

DAS AUFTRETEN VON NEUTRALLEN MONOCARBONYLVERBINDUNGEN  
IN DER REIFENDEN ROHWURST

H.J.Langner, U.Heckel, E.Malek

Lebensmittel können sehr komplex zusammengesetzte Produkte sein. Solcherart sind z.B. unsere Fleischwaren, die aus chemisch sehr unterschiedlichen Komponenten bestehen. Diese Komponenten umfassen bei den Fleischwaren eine große Skala von Substanzen- Fett, Wasser, Eiweiß, Vitamine, Farbstoffe, flüchtige, nicht flüchtige und viele weitere Stoffe-, die bei der technologischen Gewinnung, bei der Verarbeitung und bei der Lagerung vielfältige Veränderungen, erwünschter oder nicht erwünschter Art, erfahren können. Diese Veränderungen während des Fabrikations- und Lagerungsprozesses müssen technologisch so geführt werden, daß das herzustellende Produkt, ohne Qualitätseinbuße für den Verbraucher gefertigt werden kann. Insbesondere sind es dabei Geruchs- und Geschmacksabweichungen, die den Verkaufswert einer Ware beeinflussen. In der Regel führen diese Veränderungen daneben zu einer Verminderung des biologischen Wertes der Produkte. Die Auffindung der Ursachen dieser Qualitätseinbußen ist meistens mit sehr großen Schwierigkeiten verbunden, da man heute vielfach noch nicht, die in solchen komplexen Gemischen ablaufenden physikalischen und chemischen Vorgänge erfassen kann. Empirie und handwerkliches Können müssen heute immer noch an die Stelle von wissenschaftlich fundiertem Wissen treten. Erst in neuerer Zeit versucht man in zunehmendem Maße Einblick in die physikalischen und chemischen Zusammenhänge zu erhalten, die zu den Qualitätseinbußen nach der Herstellung eines Lebensmittels führen. Dafür verantwortliche Verbindungen und ihre mögliche Wechselwirkungen zu identifizieren ist Aufgabe der in der Qualitätsforschung tätigen Wissenschaftler. Dieses Problem zu lösen ist heute durch den Einsatz modernster Analyseverfahren wesentlich leichter geworden, und so sind gerade in letzter Zeit viele neue Verbindungen gefunden worden, die zu Geruchs- und Geschmacksabweichungen in den Lebensmitteln beitragen können. Kennt man diese Stoffe exakter und weiß um ihre Entstehung, kann man durch Variation in der Technologie bei der Lagerung usw. ihre Entstehung in gewünschter Weise verhindern, oder im positiven Falle vermehren.

Eine am Geschmacks- und Geruchssystem intensiv beteiligte Gruppe chemischer Substanzen sind die Carbonylverbindungen mit denen wir uns in dieser Arbeit insbesondere beschäftigen. Einzelne Vertreter dieser Stoffklasse sind sensorisch noch in Ver-

dünnungen von 1:10<sup>11</sup> feststellbar und liegen damit gerade noch im Nachweisbereich der chemischen Analyse.

In dieser Arbeit werden die Umsetzungen, die bei den neutralen Monocarbonylverbindungen während der Rohwurstreifung auftreten verfolgt. Um den Einfluß der an der Reifung beteiligten Mikroorganismen kennenzulernen, wurden 8 verschiedene Chargen Salami aus 2 verschiedenen Ausgangsmaterialien mit 3 unterschiedlichen Reinkulturen von Mikroorganismen (Starterkulturen) hergestellt. Es interessierte dabei insbesondere der Einfluß, den diese verschiedenen Starterkulturen auf den Carbonylgehalt haben. Dazu mußten die Monocarbonylverbindungen quantitativ isoliert und identifiziert werden. Es sollte ferner festgestellt werden, ob und wie sich diese Verbindungen während der Reifungs- und Lagerzeit verändern.

