VIII

ЕВРОПЕЙСКИЙ КОНГРЕСС РАБОТНИКОВ
Н И И МЯСНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

th EUROPEAN CONGRESS
OF MEAT RESEARCH INSTITUTES

ter EUROPÄISCHER KONGREß
DER FLEISCHFORSCHUNGSINSTITUTE

ème CONGRES EUROPEEN
DES INSTITUTS DE RECHERCHES
SUR LES VIANDES

N.N. Krylowa,
K.J.Basarowa, W.W.Kusnezowa

DAS WECHSELWIRKEN VON RÄUCHERRAUCH-KOMPONENTEN UND FLEISCHBESTANDTEILEN

№ 38

МОСКВА 1962г.

F. P. Niinivaara

DAS WECHSELWIRKEN VON RÄUCHERRAUCH-KOMPONENTEN UND FLEISCHBESTANDTEILEN

Kand. Biol. N.N. Krylowa, jüng. wiss. Arb.
K.J. Basarowa, jüng. wiss. Arb. W.W. Kusnezowa

Allunions-Forschungsinstitut der Fleischwirtschaft UdSSR

Es ist bekannt, daß beim Räuchern der verschiedenen Objekte, wie Rind- und Schweinefleisch, Fisch, Käse oder Pflaumen, mit demselben Rauch Produkte mit unterschiedlichen Aroma und Geschmack entstehen. Offensichtlich ist es dadurch zu erklären, daß die Aroma- und Geschmackbildung nicht nur von den Räucherrauchkomponenten, sondern von den Stoffen abhängt, die bei der Reaktion mit den Bestandteilen des Produkts entstehen.

Die Änderung des spezifischen Geruchs der verschiedenen Phenolfraktionen beim Vermischen derselben mit einigen Aminosäure- oder Fleischextraktivstoffelösungen zeugt davon, daß dabei chemische Reaktionen mit Bildung neuer Verbindungen vor sich gehen.

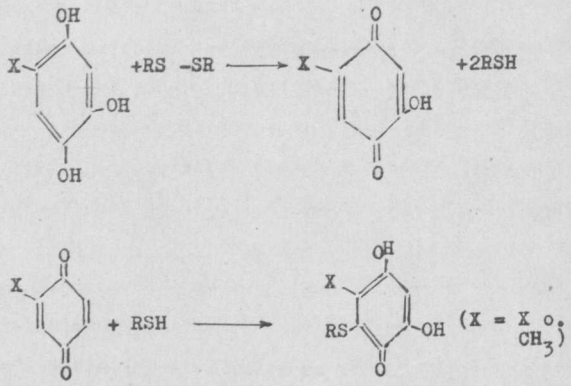
Ähnliche Reaktionen scheinen auch während der Räucherung mit den Bestandteilen des Produkts, besonders beim Heißräuchern zu erfolgen, da dabei die Wärmedenaturierung des Hauptbestandteils des Fleisches der Eiweiße erfolgt, die die Aktivität deren Funktionalgruppen steigert (1). Die Funktional-

gruppen des Eiweißes (Amino-, Sulfhydryl-, Hydroxyl, Phenolgruppen u.a.) vermögen mit den Räucherrauchkomponenten (Phenolen, Carbonylverbindungen und anderen Gruppen), die höchst reaktionsfähig sind, zusammenzuwirken.

Es ist durchaus möglich, daß an diesem Prozeß auch Extraktivstoffe und andere Fleischbestandteile - Lipide, Pigmente usw. beteiligt sind.

Ebenso wie sich im Tierorganismus die Phenole in Gegenwart von Cystein direkt mit dem letzten unter Bildung von Phenylmercaptursäure verbinden (dabei wird die Aminogruppe durch die Essigsäure leicht blokiert) (2), können auch beim Fleischräuchern die Räucherrauchphenole zu den Reaktionen mit den freien Sulfhydrylgruppen der Eiweiße, Peptide oder Fleischaminosäuren fähig erscheinen.

Burton und Stoves (3) nehmen an, daß die Reaktion zwischen den Polyphenolen und Eiweißdisulfidgruppen nach folgenden Schema erfolgt.



Infolge der Reaktionen schließt sich Polyphenol dem Eiweißmolekül an, das Disulfid- oder Sulfhydrylgruppen enthält.

