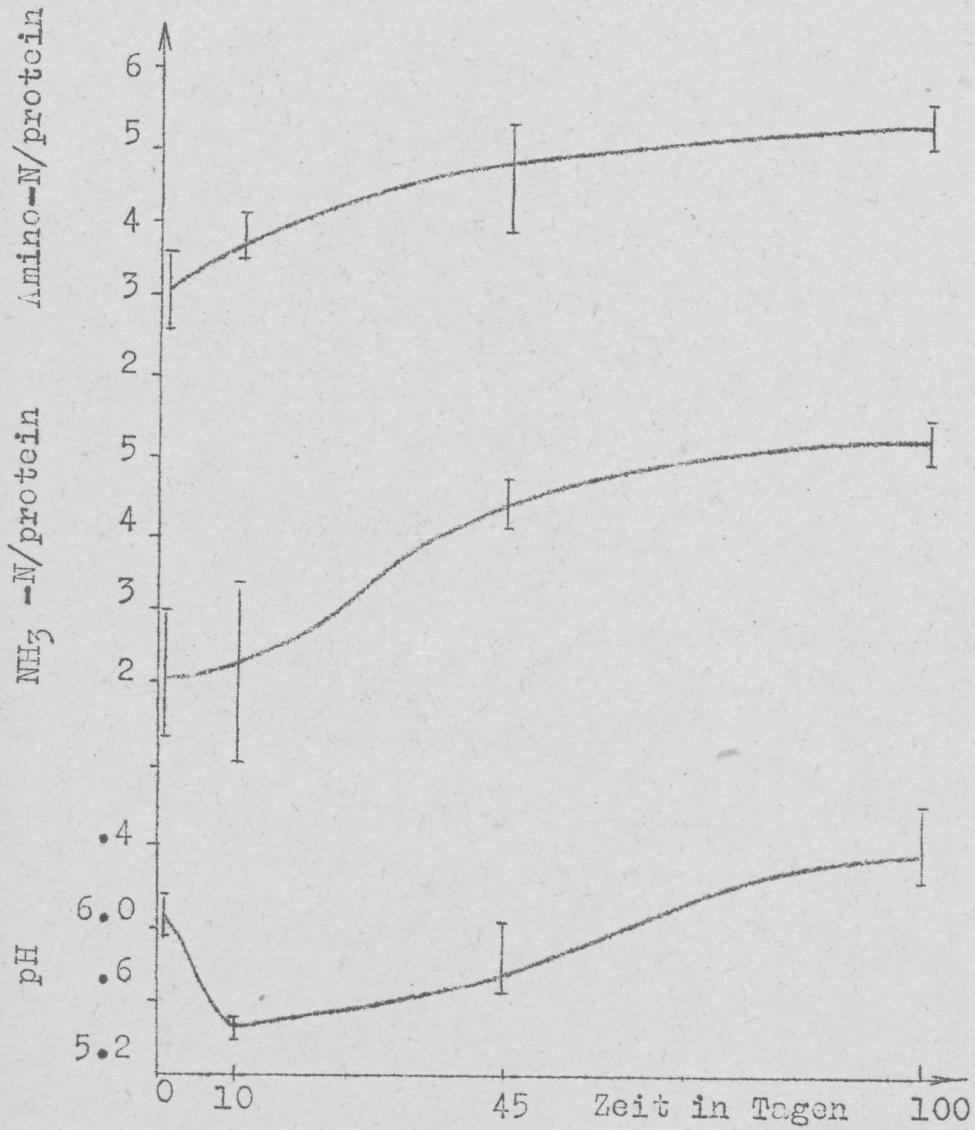


Abbildung 2.: Extinktionswerte der Flecke von durch Elektrophorese bzw. Chromatographie getrennten Aminosäuren und Aminosäuregruppen, photometriert /bei 530 m u/, nach Entwicklung mit Nynhydrinlösung und nach Bläuierung mit 75%-igem, 5 mg% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ enthaltendem Ethanol.