Die Untersuchungen von Hornstein et al. (1-7) über das charakteristische Aroma von Lammfleisch zeigten, daß insbesondere die in Spuren vorkommenden Carbonylverbindungen für dieses Aroma verantwortlich zu machen sind. Die von ihnen isolierten und z.T. identifizierten Carbonyle waren überwiegend Abbauprodukte der Fettkomponenten. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen dieselben Autoren (1-7) bei ihren Untersuchungen des Aromas von Rind-, Schweine- und Schaffleisch. Sie fanden dabei wiederum, daß Carbonylverbindungen entscheidend am Aufbau des Fleischaromas beteiligt sind. In weiteren Untersuchungen konnten diese Autoren (1-7) zeigen, daß alle diese Verbindungen aus wasserlöslichen "precursors" entstehen, und in engem Zusammenhang damit Reaktionen von Aminosäuren und reduzierenden Zuckern (Maillard-Produkte) ablaufen. Eser et al. (8) gelangten bei der Untersuchung des Aromas der Rohwurst zu ähnlichen Ergebnissen. Bei diesem Fleischfolgeprodukt erfolgen die Hauptumsetzungen und Veränderungen während der ersten 4 Reifungstage, wobei in dieser Zeit besonders die leichtflüchtigen Substanzen eine deutliche Zunahme erfahren. Im weiteren Verlaufe der Reifung treten nach ca. 3 Wochen schwerer flüchtige Substanzen mengenmäßig in den Vordergrund. Lea et al. (9) untersuchten mit eigenen Methoden die Veränderungen der flüchtigen Carbonylverbindungen im gekochten Geflügelfleisch und fanden, daß je nach Behandlungsart die Anteile der Carbonyle aus den wasserlöslichen oder fettlöslichen Teilen des Fleisches in unterschiedlichen Mengen auftraten. Daneben spielt die Fleischfarbe der einzelnen Tierteile eine große Rolle bei der Freigabe von Carbonylverbindungen. Untersuchungen von Zaika et al. (10) zeigten, daß "precursors" wie Stickstoffverbindungen, Zuckerkomponenten und aromatische Kohlenwasserstoffe Ausgangssubstrate für die flüchtigen Verbindungen im Rindfleisch sind. Ockerman et al. (11-12) fanden im gekochten Schinken 3 Aldehyde und 4 Ketone, die ihrer Meinung nach entscheidend am Aufbau des typischen Schinkenaromas beteiligt sind. Lillard et al. (13) konnten bei ähnlichen Untersuchungen 17 weitere Carbonylverbindungen in diesem Produkt nachweisen, die insbesondere aus der Lipidfraktion isoliert werden konnten. Ungesättigte Fettsäuren sind dabei entscheidend bei der Biosynthese von Carbonyl-

Verbindungen beteiligt. Diese Autoren fanden Neben Alk-2-enalen auch erhebliche Mengen an Alk-2-dienalen.

Während bei anderen Lebensmitteln z.T. schon bekannt ist welche Carbonylverbindungen unter anderem zu Geschmacksabweichungen führen, ist das bei der reifenden Rohwurst nicht der Fall. Soviel aber scheint sicher zu sein, daß die Verbindungen mit abweichendem Geruch und Geschmack ganz bestimmten Verbindungsklassen angehören, z.B. den n-Alkanalen, Alk-2-enalen und Alk-2.4.-dienalen. Ihre zusammengesetzte Einheit bedingt sicher auch in den Fleischwaren mehr oder weniger das typische Aroma.

### Eigene Untersuchungen:

#### Untersuchungsmaterial:

Hergestellt wurden Versuchschargen (Salami) à 4 kg bestehend aus:

##### Serie 1

Rindfleisch, frisch, über Nacht gepökelt mit Nitritpökelsalz	1,5 kg
Schweinefleisch, mager	1,5 kg
Rückenspeck	1,0 kg

##### Serie 2

wie oben, nur unter Verwendung von tiefgefrorenem, argentinischem Bullenfleisch anstelle des frischen Rindfleisches.

Diese Ausgangsmaterialien wurden jeweils getrennt einmal mit der 13 mm Scheibe vorgeschrotet.

#### Gewürze/kg Fleisch- u. Fettmenge:

2,0 g Pfeffer, weiß, gemahlen
0,5 g Pfeffer, ganze Körner
0,5 g Paprika, edelsüß
0,5 g Kardamon
0,3 g Muskatnuß, gemahlen
0,1 g Knoblauch, frisch
0,5 g Glutalin
5,0 g Kristallpur
25,0 g Nitritpökelsalz

#### Abfüllung:

Mitteldarm, Kaliber 5/6 cm

Die Abfüllung erfolgte im Mitteldarm zu 500g Gewicht.

