

Technologische Brauchbarkeit mit Proteolytischen Enzymen gereiften Fleisches

BARBARA DZIERZYŃSKA-CYBULKO, GABRIELA MURAWSKA, JÓZEFA LAR, EDWARD POSPIECH

Institut für Nahrungsmitteltechnologie tierischer Herkunft der Landwirtschaftlichen Hochschule in Poznań.

Präparate aus proteolytischen Enzymen verwendet man in der Fleischindustrie hauptsächlich für Fleisch von Alt-Rindern. Man beabsichtigt damit erforderliche Veränderungen des Geschmacks sowie der biologischen Werte des Fleischgewebes zu beschleunigen (3.8.10). Die Benutzung von proteolytischen Enzymen dagegen löst das Problem sowohl in der Theorie wie auch in der Erkenntnis und auch im Hinblick auf Anwendung in der Technologie nicht vollständig (10).

Die Zuführungsmethoden von Enzympräparaten zum Fleisch sind sehr unterschiedlich (3.5.9). Die vorausgesehene Wirkung hängt von der Erfüllung einer Reihe von Bedingungen ab, die sowohl mit dem Charakter des Rohstoffes wie auch mit dem Charakter der Enzymwirkung in Verbindung stehen (9.10).

Bei den durchgeführten Versuchen wurden drei enzymatische Präparate angewandt, mit welchem Alt-Rindfleisch gespritzt und dann in Wasser gekocht, auf Rost gebraten sowie fein- und grobzerkleinert zu Model-Wurstwaren und Konserven verarbeitet wurde. Die Einwirkung der Enzyme auf das Fleischgewebe sowie die Güte der Fleischfertigwaren wurde verglichen.

Rohmaterial und Methoden

Versuchs-Rohmaterial waren 9 Muskel-Fleischportionen von Alt-Kühen im Alter von 8 - 10 Jahren. Die Versuche wurden am m.biceps femoris und m.semimembranaceus 48 Stunden nach dem Schlachten und Abkühlen auf ca. 2 - 4°C angestellt. Es wurden drei Arten von proteolytischen Enzympräparaten angewandt: Pankreatin mit Enzymaktivität 16500 Hj/g, neutrale Protease - 70000 Hj/g und ein Schweine-Bauchspeicheldrüsenpräparat - 5000 Hj/g. Die Menge des zugeführten Enzyms betrug für das Pankreatinpräparat sowie aus der Schweine-Bauchspeicheldrüse 1g/kg Fleisch, sowie für neutrale Protease 0,25 g/kg. Die Enzympräparatlösung wurde 48 Stunden nach dem Schlachten durch Einspritzen von 10% im Verhältnis zum Fleischgewicht zugeführt. Die Enzymaktivität wurde nach der Anson-Methode bestimmt (5).

Das frische Fleisch wurde vor der Spritzung mit proteolytischen Enzympräparaten, sowie nach 24-stündiger Lagerung (mit und ohne Enzymzusatz) auf Kolagengehalt (6) geprüft, die Größe der Schneidkraft auf dem Warner-Bratzlerapparat (11) gemessen, das Wasserbindungsvermögen des Fleischgewebes (12) sowie die Wasserstoffionen-Konzentration bestimmt. Gleichzeitig wurden auch histologische Fleischgewebepreparate mit Färbung mittels Hematoxilin und Eosin hergestellt, eine Färbung für die Anwesenheit von Bindegewebe laut Van Gieson, sowie mit saurem Fuchsin, mit 6-wertigem Eisenchlorid in gesättigter Lösung von Pikrinsäure, welche mit den Verbundgewebe-Elementen (13) in Reaktion treten.

Die übrige Menge Fleisch wurde gesondert in Wasser gekocht, auf Rost gebraten sowie zu fein- und grob zerkleinerten Konserven und Wurstwaren verarbeitet. Das gekochte und das gebratene Fleisch sowie die Wurstwaren wurden geschmacklich und chemisch 24 Stunden nach ihrer Herstellung beurteilt, die Konserven dagegen nach 6 Tagen.

