

R. HAMM, K. POTTHAST und L. ACKER

Institut für Chemie und Physik der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach, BRD

Einfluß der Wasseraktivität auf enzymatische Veränderungen in gefriergetrocknetem Muskelfleisch

ZUSAMMENFASSUNG

Die enzymatischen Veränderungen in schlachtfrisch gefriergetrocknetem Fleisch während der Lagerung ist im Hinblick auf die Produktion von Trockenerzeugnissen zur Herstellung von Brühwurst erster Qualität von praktischem Interesse.

Während der Lagerung von schlachtwarm (prae rigor) gefriergetrocknetem Rindfleisch (Wassergehalt 2-3 %) werden bei relativen Luftfeuchtigkeiten (r.L.) unter 40 % ATP und Hexosen bzw. Hexosephosphate nicht abgebaut. Bei r.L. $\geq$ 40 % erfolgt die enzymatische Spaltung von ATP und Hexosephosphaten umso rascher, je höher die Wasseraktivität ist. Während des Hexose-Abbaues war keine Zunahme an C_3 -Metaboliten der Glykolyse festzustellen. Bei r.L. über 40 % nimmt die Aktivität der glykolytischen Enzyme während der Lagerung mit steigender Wasseraktivität ab. Glykogen wird selbst bei 97,5 % nicht abgebaut.

Eine enzymatische Hydrolyse von Triglyceriden und Cholesterinester des Gewebes war bereits bei 10 % r.L. zu beobachten und nahm mit steigender Wasseraktivität zu. Phospholipide werden jedoch nicht gespalten. Um geschmackliche Verschlechterungen während der Lagerung unter Luftabschluß zu vermeiden, sollte der Wassergehalt des gefriergetrockneten Fleisches 3 % nicht überschreiten.

Für die Enzymwirkung in gefriergetrocknetem Fleisch spielen neben dem unmittelbaren Einfluß der Wasseraktivität auch Mobilität und Molekülgröße von Substraten und/oder Enzymen sowie ihre Bindung an Strukturen eine Rolle.

R. HAMM, K. POTTHAST and L. ACKER

Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach, BRD

Influence of Water Activity on Enzymatic Changes in Freeze-dried Beef

The enzymatic changes in prerigor freeze-dried meat during storage are of practical importance with regard to the production of first-quality frankfurter-type sausages from freeze-dried material.

ATP, hexoses and hexose phosphates are not broken down during storage of prerigor freeze-dried beef (2 - 3 % moisture) at relative humidities (R. H.) below 40 %. Above 40 % R. H. the rate of enzymatic cleavage of these compounds increases with rising water activity. No increase in C_3 -metabolites of glycolysis occurs during the breakdown of hexose phosphates. The activity of glycolytic enzymes decreases with rising water activity during several months storage at R. H. above 40 %. Even at 97.5 % R. H. no glycogen is broken down.

Some enzymatic hydrolysis of tissue triglycerides and cholesterolin occurs at 10 % R. H. and increases with rising water activity. However, phospholipids are not broken down. In order to prevent sensory deterioration during storage in the absence of oxygen, the moisture content of freeze-dried meat should not exceed 3 %.

Not only the immediate influences of water activity but also mobility, molecular size and structural binding of substrates and enzymes are of importance to the effects of enzymes in freeze-dried meat.

R. HAMM, K. POTTHAST et L. ACKER

Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach.

Effet de l'activité de l'eau sur les changements enzymatiques dans la viande lyophilisée

Résumé

Les changements enzymatiques dans la viande chaude lyophilisée qui se produisent pendant le stockage, sont d'un intérêt pratique en ce qui concerne la production de produits lyophilisés destinés à la fabrication de saucisses bouillies de première qualité.

Pendant le stockage de la viande de boeuf lyophilisée prae rigor (Teneur en eau 2 - 3 %), le ATP et les hexoses, et les hexoses phosphoriques ne se décomposent pas, lorsque l'humidité de l'air n'atteint pas 40 %. Lorsque l'humidité de l'air atteint 40 %, et plus l'activité de l'eau est importante, la décomposition enzymatique des ATP et des hexoses phosphoriques se produit plus rapidement.