Eine Charge (Kontrolle) reifte mit der vorhandenen Spontanflora, den anderen Chargen wurden folgende Kulturen zugesetzt.

1. Kontrolle (Spontanflora)
2. Lactobacillus plant.  $1,2 \times 10^7$ /g Wurst
3. " nov. spec.  $4,5 \times 10^6$ /g Wurst
4. Atypisches Streptobacterium Rv2f1a  $6,0 \times 10^6$ /g Wurst

Die Serie, unter Verwendung von Gefrierfleisch hergestellt, wurde mit römischen Ziffern I-IV gekennzeichnet, die andere Serie mit arabischen Zahlen. Die Würste wurden 48 Std. bei  $22^\circ\text{C}$  und 95%iger Luftfeuchtigkeit geschwitz, danach unter fließendem, kaltem Wasser abgewaschen und 2 Tage bei  $18^\circ\text{C}$  und 85%iger Luftfeuchtigkeit geräuchert. Die Lagerung erfolgte dann bei  $15^\circ\text{C}$  und 70%iger Luftfeuchtigkeit.

Die Probeentnahme erfolgte direkt nach der Abfüllung, und weiter am 5. - 12. - 21. - 42. Tag nach der Herstellung. Diese Proben tragen den Index a,b,c,d.

#### Isolierung der Carbonylverbindungen aus der Rohwurst

Wie schon eingangs erwähnt, kommen die Carbonylverbindungen in unseren Lebensmitteln nur in sehr geringen Konzentrationen vor. Es ist deshalb erforderlich von größeren Ausgangsmaterialmengen bei der Isolierung auszugehen. Die quantitative Isolierung der Carbonylverbindungen, insbesondere aus einem so komplex zusammengesetzten Material, wie es die Rohwürste darstellen, ist ausgesprochen problematisch.

500 g Salami werden 3 mal unter Verwendung der 2 mm Scheibe durch den Fleischwolf gegeben und diese Masse anschließend im Mixer homogenisiert.

200 g der homogenen Probe werden mit 800 ml 5%iger Perchlorsäure im Mixer ca. 5 Min. homogenisiert. Das Homogenisat bleibt 24 Std. bei  $4^\circ\text{C}$  stehen. Danach wird mit 8000 U/Min. zentrifugiert. Der klare Überstand wird mit ca. 10 g Kieselgur versetzt und über einen Faltenfilter abfiltriert. 600 ml Filtrat werden mit 100 ml einer 1%igen Lösung von 2.4.-Dinitrophenylhydrazin in 35%iger Perchlorsäure versetzt. Diese Lösung bleibt 24 Std. im Kühlschrank stehen und wird danach 4 mal mit 100 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformphasen werden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach dem quantitativen Abfiltrieren von dem Natriumsulfatkuchen wird das Chloroform im Rotationsverdampfer bei  $35^\circ\text{C}$  und 20 Torr abgezogen. Der Rückstand im Kolben wird 3 mal mit 100 ml heißem n-Hexan digeriert. Die vereinigten Hexanextrakte werden über Natriumsulfat getrocknet und anschließend in einer ersten Stufe säulenchromatographisch gereinigt.

## Säulenfüllung und Chromatographie

15 g Seasorb und 25 g Celit 545 werden im Mörser intensiv vermischt. Dieses Trägermaterial wird in eine mit n-Hexan gefüllte Glassäule eingefüllt. Der gewonnene Hexanextrakt wird auf die so vorbereitete Säule gegeben und anschließend mit 100 ml n-Hexan nachgespült. Alle Umsetzungsprodukte, einschließlich des nicht umgesetzten 2.4.-Dinitrophenylhydrazins werden am Kopf der Säule scharf fixiert. Die Monocarbonylderivate werden von den Begleit-substanzen mit Nitromethan - Chloroform 1:3 (v/v) getrennt. Dazu sind etwa 250 ml ELUiergemisch erforderlich. Bei dieser fraktionierten Eluierung treten mehrere intensiv gefärbte Zonen in der Säule auf. Die angegebene Menge Nitromethan - Chloroform eluiert von der Säule aber nur die Mono-2.4.-Dinitrophenylhydrazone und die Ketoglyzerid-2.4.-Dinitrophenylhydrazone. Das Nitromethan und das Chloroform werden im Rotationsverdampfer bei 30°C und 25 Torr abgezogen.