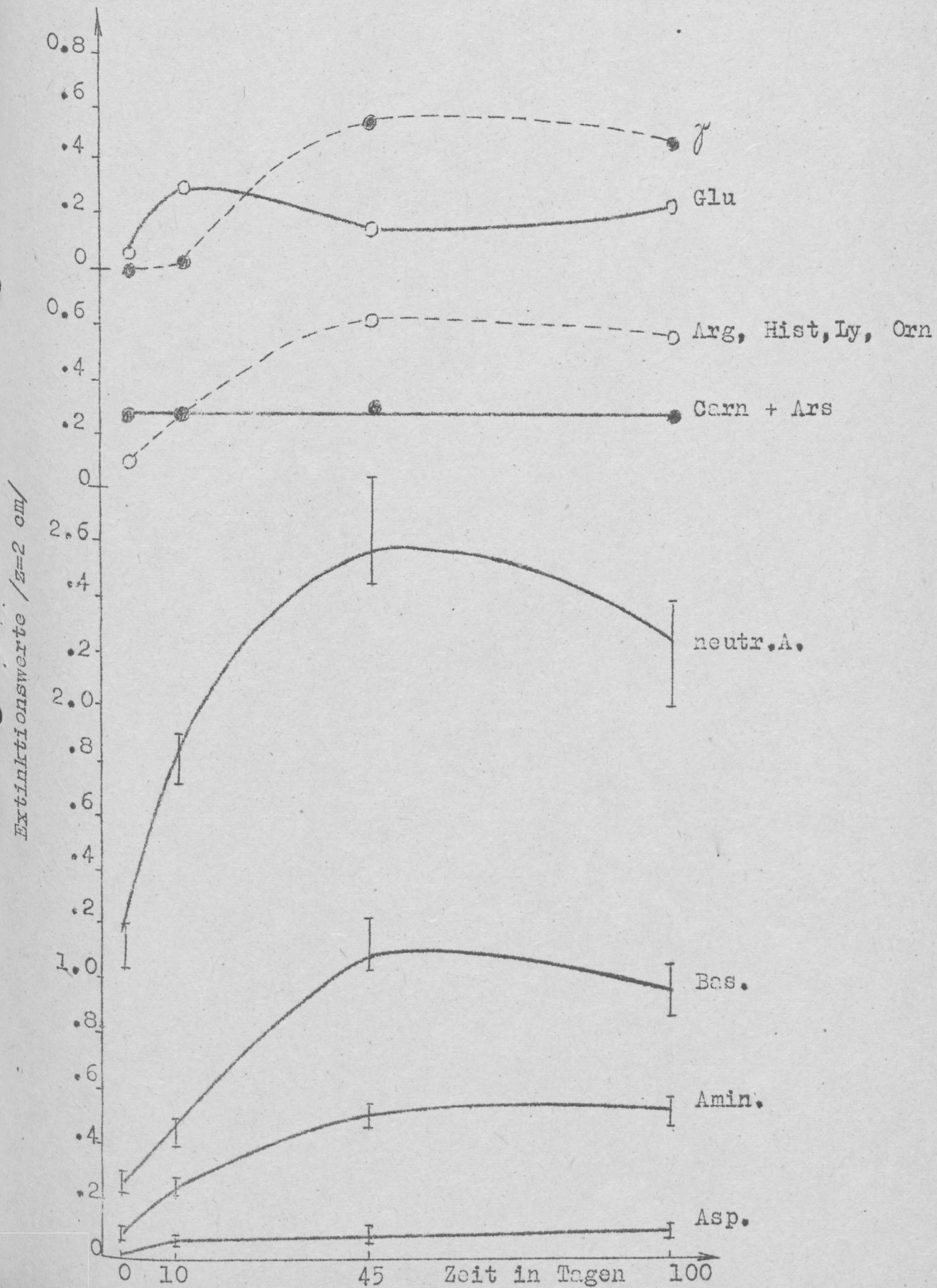