Das Fleisch wurde 1/2 Stunde im Wasser gekocht. Das Gewichts-Verhältnis zwischen Fleisch und Wasser betrug 1:2. Gebraten wurde auf einem Rost der Type CSK-2, ein ungarisches Produkt, 25 Minuten lang. Mit jeder Portion Fleisch wurden 100 ml Wasser in den Rost gegossen um die Luftfeuchtigkeit auf ständigem Niveau zu halten.

Das Fleisch für feinzerkleinerte Fleischwurst wurde 11 Minuten lang gekuttert und 2% Kochsalz sowie 25% destilliertes Wasser zugegeben. Die Farcetemperatur betrug zu Anfang +20°C und nach Beendigung der Kutterung +11°C. Die vorbereitete Farce wurde in Viskosedärme mit 35 mm Durchmesser gefüllt und in heißem Rauch geräuchert. Gebrüht wurde 10 Minuten lang in 73°C Wasser. Das war die optimale Zeit zur Erfassung des Unterschiedes zwischen der Kontrollprobe und der untersuchten. Während des Kutterens wurde dem Fleisch ohne Enzymzusatz 35% destilliertes Wasser zugegeben, wodurch die Wassermenge, welche mit dem Enzympräparat dem Fleisch zugeführt wird, berücksichtigt wurde.

Grob zerkleinerte Wurstwaren erhielt man aus in Würfel von 10 mm Kante zerschnittenem Fleisch, dem 20% gekutterte Rohware zugegeben war, 2% Kochsalz und dann manuell vermischt wurde. Zum Füllen verwandt man Cutisindärme von 60 mm Durchmesser. Die Würste wurden 3 Stunden in heißem Rauch geräuchert.

Bei feinzerkleinerten Konserven bestand die Charge aus Farce, die ebenso vorbereitet war wie für Wurstwaren dieser Type. Es wurden lackierte Büchsen mit den Ausmaßen 99 x 47 verwandt, wobei das Gewicht der Farce ca. 300 g betrug. Nach Füllung und Verschließen wurden die Büchsen im Autoklav bei 117°C 20 Minuten sterilisiert. Grob zerkleinerte Konserven enthielten Farce, die von der Wursterzeugung dieser Type stammte. Größe der Büchsen und

Form waren dieselben wie vordem angegeben. Die Konserven wurden bei 82°C 30 Minuten lang pasteurisiert.

In den Fertigwaren wurde die Wasserstoffionen-Konzentration (4), Gehalt an Trockenmasse (4), Gesamtweiß, Zartheit (11) geprüft, bei Wurstwaren der Gewichtsverlust festgestellt sowie ein kommissioneller organoleptischer Test in Bezug auf Schmackhaftigkeit und Mürbheit gemäß 5-punktiger Beurteilungsskala (1) durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse wurden statistisch analysiert durch Errechnung von Mittelwerten, MWU eine Variationsanalyse durchgeführt, das Wesentliche der Unterschiede bei einem Vertrauensniveau von $\alpha = 0,05$ und $\alpha = 0,01$ (7) festgestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Analyse der Angaben in der Tabelle 1 erweist, daß die pH-Werte im Fleisch mit Enzymzusätzen sich nur unmerklich von denen ohne Zusätze unterscheidet. Ansteigen der pH-Werte wäre ein Beweis schnelleren Fortschreitens der nach dem Schlachten eintretenden Veränderungen im Gewebe nach Zugabe von exogenen proteolytischen Enzymen. Das Wasserbindungsvermögen des Fleisches stieg dagegen stark an, besonders nach Zugabe eines Präparates von neutraler Protease, fast um 20%. Die übrigen zwei Enzyme verursachten ein Ansteigen des Wasserbindungsvermögens, jedoch waren die Unterschiede nicht groß. Das Ansteigen des Wasserbindungsvermögens in der Fleischfaser wäre ein Beweis, daß die exogene Wirkung von proteolytischen Enzymen in gewissem Maße mit der Degradation der Proteidstruktur, welche eine Entblößung ihrer hydrophilen Gruppen veranlaßt, in Zusammenhang steht.

Der Schneidekraftwert des Fleisches mit Enzymzusatz war niedriger als bei der Kontrollprobe. Die Unterschiede waren aber minimal und statistisch nicht auswertbar. Den stärksten Einfluß auf die Zartheitsveränderung des Fleisches hatte das Präparat aus neutraler Protease. Der Unterschied zwischen der Kontrollprobe und der mit Enzymzusatz war bedeutend größer als bei den beiden übrigen Präparaten.