Pendant la décomposition des hexoses, on n'a constaté aucun accroissement de métabolites C_3 de glycolyse. Quand l'humidité de l'air dépasse 40 %, l'activité des enzymes glucosiques diminue pendant le stockage, alors que l'activité de l'eau devient plus importante. Le glucogène ne se décompose même pas, lorsque l'humidité de l'air est de 97,5 %.

Lorsque l'humidité de l'air était de 10 %, on pourrait déjà constater dans le tissu une hydrolyse enzymatique de triglycérides et de cholestérine qui augmentait, en même temps que l'activité de l'eau se faisait plus grande. - Cependant les phospholipides ne se décomposent pas. - Pour éviter les altérations de goût pendant le stockage à l'abri de l'air, la teneur en eau de la viande lyophilisée ne devrait pas dépasser 3 %.

La mobilité et la grandeur moléculaire des substrats et (ou) des enzymes ainsi que leur rapport à des structures et naturellement l'influence directe de l'eau jouent un rôle en ce qui concerne l'action des enzymes dans la viande lyophilisée.

R. HAMM, K. POTTHAST und L. ACKER

Institut für Chemie und Physik der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach, BRD

Einfluß der Wasseraktivität auf enzymatische Veränderungen in gefriergetrocknetem Muskelfleisch

EINLEITUNG

Die Grundlagen für die Zusammenhänge zwischen Enzymkatalyse und Wasseraktivität wurden bisher an Modellsystemen und einigen Lebensmitteln studiert. Über den Einfluß der Wasseraktivität auf enzymatische Vorgänge in gefriergetrocknetem Fleisch lagen bis 1974 noch keine Veröffentlichungen vor. Dabei bietet Fleisch wie kaum ein anderes biologisches Material die Möglichkeit zum Studium einer Vielzahl biochemischer Prozesse mit Hydrolyse- und Oxydations-Reduktions-Charakter. Besonders geeignet sind die folgenden Reaktionen, die bei der normalen Reifung des Fleisches post mortem ablaufen: 1. Die hydrolytische Spaltung des ATP zu ADP durch die ATPasen des Muskels und der weitere enzymatische Abbau von ADP; 2. Der anaerobe Abbau von Glykogen zu Lactat; 3. Die hydrolytische Spaltung von Muskellipiden durch die Lipasen des Gewebes. Derartige Untersuchungen lassen sich am besten mit schlachtfischem (prae rigor) Skelettmuskelfleisch durchführen, das noch hohe Gehalte an ATP und Glykogen aufweist. Die Gefrier Trocknung solchen schlachtfischen Fleisches und das Verhalten von so gewonnenem Trockenfleisch während der Lagerung ist auch von praktischem Interesse, da eine Kombination dieser Art der Fleisch Trocknung mit bestimmten Salzungsverfahren die Herstellung eines für die Brühwurstherstellung hervorragend geeigneten Trockenproduktes gestattet (1).

Anthron nach CARROLL et al. (10) als auch enzymatisch nach PFLEIDERER (11) ermittelt. Die Bestimmung der Muskellipide (Triglyceride, Diglycerid, Monoglycerid, Cholesterin, Colaminkephalin, Lecithin, Lysolecithin) und freien Fettsäuren erfolgte mit der dünn schicht chromatographischen Methode nach POTTHAST u. HAMM (12).

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Die Bestimmung des Glykogengehaltes von schlachtfischem (prae rigor) gefriergetrocknetem Rindfleisch während der Lagerung bei 40, 55, 70 und 97,5 % r.L. ergab, daß selbst bei der höchsten r.L. (Wassergehalt des Fleisches etwa 30 %) nicht der geringste Glykogen-Abbau eintrat. Dies läßt darauf schließen, daß Glykogen unter diesen Bedingungen noch zu wenig löslich ist oder aber als Makromolekül in den engen wassergefüllten Kapillaren zu wenig beweglich ist. Eine weitere Ursache könnte die Unbeweglichkeit der glykogenspaltenden Enzyme sein.