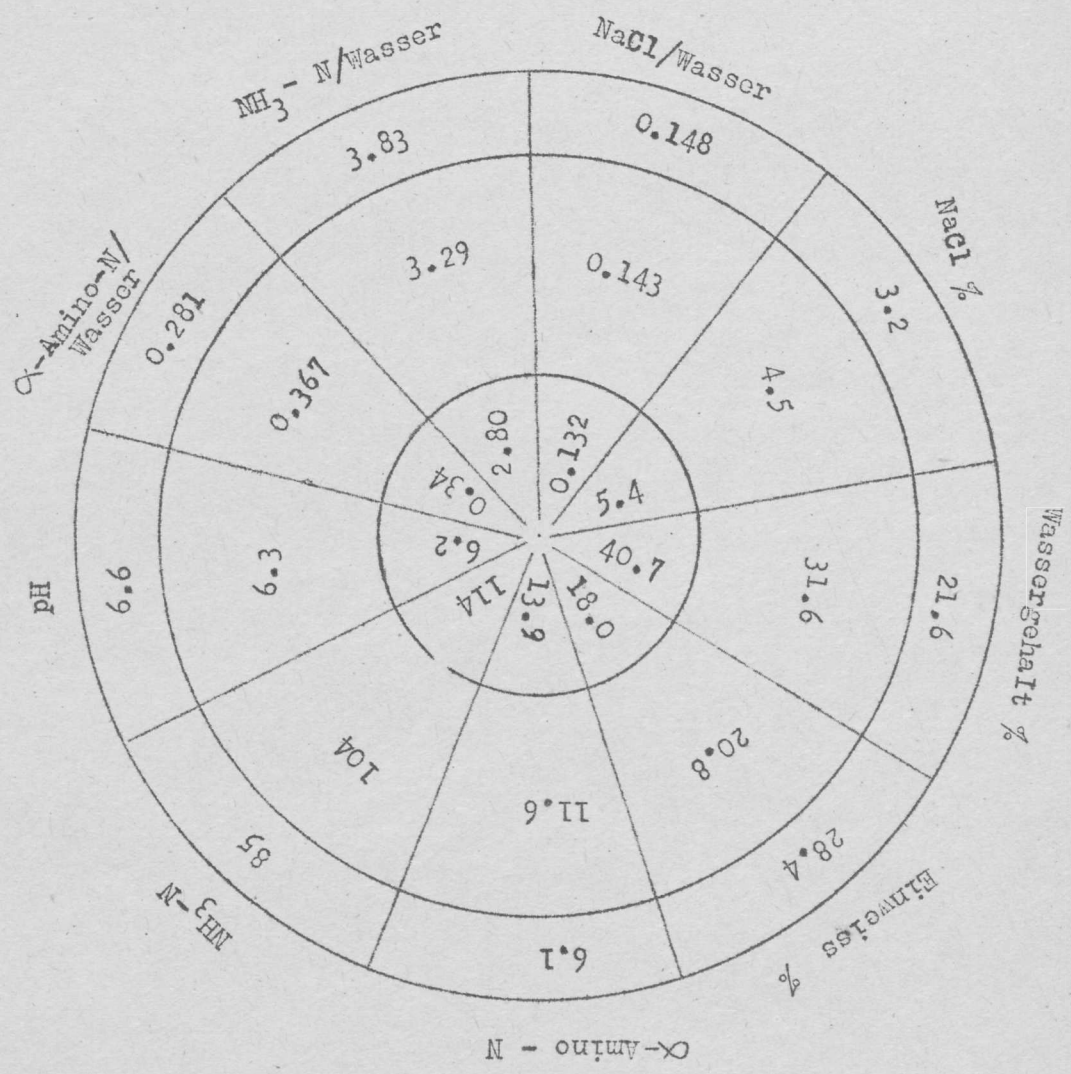