Die Bestimmung der hydrothermischen Degradation des Kollagens erwies, daß die Unterschiede zwischen der Kontrollprobe und den Proben mit Enzymzusatz für das Pankreatin- und Protease-Präparat auf dem Wesentlichkeitsniveau $\alpha = 0,01$ statistisch wesentlich waren. Geringere Destruktionswerte wies das Bauchspeicheldrüse-Präparat auf.

Die beobachteten Größen, sowohl Schneidekraft wie Skleroprotein-Eiweiß, welches Thermohydrolyse unterliegt, erwiesen, daß Gebundgewebeeweiß, welches das Gewebeskelett darstellt, der Wirkung von proteolytischen Enzymen unterliegt, und daß derer Hydrolyse eine Verstärkung der Wasserkapazität des Fleisches hervorrufen konnte.

Die Einwirkung der neutralen Protease auf das Fleischgewebe beruht auf ihrer hohen enzymatischen Aktivität, welche nach 24-stündigem Lagern im Fleisch beobachtet wurde.

Die hergestellten histologischen Fleischpräparate, die der Einwirkung von Enzymen unterzogen wurden wiesen eine deutliche Trennung zwischen Sarkolemmen und Sarkoplasmen auf. Der Ausfall ganzer Fleischgewebe wurde dabei beobachtet. Bei vielen war der Kern nicht sichtbar. Deutlich sichtbar waren Querrisse in den Fleischfasern. Sie besaßen die Merkmale körnigen Sarkoplasmas vom Sarkolemmen beobachtet wurde, waren die Zwischenräume zwischen den einzelnen Fasern bedeutend geringer. Bedeutende Beschleunigung der Proteolyse wurde beobachtet. Einen solchen Effekt ohne Enzymzusatz kann man erst nach 30 Tagen bei Lagerung des Fleisches im Kühlhaus erreichen (2).

Angaben über pH-Werte im Fleisch nach technologischer Verarbeitung (Tab.2) erwiesen geringe Verminderung der Wasserstoffionenkonzentration an den einzelnen Proben. Die Differenzen waren minimal und überschritten nicht die für MWU (Minimalster wesentlicher Unterschied) festgelegten Werte. Unbedeutende Säuregradänderungen des Mediums erwiesen, daß die Haltbarkeit der Produkte mit proteolytischen Enzympräparaten die selbe, bzw. sehr ähnlich, ist wie für Wurstwaren ohne Enzymzusatz.

Die Einwirkung der Enzympräparate wurde auch auf Grund der Kollagenmengenänderung in den untersuchten Proben beobachtet. Besonders deutliche Unterschiede traten bei Anwendung von neutralen Proteasepräparaten auf. Die beobachteten Unterschiede waren statistisch wesentlich für Pankreatin- und Bauchspeicheldrüsepräparate, aber nur beim Kochen des Fleisches in Wasser sowie bei der Zugabe von Pankreatin zu grobzerkleinerten Wurstwaren.

Eine Bestätigung oberer Resultate waren die Ergebnisse organoleptischer Prüfung (Tab.4). Proben mit Zusatz von neutraler Protease waren entschieden mürber.

Einen ähnlichen Erfolg erzielte man bei der Zugabe von Pankreatin in grobzerkleinerte Konserven, wobei allerdings ein solch großer Unterschied nur beim Kochen und Braten festgestellt wurde. Bauchspeicheldrüsepräparat ergab verbesserte Zartheit, jedoch waren die Unterschiede statistisch nicht wesentlich. Die Ergebnisse wichen von der mit dem Wagner-Zartheit-Breitmesser (Tab.3) gemachten Zartheitsbeurteilung ab. Die besten Erfolge der Zartheitsverbesserung beobachtete man bei der Anwendung von Bauchspeicheldrüsenpräparaten nach dem Kochen und Braten, sowie bei der Herstellung von feinzerkleinerten Wurstwaren. Diese Unterschiede waren statistisch wesentlich. Ähnliche Effekte wurden bei Präparaten aus neutraler Protease beobachtet.