Die Reaktion von Formaldehyd mit der primären Eiweiß- oder Aminosäureaminogruppe, die zur Bestimmung von Aminostickstoff dient, ist längst bekannt. Die Bräunungsreaktion von Maillard ist ebenfalls weit verbreitet; die Hauptrolle spielen darin die Aminosäuren und Zucker, die bei erhöhter Temperatur reagieren.

Gegenwärtig werden verschiedene Stoffe, die das Aroma von Lebensmitteln, Obst und Gemüse besitzen, erfolgreich synthesiert. So ist, beispielsweise, der Geruch von frischem Kohl durch Allylisothiocynat - $CH_2=CH-CH_2-N=C=S$ bedingt, das mit Hilfe von Myosin aus dem Gluckosid-Synigrin gebildet wird (4). Das letzte kommt in Samen des schwarzen Senfs, in Meerretichwurzeln sowie im Kohl vor.

Die Erkenntnisse über die Rolle der einzelnen Räucherkomponenten, die Aroma, Geschmack sowie Aussehen der Räucherwaren bedingen, sind leider noch ungenügend.

So hängen nach Tilgner Farbe und Glanz der Erzeugnisse von der Anwesenheit der neutralen chemischen Verbindungen ab. Ziemba (6) fand, daß diese Neutralverbindungen das Erzeugnis deutlich zu färben vermögen. Bei der Polymerisation oder Autoxydation wird die Färbung intensiver.

Die von Maillard (7) entdeckte Bräunungsreaktion, die offensichtlich diesen Vorgängen zu Grunde liegt, wurde weiter von Enders (8) untersucht. Er stellte fest, daß sich diese Reaktion nicht auf die Reaktion zwischen Zuckern und Aminosäuren beschränkt, wie es früher galt, sondern überhaupt zwi-

schen den die freien carbonylgruppehaltigen Stoffen (Aldehydspiritusse, Aldehyde, Ketone) und den die primären aminogruppehaltigen Stoffen (Eiweißen, Aminosäuren, Aminen) erfolgt. Die Anwesenheit von primären Aminogruppen ist dabei maßgebend. Aus der Reaktion resultieren Melanoidine (gefärbte Stoffe). In den Melanoidinen wurden die mit 2,6-Dichlorphenolindophenol reduzierenden Gruppen nachgewiesen. Chromatographisch wurde im Reaktionsgemisch die Anwesenheit von Oxymethylfurfural nachgewiesen.

Tilgner (5) meint, daß der Geruch und Geschmack von den mit Wasserdampf flüchtigen Rauchkomponenten (Aldehyden, Ketonen, Säuren, Phenolen) abhängt. Er hält einen großen Gehalt an Säuren für unerwünscht. Die Phenolverbindungen scheinen hingegen wichtig zu sein. Wir verfügen leider über keine ausführlicheren Angaben betreffs der Rolle einzelner Räucherkomponenten.

Die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit war die Klärung der Frage, ob die Rauchkomponenten eine chemische, Reaktion mit Fleischbestandteilen, hauptsächlich mit Eiweißen und deren Zerfallsprodukten, eingehen oder ob sie bloß von denselben adsorbiert werden.

Zu diesem Zweck wurde die Reaktion der Amino- und Sulfhydrylgruppen, die die freien Aminosäuren, Fleischeiweiße sowie Hämoglobin enthalten, zunächst direkt mit dem Räucherrauch, ferner mit den aus den Rauchkondensaten gewonnenen einzelnen Fraktionen (Phenol-, Neutral-, Säuren- und Basenfraktionen) studiert. Danach wurde die Phenolfraktion eingehender untersucht. Sie wurde durch Destillation auf engere Fraktionen getrennt. Schließlich wurde das Verhalten der einzelnen Phenolverteter in Cysteinlösungen überprüft.

Methodik

Die Lösungen von Aminosäuren und anderen zu untersuchenden Verbindungen sowie auch von Hämoglobin und Fleischbrät wurden in eine Zellglashülle untergebracht und geräuchert. Die Räucherung wurde entweder in einem geschlossenen Gefäß mit zwei Tuben, durch welche der Rauch mit Hilfe der Vakuum-Pumpe aus der Verbrennungskammer durchgesaugt wurde oder unmittelbar in der Räucherkammer bei 20°C während 2 Stunden geräuchert.