Abbildung 3.: Die Zusammensetzung der einzelnen Schichten innerhalb einer und derselben Wurst.



Vapaista aminohapoista kestromakkaran raakakypsymisen aikana.

L. Körmendy & Gy. Gantner, Unkarin Lihatutkimuslaitos.

Viime vuosina on tullut monia ko. asiaa käsitteleviä kirjoituksia (1-9). Probleeman tärkeyteen viittaa se tosiasia, että valkuaisaineiden hajoamistuotteet ja aminohapot vaikuttanevat organoleptisiin ominaisuuksiin. (Grau et Böhm 1-2; Locher 3 sekä Babin & Lazarjev 4 seurasivat naudanlihan proteolyysiä varastoinnissa). Wood (5) tutki lihautetta paperikromatografialla. Hughes (6) tutki vapaita a-happoja sillissä. Vas (7) ilmoittaa, ettei raakamakkaran kypsymisen aikana juuri tapahdu proteolyysiä. Biserte (8) on tutkinut sianlihan vapaita a-happoja. Pohja & Niinivaara (9) ovat tutkineet bakteerien proteolyyttistä aktiviteettia salamin kypsyessä.

Tässä tutkimuksessa käsitellään kestromakkaran kypsymisprosessin biokemiallisia muutoksia.

Menetelmät:

Kestomakkara: sianliha, silava, pökelsalz, mausteet. Suhde liha/silava = 7/3. Vakuumiruisku, Kutisin-suoli 70 mm. (Näyte 1). Savustus 8-10 päivää (Näyte 2 savustuksen päätyttyä). $t = 15^{\circ}\text{C}$ (ei sen yli). Seuraavat näytteet otettiin kypsymisperiodin puolivälissä (4-5 vrk) ja 100 vrk kuluttua (näytteet 3 ja 4.)

Analyysit: H_2O , valkuainen, rasva, NaCl tavallisilla menetelmillä (10.) pH mitattiin lasielektrodilla (Radiometer).

- $\text{NH}_3\text{-N}$ & haihtuva amiini-N määritettiin Hughes'in menetelmällä (10 g lihaa + 5 % TCA, täyttö 100 ml:ksi. seisotus kylmässä yli yön, suodatus; 10 ml suodosta laitettiin Parnas-Wagnes-aparaattiin alkalointi, tislauk, esiastiassa 0,01-n H_2SO_4 .
- Amino-N: Cu-kompleksi menetelmä/Spies & Chambers (11): 10 g lihaa + 40 ml H_2O /Turmix, lisätään 2,5 ml 50 % TCA. Suodatus. 10 ml suodosta neutraloidaan 1-n NaOH:lla ja lisätään 10 ml $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2^-$ suspensiota ja boraattipuskurilla (pH=9,2) täytetään 30 ml:ksi. Ravistelu 10 min, suodatus. Suodosta 10 ml, siihen laitetaan 0,2 g

alaniinia ja mitataan fotometrillä/610 m μ .

- Alfa-amino-N ilmoitetaan mg%:na alaniinia.

Vapaat a-hapot: tehtiin alkoholiuute (Grau & Böhm (2): 10 g lihaa + 100 ml 75 % C₂H₅OH, yli yön kylmässä. Suodos haihdutetaan hitaasti vesihauteella ja liuotetaan 30 %- C₂H₅OH:iin, jonka jälkeen suodattetaan. Tämä rasvasta ja valkuaisesta vapaa liuos (sisältää vielä NaCl) säilytetään kylmässä (jääkaappi!). Suolan poisto suoritettiin tavallisilla menetelmillä (8, 16, 17). Tämän menetelmän haittana on, että aminivyöhyke tulee hajanaiseksi.

Aminohapot erotettiin Biserten (12) mukaan kombinoimalla paperielektroforeesi ja kromatografia.

Emäksisten a-happojen elektroforeesi tapahtui 0,025-m Na₂CO₃-puskurissa Harris & Warren (13) menetelmällä. Uutteesta (auf 22 % Eiweissgehalt bezogen) pipetoitiin 20 μ l 4 cm:n levyiselle Whatman 1- paperisuikaleelle ja ajettiin "Labor"-aparaatissa (unkarilainen valmiste) jännitteellä 300 V, kenttävoimakkuus 10 V/cm.

Erotus: aspar. happo, glutationi, glut.happo -- neutraalit aminohapot -- emäksiset aminohapot -- amiinit tapahtui pyridiini - jääetikapuskurilla pH = 3,9 ajalla 2-4 t. Hydrolyysin jälkeen (uute - 20 % HCl suhteessa 1:1, 100°C, 20 min) esiintyi elektroforeesissa pH=3,9 neutraalin ja emäksisen vyöhykkeen välillä karnosinin ja anseriinin hydrolyysissä syntyneitä ?- alaniinia. (lienee beta-alaniini).

β -amino-voihapon identifiointi Jirgl'in (14) mukaan: em. elektrogrammi ommeltiin Whatman 1-arkin reunaan ja ajettiin kohtisuorassa suunnassa elektroforeesin nähden butanoli: jääetikka: vesi-seoksella suhteessa 4.1:5.