## Abtrennung der Ketoglyzerid-2.4.-Dinitrophenylhydrazone

25 g Aluminiumoxyd neutral der Aktivitätsstufe 1 werden mit 5 Gew.% Wasser desaktiviert. Das desaktivierte Aluminiumoxyd wird mit n-Hexan in ein Chromatographierohr von 2 cm Durchmesser eingeschwenkt.

Der Nitromethan-Chloroform-Rückstand wird in möglichst wenig n-Hexan aufgenommen und vorsichtig auf die Aluminiumoxydsäule gegeben. Die Säule wurde zunächst mit 100 ml n-Hexan gewaschen und dann mit einer Mischung Benzol - n-Hexan 1:1 (v/v) entwickelt. Ca. 250-350 ml dieser Mischung waren erforderlich um die neutralen 2.4.-Dinitrophenylhydrazone zu eluieren. Vorhandene Ketoglyzerid-2.4.-Dinitrophenylhydrazone bilden eine kräftig orange gefärbte Zone in der oberen Schicht der Säule aus. Diese Zone wandert nur sehr langsam und trennt sich dabei in mehrere Fraktionen auf. Der Benzol - n-Hexanextrakt wird im Vakuum bei ca. 20 Torr und 40°C im Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit wenigen Milliliter Essigsäure-äthylester quantitativ in einen 10 ml Meßkolben überführt und dient zur weiteren Fraktionierung mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. Die Trennung gestaltet sich im allgemeinen besonders schwierig, wenn die Konzentrationen der ersten 2 Anfangsglieder z.B. Formaldehyd und Acetaldehyd verhältnismäßig hoch sind, was sehr häufig der Fall ist; es trifft für geräucherte Fleischwaren besonders zu.

## Präparative Vorfraktionierung der 2.4.-Dinitrophenyl-

### hydrazone auf Kieselgelschichten

Die Herstellung der Kieselgel-G-Schichten auf den Glasplatten erfolgte in üblicher Weise, mit dem Unterschied, daß die Schichtdicke je Platte auf 0,75 mm erhöht wurde.

5 ml des Essigsäure-Äthylesterextraktes werden unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft und der Rückstand in ca. 0,5 ml Methylenchlorid gelöst, und als Punktreihe ca. 1 cm oberhalb der Startlinie auf die Kieselgelschicht aufgetragen. Entwickelt wurden die Platten 3 mal mit Benzol - n-Hexan 60:40 (v/v) (14).

Laufstrecke: 2 mal 10 cm, 1 mal 12 cm.

Das Chromatogramm wurde anschließend je nach Trennstrecke der Platten in 2 - 4 Zonen unterteilt, die Trägerschicht jeder Zone sorgfältig von der Platte abgeschabt und die 2.4.-Dinitrophenylhydrazone mit Chloroform aus dem Trägermaterial eluiert.

### Quantitative Bestimmung der neutralen Gesamtcarbonylverbindungen

1 ml Essigsäureäthylesterextrakt wird im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit Chloroform in 10 ml Meßkolben überführt. Von dieser Chloroformlösung wird bei 360 nm die Extinktion ermittelt und mit einem durchschnittlichen molaren Extinktionskoeffizienten von 22 200 der Gehalt an neutralen Monocarbonylverbindungen, mit einem mittleren Molekulargewicht von 72, berechnet.

nachfolgenden Tabelle sind die gefundenen Mengen in der  
 zeit als Mol/100 g aufgeführt.