Ferner wurden zur Untersuchung eine Phenolfraktion (Reinphenolegemisch), Neutralfraktion (ein Gemisch aus Aldehyden, Ketonen, Aldehydspiritussen usw.), Fraktionen der organischen Säuren und Basen gewonnen.

Einige Fraktionen wurden uns liebenswürdig von Dr. W.J. Kurko und L.F. Kelmann zur Verfügung gestellt. Die Trennung von Rauchkondensat haben sie mit der üblichen Methode der Gruppenanalyse durchgeführt. Die Phenolfraktion wurde mit Hilfe der Vakuum-Destillation unter Restdruck von 3-4 mm QS getrennt. Die zweite Fraktion wurde bei 64-70°, die fünfte - bei 79-89°, die achte - bei 111 - 114°C gewonnen.

In der zweiten Fraktion sind Phenol, Guajakol, M-Kresol identifiziert worden; in der fünften - M-Kresol, Guajakol, Methylguajakol, Spuren von Pyrogallolmethyläther und in der achten sind Methyläther des Pyrogallols (oder dessen Derivate) identifiziert worden.

Ein Teil der Fraktionen wurde mit Hilfe von Ionenaustauscher-Adsorbenten erhalten. Von allen Fraktionen wurden 1%-ige Wasserlösungen hergestellt, 0,5 ml von welchen zu 10 ml der Aminosäurelösungen und anderen zu untersuchenden Verbindungen mit der Konzentration 0,002 M oder 0,1% zugesetzt wurden.

368

Zum Studium der infolge der Reaktion zwischen Fleisch und Räucherrauch-Gesamtfraktionen erfolgenden Veränderungen wurde 5g Fleisch genommen, 0,5 ml 10%-iger Lösung der zu untersuchenden Fraktion zugesetzt, sorgfältig durchgemischt, unmittelbar und nach zwei Stunden wurde das Homogenat (1:10) hergestellt, worin Aminstickstoff, Sulfhydrylgruppen und pH bestimmt wurden.

Das Fleisch wurde mit den zweiten, fünften und achten Phenolfraktionen bei 20°C unter Zusatz von 0,5 ml 1%-iger Fraktionlösung pro 20g Fleischbrät behandelt.

Das Aminostickstoff wurde nach Van-Slyke, Sulfhydrylgruppen - durch amperometrische Fitrierung nach Kolthoff und Harris (10) bestimmt. Außerdem wurde der pH-Verlauf verfolgt, wobei die Messungen mit dem pH-Meter ЛP-59 mit der Glaselektrode vorgenommen wurden.

Versuchsteil

Zunächst wurde die Wechselwirkung zwischen den Amino- und Sulfhydrylgruppen und Räucherrauchkomponenten untersucht. Aus der Tab.1 ist die Veränderung der Aminogruppen in Adenylsäure, Karnosin, Methionin und Thiamin sowie in Hämoglobin und Fleischeiweißen unter der Einwirkung von Räucherrauch ersichtlich (es werden Durchschnittswerte von drei Versuchen angegeben).

Tabelle 1

Substrate	Aminostickstoff in mg %		% zur Ausgangsmenge
	Vor der Räucherung	Nach der Räucherung	
Methionin, 0,1%-ige Lösung	9,61	8,35	86,7
Cystamin, 0,1%-ige Lösung	6,07	4,77	78,4
Adenylsäure, 0,1%-ige Lösung	5,03	3,90	65,6
Karnosin, 0,1%-ige Lösung	9,38	6,50	69,7
Hämoglobin	40,0	25,0	62,5
Rindfleisch	28,57	20,92	73,1
Schweinefleisch	26,61	18,30	68,7

Wie aus der Tab.1 hervorgeht, nimmt im Laufe der Räucherung die Aminostickstoffmenge in Methioninlösungen um 15% und in der Lösungen anderer Verbindungen um 22-35% ab.

Im Fleisch und Hämoglobin wird nach der Räucherung um 25-35 Prozent weniger Aminostickstoff gefunden (als vor der Räucherung).

Die Veränderung der Sulfhydrilgruppen in Cystein- und Glutathionlösungen sowie im Fleisch unter der Einwirkung von Räucherrauch ist aus der Tab.2 zu ersehen (es werden Durchschnittswerte von vier Versuchen angegeben).