Neutr. a-hapot: täplät wluoitiin ja elektroforoitiin 1-n etikkahapolla pH=2,4. Senjälkeen kromatofointi kuten edellä.

Täplät kehitettiin 2 % ninhydriiniliuoksella (65°C, 30 min). Ne uutettiin Girin (15) mukaan 75 %:isella, 5 mg% CuSO₄ · 5 H₂O sisältävällä etanolilla ja fotometroitettiin 530 m μ :lla. Tämä menetelmä on vain puolikvantitatiivinen.

Tulokset.

Kts. kuva 1: pH, NH₃-N (+amiini-N), α -Amino-N. Havainnot: pH laskee savustuksen aikana, alkaa sitten nousta NH₂-N kohoaa koko ajan,

NH_3 -N savustuksen lopusta lähtien. (Kaikki ovat keskiarvoja 8 makkaras-
ta). Kts. kuva 2, taulukko 1: aminohapot. (Tulokset 12 pistokokeella
valitusta makkarasta).

Kemiallisen kokoomuksen muutokset johtuvat kuivamisesta. Karpati (18)
ilmoittaa: kypsymisen aikana tapahtuu lähes 1 % kuiva-ainepitoisuuden
vähentyminen NH_3 ja CO_2 :n muodostumisen johdosta. Kuvassa 1 esitetyn
koesarjan kohdalla ylittää näytteen 4 amino-N/proteini-arvo - suhteen
keskiarvo näytteen 3.

Vastaavan suureen ($p=95\%$). Sensijaan taulukossa 1 esitettyssä koesar-
jassa on mainittu suhde 3 ja 4. näytteen kohdalla päinvastainen (poik-
keuksiakin on olemassa!)

Kuva 2: aminohapporyhmittymien muutokset. Todetaan: aminohappojen
syntymis- ja muuttumisnopeus on kypsymisen alkupuolella (0-45 vrk)
huomattava, sensijaan loppupuolella (45-100 vrk). sangen vähäinen.
Puolivälin jälkeen havaitaan tuskin muutoksia (asparagiinihappo, amiini-
nit; emäks. ja neutr. happojen vyöhykkeet).

Karnosiini ja anseriini eivät käytännöllisesti katsoen muutu kypsymisen
aikana lainkaan.

Mielenkiintoista on glutamiinihapon ja γ -aminovoihapon muodostuminen.
Alussa glut.happo lisääntyy, sitten vähenee ja lopulta jälleen lisään-
tyy (kuva 2). Samanaikaisesti glut.hapon vähetessä ilmestyy γ - NH_2 -voi-
happo, joka varmasti on identifioitu. Oletettavasti tämä voihappo syn-
tyy glutamiinihapon dekarboksylaation kautta. Muutoin entsyymi gluta-
miinihappodekarboksylaasi on laajalle levinnyt sekä eläin- että kasvi-
kuöksissä (19, 20, 21, 22, 23). Tämä kysymys kaipaa tietysti selvi-
tyksen. "Suolaisuuden" vaikutus (=NaCl % per H_2O %, prosentteina) ent-
syymiaktiiviteettiin on eräs tutkimuskohde. Voidaan olettaa, että amino-
happojen syntyminen ja muuttuminen kypsymisprosessin loppupuolella
hidastuu juuri korkean "suolaisuuden" entsyymiaktiiviteettia heikentävän
vaikutuksen johdosta.

Raakamassa ei juuri sisällä amiineja (ei voitu osoittaa!) Kypsymisen
aikana amiiniinit lisääntyvät monotonisesti, mikä viittaa dekarboksylaas-
entsyymien toimintaan.

Emäksisten aminohappojen alueella lisääntyvät arginiini + histidiini +
lyysiini + ornitiini huomattavasti (0-45 vrk).

Aminohappojen erottamista edelleen olemme tutkineet monella menetelmällä. Tulokset ovat laadultaan kvalitatiivisia. Kvant. menetelmät (24, 25, 26, 27) eivät ole mielestämme luotettavia. Kts. taulukko 2.

Glutathioni identifioitiin vain raakamassasta, senjälkeen sitä ei ole todettu.