Im Gegensatz zum Glykogen werden die Metaboliten der Glykolyse mit Ausnahme von Lactat bei höheren r.L. abgebaut. Unterhalb von 40 % r.L. blieben diese Substanzen unverändert. Bei höheren r.L. war jedoch eine mit steigender Wasseraktivität zunehmende Geschwindigkeit des Abbaues von G-6-P, Glucose + G-6-P, Fructose + F-6-P und FDP festzustellen. Abb. 1 zeigt die Abbaukurven von Glucose + G-6-P; ganz ähnliche Kurven ergaben sich auch für G-6-P und Fructose + F-6-P, während sie bei FDP etwas anders verliefen (Abb. 2). Die Gehalte an Glucose + G-6-P (siehe Abb. 1) und Fructose + F-6-P strebten nach anfänglich beschleunigtem Abbau Endwerten entgegen, deren Höhe von der Wasseraktivität abhängig war. FDP wurde erst nach einer verzögerten Anfangsphase rasch abgebaut, um dann ebenfalls einem Grenzwert zuzustreben (Abb. 2).

Der Einfluß der Wasseraktivität auf den enzymatischen Abbau von ATP und seinen Metaboliten in gefriergetrocknetem Rindfleisch ist bereits von uns studiert worden (2). ATP wird bei relativen Luftfeuchtigkeiten (r.L.) unter 40 % (Wassergehalt des Fleisches etwa 7 %) nicht gespalten. Bei höheren r.L. werden ATP und ADP umso rascher zu Inosinmonophosphat abgebaut, je höher die r.L. ist. Da die Aktivitäten der betreffenden Enzyme selbst nach mehrmonatiger Lagerung des gefriergetrockneten Fleisches erhalten bleiben, wird ATP während der Rehydratation sehr rasch abgebaut. Die Ergebnisse bestätigten früher entwickelte Vorstellungen (3), wonach bereits im Bereich der Mehrschichtenadsorption der Sorptionsisotherme enge wassergefüllte Kapillaren existieren, in denen die Reaktionen bis zur Einstellung eines Gleichgewichts ablaufen. Unsere Untersuchungen wurden nunmehr auf den Abbau von Muskelglykogen und die hydrolytische Spaltung von Muskellipiden in Abhängigkeit von der r.L. ausgedehnt.

METHODEN

Die Gefrier Trocknung von Longissimus-dorsi-Muskel des Rindes auf einen Restwassergehalt von 2-3, die Lagerung des gefriergetrockneten Materials bei verschiedenen r.L., die Ermittlung der Sorptionsisotherme sowie die Extraktion der in Perchlorsäure löslichen Substanzen waren schon früher beschrieben worden (2). Im Perchlorsäure-Extrakt wurden Glucose-6-Phosphat (G-6-P) nach LAMPRECHT u. TRAUTSCHOLD (4), Glucose + G-6-P und Fructose + Fructose-6-Phosphat (F-6-P) nach KLOTZSCH u. BERGMAYER (5), Fructose-1,6-Diphosphat (FDP), Glycerinaldehydphosphat (GAP) und Dihydroxyacetonphosphat (DAP) nach BÜCHER u. HOHORST (6), Pyruvat nach BÜCHER et al. (7) und Lactat nach HOHORST (8) enzymatisch bestimmt. In dem nach GOOD et al. (9) aufgeschlossenen Gewebe wurde Glykogen sowohl mit

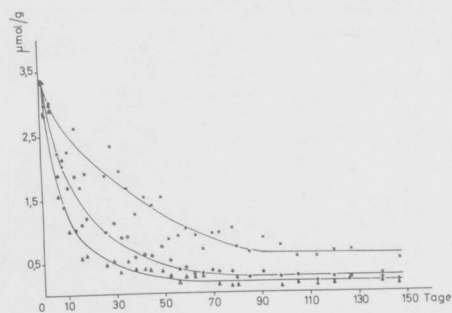


Abb. 1 Einfluß der Wasseraktivität auf den Abbau von Glucose + G-6-P in gefriergetrocknetem Fleisch während der Lagerung bei verschiedenen r.L.
x = 40 %, o = 55 %, Δ = 65 % r.L.