Tabelle 2

Substrate	SH-Gruppen		% zum Ausgangswert
	Vor der Räucherung	Nach der Räucherung	
Cystein, 0,1%-ige Lösung, M/ml	7,70	0,18	2,4
Glutathion, 0,1%-ige Lösung, M/ml	3,00	0,13	4,0
Rindfleisch, µM pro 100mg Ausgangsgewicht	1,20	0,50	40,0

Die in der Tab.2 dargestellten Werte zeigen deutlich, daß die Menge der Sulfhydrylgruppen in Cystein- und Glutathionlösungen, die 2,4 - 4,0% vom Ausgangswert ausmacht, nach der Räucherung kräftig abnimmt. Im Fleisch wurde nach der Räucherung etwas mehr SH-Gruppen nachgewiesen - etwa 40% zur Ausgangsmenge.

Beim Räuchern von 0,1%-igen Aminosäurelösungen, anderen Verbindungen sowie von Fleisch nimmt der pH-Wert ab. In der Tab.3 sind die Durchschnittswerte von drei Versuchen angeführt.

Tabelle 3

Die zu untersuchenden Verbindungen	pH vor der Räucherung	pH nach der Räucherung
Cystein	4,45	2,75
Glutathion	3,20	2,80
Methionin	6,00	2,85
Thiamin	3,50	2,75
Karnosin	7,30	3,10
Adenylsäure	3,25	2,80
Fleischauszug 1:10	5,65	5,32

Wie aus der Tab.3 ersichtlich ist, nehmen die pH-Werte aller untersuchten Lösungen (außer dem Fleischauszug) bis auf 2,7 - 3,1 ab, vom Ausgangswert (bei Karnosin pH=7,3, bei Methionin pH=6,0) unabhängig. Im Fleisch mit großer Pufferkapazität erfolgt eine unbedeutende pH-Senkung -von 5,65 bis 5,32. Die Umgebungsbedingungen, unter welchen die Reaktion mit den Räucherrauchkomponenten im Fleisch und in den geprüften Lösungen vor sich geht, sind nicht gleich; das betrifft auch den pH-Wert.

370

Nachdem es festgestellt worden war, daß beim Räuchern mit dem Rauch die Zahl von Sulfhydryl- und Aminogruppen in den Aminosäurelösungen, wie auch im Fleisch, abnimmt, brauchten wir zu bestimmen, was für eine Fraktion vom Rauchkondensat (Phenol -, Neutral-Verbindungen-, Säuren- oder Basenfraktion) mit diesen Gruppen reagiert. Zu diesem Zweck wurden Sonderversuche angestellt.

Aus der Tab. 4 ist die Veränderung der Aminogruppenzahl unter Einwirkung von Wasserlösungen verschiedener Fraktionen (in mg%) ersichtlich.

Tabelle 4

Substrate	Kontrolle	Unmittelbar nach dem Zusatz	nach 2 Stunden
	Neutralfraktion		
Methionin, 0,1%-ige Lösung	9,30	9,08	9,08
Glutaminsäure, 0,1%-ige Lösung	9,20	8,40	8,20
	Phenolfraktion		
Methionin, 0,1%-ige Lösung	9,30	9,26	9,36
Glutaminsäure, 0,1-ige Lösung	9,20	9,04	9,21

Die Ergebnisse der Untersuchung von Aminogruppenveränderung im Fleisch (im Wasserauszug 1:10) unter Einwirkung von Rauchkondensaten sind in der Tab.5 angeführt (Durchschnittswerte von 4 Versuchen).

Tabelle 5

Fraktion	Aminostickstoff, mg%		
	Kontrolle	unmittelbar nach dem Zusatz	nach 2 Stunden
Neutralfraktion	14,4	14,1	14,1
Phenolfraktion	14,4	14,3	14,5
Säurenfraktion	14,4	13,9	13,9
Basenfraktion	14,4	14,5	14,5

Wie es aus diesen Werten ersichtlich ist, hat der Zusatz von Neutral- und Säurenfraktionen zum Fleisch die Herabsetzung von Aminostickstoffgehalt zur Folge, während der Zusatz von Phenol- und Basenfraktionen keine Veränderungen im Aminostickstoffgehalt hervorruft.

In der Tab.6 ist die Veränderung der SH-Gruppen-Menge in den Cystein- und Glutathionlösungen sowie auch im Fleisch unter der Einwirkung von 1%-iger Wasserlösung dieser Fraktionen wiedergegeben.