$6,77 \times 10^{-4}$	1		$1,02 \times 10^{-3}$
$5,03 \times 10^{-4}$	1	a	$5,44 \times 10^{-4}$
$1,04 \times 10^{-3}$	1	b	$3,86 \times 10^{-4}$
$5,71 \times 10^{-4}$	1	c	$7,67 \times 10^{-4}$
$5,58 \times 10^{-3}$	1	d	$3,59 \times 10^{-4}$
$9,90 \times 10^{-4}$	2		$1,08 \times 10^{-3}$
$2,45 \times 10^{-4}$	2	a	$7,94 \times 10^{-4}$
$5,43 \times 10^{-4}$	2	b	$9,94 \times 10^{-4}$
$3,97 \times 10^{-4}$	2	c	$9,83 \times 10^{-4}$
$6,31 \times 10^{-4}$	2	d	$6,57 \times 10^{-4}$
$9,90 \times 10^{-4}$	3		$1,02 \times 10^{-3}$
$2,71 \times 10^{-4}$	3	a	$6,27 \times 10^{-4}$
$9,83 \times 10^{-4}$	3	b	$1,13 \times 10^{-3}$
$7,71 \times 10^{-4}$	3	c	$8,67 \times 10^{-4}$
$6,27 \times 10^{-4}$	3	d	$5,33 \times 10^{-4}$
	4		$3,38 \times 10^{-4}$
	4	a	$6,21 \times 10^{-4}$
	4	b	$1,13 \times 10^{-3}$
	4	c	$7,75 \times 10^{-4}$
	4	d	$5,33 \times 10^{-4}$

Die so grob vorgetrennten Carbonylverbindungen werden in einer weiteren säulenchromatographischen Stufe, an Seasorb-Cellit, in Verbindungsklassen aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen mit Hilfe einer Inversphasenchromatographie dünnschichtchromatographisch, an mit 2-Phenoxyäthanol imprägnierten Kieselgurschichten, in die Einzelverbindungen zerlegt.  
( Die exakte Arbeitsanweisung wird in der späteren Veröffentlichung angegeben.)

Von den isolierten Einzelverbindungen wurde das Absorptionsspektrum in Chloroform zwischen 330 und 440 nm aufgenommen. Die Konzentrationen lassen sich aus der Extinktion bei der Wellenlänge des Maximums berechnen.

Folgende neutralen Monocarbonylverbindungen konnten in der reifenden Rohwurst qualitativ nachgewiesen werden:

Methanal

Äthanal

Propanal

Propanon

n-Butanal

Butanon

But-2-enal

iso-Butanal

n-Pentanal

Pentan-2-on

Pent-2-enal

n-Hexanal

Hexan-2-on

Hex-2-enal

n-Heptanal

Hept-2-enal

n-Octanal

Oct-2-enal

n-Nonanal

Non-2-enal

n-Decanal

Dec-2-enal

Undecan-2-on

Tridecan-2-on

Pentdecan-2-on

Diacethyl

Die Platten zeigten 3 weitere, mit den uns zur Verfügung stehenden Vergleichssubstanzen aber nicht identischen Carbonylen.



L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. Hornstein, I., Crowe, P.F., Agric. Fd.Chem. 11, 147, (1963)
2. Hornstein, I., Crowe, P.F., J.Gas Chromat. 4, 128, (1964)
3. Hornstein, I., Crowe, P.F., Agric. Fd. Chem. 8, 494, (1960)
4. Hornstein, I., Crowe, P.F., Agric. Fd. Chem. 11, 147, (1963)
5. Hornstein, I., Crowe, P.F., Anal. Chem. 34, 1354, (1962)
6. Hornstein, I., Crowe, P.F., Agric. Fd. Chem. 8, 65, (1960)
7. Hornstein, I., Crowe, P.F., Sulzbacher, W., Nature 199, 1252, (63)
8. Eser, H., Niinivaara, F.P., Leb.unters.u.Forsch. 4, 124 (1964)
9. Lea, C.H., Hobson-Frohock, A.J.Fd.Technol. 2, 79 (1967)
10. Lea, C.H., Swoboda, P.A.T., Chemy. Ind. 1289, (1958)
11. Ockerman, H.W., Ph. D. Thesis (1961)
12. Ockerman, H.W., Blumer, T.N. Craig, H.B. J.Fd.Sci.29, 123(1964)
13. Schwartz, D.P., Parks, O.W. Anal. Chem. 34, 1396, (1961)
14. Walther, M. Dissertation Berlin 1967, D 83