Neben der Enzymwirkung kommen als Ursache für die Abnahme der Kohlenhydrate während der Lagerung von gefriergetrocknetem Fleisch bei r.L. ≥ 40 % auch nichtenzymatische Reaktionen vom Maillard-Typ in Betracht. Für einen enzymatischen Abbau sprechen folgende Ergebnisse: 1. In gefriergetrocknetem schlachtfischem Fleisch verschwanden die Kohlenhydrate während der Lagerung wesentlich rascher als in auf 100 °C erhitztem und gefriergetrocknetem Gewebe. 2. Während Glucose + G-6-P und Fructose + F-6-P in den ersten Tagen der Lagerung ziemlich schnell abnahmen, wurde FDP während dieser Zeit kaum, später aber mit gleicher Geschwindigkeit abgebaut. Dies spricht dafür, daß die im Anfangsstadium der Lagerung durch enzymatische Spaltung abgebauten Mengen an FDP auf Kosten von

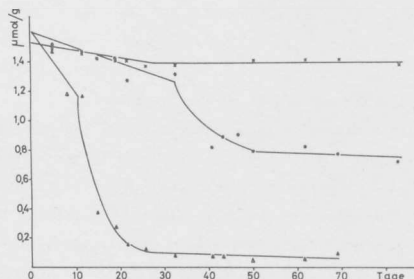


Abb. 2 Einfluß der Wasseraktivität auf den Abbau von FDP in gefriergetrocknetem Fleisch während der Lagerung bei verschiedenen r.L. Zeichenerklärung siehe Abb. 1.

G-6-P und F-6-P wieder ergänzt wurden. 3. Die Erhöhung der r.L. auf Werte bis 97,5 % verursachte eine Beschleunigung des Kohlenhydratabbaues. Da bei der nichtenzymatischen Bräunung optimale Reaktionsbedingungen zwischen 60 und 70 % r.L. festgestellt wurden (13), darf dies als weiterer Hinweis für den enzymatischen Charakter der Reaktion gewertet werden.

Ob die mit sinkender Wasseraktivität zunehmende Verlangsamung des Kohlenhydratabbaues auf der ebenfalls eintretenden Verzögerung des ATP-Abbaues oder aber auf einer Inaktivierung der glykolytischen Enzyme beruht, dürfte experimentell sehr schwierig zu entscheiden sein.

Merkwürdigerweise trat mit dem Verschwinden von Hexosephosphaten

während der Lagerung keine Zunahme von C_3 -Metaboliten (GAP, DAP, Pyruvat, Lactat) ein. Daher läßt sich die Frage nach dem Verbleib der enzymatischen Spaltprodukte der Hexosephosphate nicht beantworten. Möglicherweise treten nichtenzymatische Reaktionen ein. Die durch enzymatischen Abbau von FDP gebildeten Verbindungen GAP und DAP sind durch die Phosphatgruppe energetisch begünstigte Carbonyle von geringer Stabilität. Da ihre Konzentration im gefriergetrockneten Gewebe kaum meßbar war, reagierten sie vielleicht mit anderen Verbindungen, z.B. mit Proteinen. Bei Rehydratation des gefriergetrockneten Fleisches erfolgte sofort ein Abbau des Glykogens und der übrigen glykolytischen Metabolite bis zum Lactat.

Bei 25 % r.L. (Wassergehalt etwa 6 %) kam es, wie die Messung der Geschwindigkeit des Glykogenabbaues zu Lactat bei Rehydratation ergab, während einer Lagerdauer von 4 Monaten zu keiner Abnahme in der Aktivität der glykolytischen Enzyme im gefriergetrockneten Fleisch. Oberhalb von 40 % r.L. nahm jedoch mit steigender r.L. die Enzymaktivität deutlich ab.