Substrate	Kontrolle	Sofort nach dem Zusatz	Nach 2 Stunden
		SH-Gruppen	
Neutralfraktion			
0,002 M - Cysteinlösung, µM in 1 ml	2,03	1,99	1,71
0,002 M - Glutathionlösung, µM in 1 ml	1,31	1,17	1,17
Frisches Rindfleisch, µM in 100 mg	1,24	1,23	1,17
Phenolfraktion			
0,002 M - Cysteinlösung µM in 1 ml	2,01	1,58	1,42
0,002 M - Glytathionlösung µM in 1 ml	1,31	0,76	0,76
Frisches Rindfleisch, µM in 100 mg	1,25	1,09	0,97
Basenfraktion			
0,002 M-Cysteinlösung, µM in 1 ml	1,97	1,94	1,92
0,002 M - Glutathionlösung, µM in 1 ml	1,24	1,20	1,20
Frisches Rindfleisch, µM in 100 mg	1,30	1,18	1,18
Säurenfraktion			
0,002 M-Cysteinlösung µM in 1 ml	2,06	2,02	2,00
0,002 M-Glutathionlösung, µM in 1 ml	1,26	1,26	1,28
Frisches Rindfleisch, µM in 100 mg	1,30	1,30	1,30

Wie der Tab.6 zu entnehmen ist, übt die Phenolfraktion unter den gegebenen Versuchsverhältnissen den bedeutendsten Einfluß auf den Gehalt an SH-Gruppen. Der Zusatz von Säurenfraktion beeinflußte den Gehalt an SH-Gruppen nicht. Basen- und Neutralfraktionen sind nur von einem geringen Einfluß.

Die Trennung des Räucherkondensates auf die Gesamtfraktionen der Phenole, Neutralverbindungen, Säuren und Basen ermöglichte es, die am meisten aktive mit den Sulfhydrylgruppen der geprüften Lösungen und des Fleisches reagierende Fraktion zu gewinnen. Als solche erwies sich die Gesamtfraktion der Phenole.

Die Gesamtfraktion der Phenole wurde durch Vakuum-Destillation auf engere Fraktionen geteilt. Davon wurden dem Aroma nach die zweite, fünfte und achte Fraktionen als am meisten zur Aromabildung geeignete gewählt.

Es schien uns interessant, das Verhalten von Amino- -und Sulfhydrylgruppen im Fleisch sowie in Glutathion- und Cysteinlösungen unter der Einwirkung der genannten Fraktionen zu verfolgen.

Die Tab.7 stellt die Veränderung von Aminostickstoff und pH dar (es werden Durchschnittswerte von vier Versuchen angegeben).

Tabelle 7

Rindfleisch	PH	Aminostickstoff in mg%	% zum Ausgangswert
Unbehandeltes	5,8	8,80	100,0
Nach der Behandlung mit II.Fraktion	5,6	3,46	62,0
Nach der Behandlung mit III. Fraktion	5,5	6,41	72,8
Nach der Behandlung mit III. Fraktion	5,5	8,13	92,8

Wie aus der Tab.7 ersichtlich ist, verläuft die Reaktion (im Gegensatz zu der Gesamtfraktion der Phenole) zwischen den Fleisch-Aminogruppen und engen Phenolfraktionen, weniger intensiv verläuft sie mit den Phenolen der VIII. Fraktion.

In der Tab.8 ist die Veränderung der Sulfhydrylgruppen im Fleisch und Cystein- und Glutathionlösungen unter der Einwirkung derselben Phenolfraktionen gezeigt (Durchschnitt von 4 Versuchen).

Tabelle 8

Behandlungsart	Cystein in µM auf 1 ml	Glutathion in µM auf 1 ml	Fleisch in µM auf 100 mg
Kontrolle	0,97	0,95	1,36
Nach der Behandlung mit der II. Fraktion	0,91	0,94	1,30
Nach der Behandlung mit der V. Fraktion	0,91	0,90	1,27
Nach der Behandlung mit der VIII. Fraktion	0,69	0,38	0,89

Wie aus der Tab.8 zu ersehen ist, reagiert die VIII. Fraktion mit den Sulfhydrylgruppen sehr aktiv; darin sind Methyläther des Pyrogallols sowie dessen Derivate enthalten. Hingegen reagieren die II. und V. Fraktionen, die sonst mit den Aminogruppen leicht Reaktionen eingehen, mit den Sulfhydrylgruppen fast nicht.