Neutr.hapoista todettiin: leusiini, fenylalaniini, valiini, proliini, tyrosiini, alaniini, glysiini, treoniini, seriini, tauriini ja vielä (tosin vähän) metioniinia ja tyrosiinia.

Neutr. aminohapot lisääntyvät suunnilleen yhtä paljon (0-45 vrk) tai vähenivät hieman kypsymisen lopulla.

Tauriinin läsnäolo todistettiin kombinoimalla elektroforeesi (pH=2,4) ja kromatografia (but: ^{happo} et.: H₂O=4:1:5), edelleen ioninvaihtohartsilla Dowex 50 (28).

Beta-alaniini ja vapaa histidiini esiintyivät lähinnä vain uutehydrolysaateissa (syntyvät karnosiinista ja anseriinista).

Emäksisistä a-haposta todettiin arginiinia vain raakamassasta.

Sitävastoin syntyi ornitiinia kypsymisen aikana, todennäköisesti kahden viimemainitun välillä on tietty syy-yhteys.

Identifioimattomia: 1 täplä neutraalivyöhykkeessä, 2 täplää emäksisiä (viimemainitut lienevät peptidejä).

Kystiiniä ja kysteiniä emme todenneet näillä menetelmillä.

Emäksisten aminohappojen ja amiinien lisääntyminen, edelleen NH₃-N:n (ja haiht. amiinien) nousu voivat osittain selittää ~~osittain~~ pH:n kohoamisen 1-faasin aikana (0-45 vrk). Toisen faasin aikana tapahtuva pH:n nousu viittaa sitävastoin muiden (vielä selittämättömien) tekijöiden vaikutukseen (esim. struktuurimuutokset lihasvalkuaisessa jne).

Edellä mainitut muutokset eivät kuitenkaan kokonaan selitä pH:n muuttamista. Entsyymiaktiviteetin alkuperän toteaminen (bakteriellit tai kudossentsyymit) on eräs tutkimuskohde.

Huomattakoon vielä erilaisuudet makkaramassan eri kohdissa. Suolapitoisuus kohoaa keskustaa kohti, "suolaisuus" on sitävastoin lähes vakio. Saman on todennut Zukal (29) ja Karpati (18). Syy tähän "suolaisuuden" vakioisuuteen on Zukalin mukaan seuraava: kuivumisen aiheuttama "suolai-

suusero" tasaantuu diffusion ja suolan vaeltamisen kautta. T.s. suolan siirtymisnopeus keskustaan päin on suurempi ^{kuin} veden siirtyminen ulospäin. Päinvastaisessa tapauksessa kohoaisi uloimpien kerrosten "suolaisuus" sangen merkittävästi. Erotus on ko. tapauksessa 0,148 tai 0,132, s.o. noin 12 %.

$\text{NH}_2\text{-N}$ ja $\text{NH}_3\text{-N}$ kohoavat keskustaa kohti monotonisesti. Vesipitoisuuden nähden lasketut vastaavat arvot osoittavat kuitenkin samassa suunnassa monotonista vähenemistä. Selitys tähän ei ole yksinkertainen. Toisaalta on mahdollista, että näiden aineiden diffusionopeus on pienempi kuin veden migration, toisaalta taas voi näitä komponentteja ($\text{NH}_3\text{-N}$, $\text{NH}_2\text{-N}$) tuottavien entsyymien (desaminase, dekarboksylase) aktiviteetti vaihdella eri kerroksissa. Myös eri kerrosten erilainen vesipitoisuus voi vaikuttaa liukoisuusolosuhteisiin. Kuivumisen aikana haihtuu myös NH_3 :a ulkoilmaan. Todennäköisimmin kaikki nämä tekijät vaikuttavat samanaikaisesti.

pH-arvo myös laskee monotonisesti keskustaa kohti (monissa sarjoissa aina todettu!) Selitystä ei tiedetä.

Huomattava on, että väkevyys $\text{NH}_3\text{-N}$ (+ haihtuva amiini-N) ulkokerroksessa on pH-arvon kohotessa suurempi.

Szereдын (30) mukaan on rasvan happoluku alempi keskiosassa. Hänen mukaan voi kypsymisen aikana tapahtua huomattava happoluvun kohoaminen.