Während die wasserlöslichen Substrate (ATP, Kohlenhydrate) bei r.L. ≤ 25 % keine enzymatischen Veränderungen erfuhren, waren lipolytische Effekte noch bei 10 % r.L. (Wassergehalt des Trockenfleisches etwa 4 %) nachzuweisen (Abb. 3). Mit zunehmender r.L. wurden die Triglyceride und Cholesterinester in steigendem Maße abgebaut; Lecithin und Colaminkephalin zeigten keine Veränderung (Abb. 4). Daß es sich hier um die Wirkung von Enzymen (Gewebs-Lipasen) handelt, konnte dadurch bewiesen werden, daß bei der Lagerung von hitzedenaturiertem gefriergetrocknetem Fleisch keine lipolytischen Prozesse eintraten. Die Lipolyse setzte bereits im Sorptionsisothermen-Bereich der monomolekularen Adsorption ein; dies dürfte

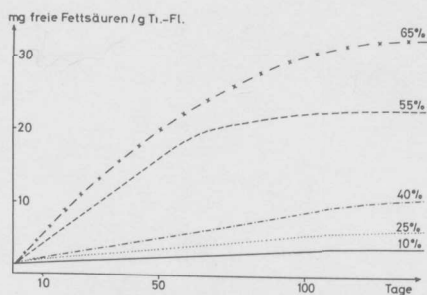


Abb. 3 Einfluß der Wasseraktivität auf den enzymatischen Abbau der Muskellipide in gefriergetrocknetem Fleisch, dargestellt durch die Zunahme freier Fettsäuren während der Lagerung (unter Stickstoff) bei 10 % - 65 % r.L.

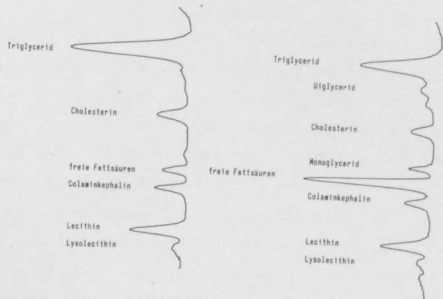


Abb. 4 Remissionsspektrogramme der Muskellipide: links: unmittelbar nach der Gefrier Trocknung, rechts: nach 5 Monaten Lagerung bei 65 % r.L.

darauf beruhen, daß die flüssigen Lipide Wasser lediglich als Reaktionspartner, nicht aber als Transportmittel benötigen (14,15). Die mangelnde Spaltung der Phospholipide läßt sich durch ihre Bindung an Strukturen und mangelnde Phospholipase-Aktivität erklären. Wie die sensorische Prüfung der rehydratisierten Proben ergab, muß zur Vermeidung einer geschmacklichen Verschlechterung gefriergetrockneten Fleisches, die auch bei Lagerung unter Stickstoff durch enzymatische Fettspaltung eintritt, die Restfeuchtigkeit des Trockenproduktes auf 3 % begrenzt werden.

LITERATUR

1. HAMM, R. u. K. POTTHAST: Fleischwirtschaft **55**, 87 (1975)
2. HAMM, R., K. POTTHAST u. L. ACKER: Z. Lebensm. Unters.-Forsch. **154**, 73 (1974)
3. ACKER, L.: Nahrung **12**, 557 (1968)
4. LAMPRECHT, W. u. J. TRAUTSCHOLD: In "Methoden der enzymatischen Analyse" (Hrsgb. H.U. BERGMAYER) S. 543. Verlag Chemie, Weinheim 1962.
5. KLOTZSCH, H. u. H.U. BERGMAYER: Ebenda, S. 156
6. BÜCHER, T. u. H.H. HOHORST: Ebenda, S. 246
7. BÜCHER, T., R. CZOK, W. LAMPRECHT u. E. LATZKO: Ebenda, S. 253
8. HOHORST, H.H.: Ebenda, S. 266
9. GOOD, C.A., H. KRAMER u. M. SOMOGYI: J. Biol. Chem. **100**, 485 (1933)
10. CARROLL, N., E. LONGLEY u. R. ROE: J. Biol. Chem. **220**, 583 (1956)
11. PFLEIDERER, G.: In "Methoden der enzymatischen Analyse" (Hrsgb. H.U. BERGMAYER), S. 59. Verlag Chemie, Weinheim 1962.
12. POTTHAST, K. u. R. HAMM: Z. Lebensm. Unters.-Forsch. **153**, 6 (1973)
13. SHARP, J.G. and E.J. ROLFE: D.S.J.R. Food Investigation, Nr. 1221, 197 (1958)
14. ACKER, L. u. H.O. BEUTLER: Fette u. Seifen **67**, 430 (1965)
15. PURR, A.: Fette u. Seifen **68**, 145 (1966)