Zusätzlich wurde die Veränderung des Gehalts an Sulfhydrylgruppen in der 0,001 M-Cysteinlösung unter Einwirkung von einigen in äquimolaren Mengen genommenen Phenole studiert.

	SH-Gruppen µM/Lml
Cystein 0,001 M	0,92

Derivate

Methyläther des Pyrogallols oder dessen/enthaltenden Fraktion zeugen deutlich davon, daß sich beim Räuchern chemische Reaktionen auslösen, woraus neue Verbindungen entstehen, in welchen der Sulfhydrylgruppe-Schwefel mit den Polyphenolen und deren Derivaten reagiert.

Es ist zu beachten, daß die genannten Reaktionen recht intensiv bei 20°C vor sich gehen.

Eine ungenügende Aktivität der Neutralfraktion, die sich hauptsächlich aus Carbonylverbindungen zusammensetzt, ist offensichtlich bei der Reaktion mit den Aminogruppen dadurch zu erklären, daß die Versuche ohne Erwärmung durchgeführt wurden. Bekanntlich geht die Reaktion zwischen Aminogruppen und Carbonylverbindungen (die Maillard's Reaktion) unter

Beachtenswert ist, daß die höhersiedende Phenolfraktion, die Methyläther des Pyrogallols und dessen Derivate enthält, mit den Sulfhydrylgruppen besser reagiert, als die niedrig siedenden Phenol-, Guajakol,- M - Kresol-, Methylguajakolhaltige Fraktionen, die letzteren reagieren intensiver mit den Aminogruppen. Also hängt die Reaktionsfähigkeit der Phenolfraktion von den einzelnen Phenolen ab, aus welchen sie zusammengesetzt ist. Darunter können einige mit einer, die anderen - mit den beiden Funktionalgruppen (Amino- sowie Sulfhydrylgruppe) reagieren, was die Möglichkeit zur Bildung von verschiedenen chemischen Verbindungen beim Räuchern noch erweitert.

nach der Behandlung mit

Pyrogallol	0,75
Pyrokathechin	0,78
Resorcin	0,80
M - Kresol	0,83
Guajakol	0,88

Wie diese Versuche ergaben, reagiert Pyrogallol mit den Sulfhydrylgruppen des Cysteins am aktivsten. Es ist offensichtlich durch die Menge der Phenol-Hydroxylgruppen bedingt: Pyrogallol enthält 3 Gruppen und reagiert intensiver als M - Kresol und Guajakol.

Zusammenfassung

Die in der vorliegenden Arbeit angeführten Versuchsangaben zeugen davon, daß im Laufe der Räucherung die Reaktionen zwischen den Funktionalgruppen der Fleischeiweiße und Räucherkomponenten des Rauchs vor sich gehen.

Es wurde festgestellt, daß die Phenolfraktion des Räucherrauchs die größte Reaktionsfähigkeit besitzt. Die Fraktion der Neutralverbindungen reagiert mit den Sulfhydryl- und Aminogruppen recht schwach. Die Säurenfraktion bewirkt eine unwesentliche Verminderung der Zahl der Aminogruppen und die Basenfraktion - der Zahl der Sulfhydrylgruppen.

Die erhaltenen Resultate bestätigen völlig die von uns angenommene Theorie der chemischen Wechselwirkung zwischen den Räucherrauchkomponenten und den Fleischbestandteilen, namentlich den Eiweißen.

Eine starke Herabsetzung der Sulfhydrylgruppenmenge bei der Behandlung des Fleisches unmittelbar mit dem Räucherrauch, ebenso wie bei dessen Beeinflußung von der aus dem Rauch isolierten Gesamtphenolefraktion, oder von einer engeren die

Зак.218 ВНИИМП

I4. "The chemistry and technology of leather",
F.O'Flaherty, W.T.Roddy, R.M.Zollar, vol.1, New-York,
I956.
I5. Hauck R., Lollar R., ALCA, 53, 3(I958).
I6. Safarik P. "Mikrobiologe kozelustvi", Kozarstvi, 6, I956.
I7. Kritzinger C.C., Zgl J., ALCA, 49, 3, I954.
I8. "Beef, veal and lamb p operations", Chicago, I954.
I9. Kritzinger C.C., ALCA, 49, 3, I954; ALCA, 37, 6, I953.
20. Hausem W., Rev. techn. inds cuir, 47,3,I955.

VII