Bei der Beurteilung der Schmackhaftigkeit wurden im Falle von Pankreatin und neutraler Protease keine statistisch wesentlichen Unterschiede zu den Kontrollproben festgestellt (Tab. 4). Eine Verminderung der Schmackhaftigkeit wurde während der ganzen Forschungsperiode nur im Falle des Bauchspeicheldrüsenpräparates festgestellt.

Der Gewichtsschwund bei den Proben während der Bearbeitung war für alle untersuchten Proben, sowohl ohne wie auch mit Enzymzusatz (Tab. 2) der ähnliche. Nur beim Kochen des Fleisches mit neutraler Protease im Präparat entstanden größere Verluste. Aus den Angaben in der Tabelle geht hervor, daß in Konserven und grobzerkleinerten Wurstwaren eine bessere Bindung des Fleischsaftes festgestellt wurde, besonders bei Zugabe von neutraler Protease. Bei feinzerkleinerten Wurstwaren entstand größerer Schwund, wahrscheinlich durch die Überlagerung von zwei Faktoren: mechanische Zerkleinerung beim Küttern und Einwirkung von Enzymen. Bessere Effekte erzielte man durch die Zugabe von Enzymen bei der Herstellung von grobzerkleinerten Wurstwaren und Konserven.

Gehaltsfeststellung von Gesamtstickstoff und Trockenmasse wurden hilfsmäßig durchgeführt. Im Verhältnis zu diesen wurde der Kolagengehalt errechnet sowie die Menge an Gesamteiweiß im Verhältnis zur Trockensubstanz.

Wie aus den oben erwähnten Resultaten hervorgeht verursachten die im Verlaufe der Arbeiten angewandten proteolytischen Enzympräparate einheitliche Veränderungen im Fleischgewebe. Dieses stand im Zusammenhang mit ihrer unterschiedlichen Aktivität sowie der Eignung der Substrate, welche in diesem Falle Fleisch von Alt-Rindern war. Das zu den Untersuchungen verwandte Rohmaterial war besonders reich an Bindegewebe, und trotzdem vergrößerte sich in der Einwirkung von Enzymen unterzogenen, Fleischgewebe die Wasseraufnahmefähigkeit. Nur im Falle von feinzerkleinerten Wurstwaren, bei welchen zwei Faktoren gleichzeitig einwirkten: Küttern und Enzymzugabe - erfolgte das sogenannte "Überküttern der Farce". Dieses System charakterisierte sich durch große Aufnahmefähigkeit und geringer Wasserbindung.

Im allgemeinen kann man feststellen, daß proteolytische Enzyme die Empfänglichkeit des Kollagen gegen thermische Behandlung verstärkte und die Kollagenstruktur angriff, wobei eine Verringerung in den Proben sowie eine Verstärkung in der Mürbheit der Wurstwaren erfolgte.

Schlußfolgerungen:

- Die Verwendung von proteolytischen Enzymen ändern den pH-Wert im Fleisch nur geringfügig; was auf die gleichmäßige Haltbarkeit von Fleisch und Fleischwaren im Verhältnis zu Proben ohne Enzymzusatz hinweisen kann.
- Präparate aus neutraler Protease und Pankreatin verbessern die Zartheit bei kulinarischen Fleisch bedeutend.
- Geringfügige Geschmacksveränderung bei Proben mit Enzymzusatz; eine Ausnahme besteht bei Fleisch mit Bauchspeicheldrüsen-Präparaten.
- Für kulinarische Zwecke ist eine größere Konzentration von Enzymen notwendiger als für technologische.
- Pankreatin kann Fleisch zugegeben werden, das sowohl für kulinarische wie auch technologische Zwecke bestimmt ist, neutrale Protease dagegen vor allem zu Fleisch für kulinarische Zwecke.

Tabelle 1 - Veränderungen im Fleischgewebe die durch proteolytische Enzympräparate verursacht werden.
 Table 1 - Changes in muscle tissue influenced preparations of proteolytic enzymes

| Untersuchte Eigenschaft (Investigated characteristics) | Art der Probe (Kind of sample) | Angewandtes Enzym (Type of enzyme) | | | MWU | |
|--|--------------------------------|------------------------------------|-------|-------|-----------------|-----------------|
| | | P | B | T | $\alpha = 0,05$ | $\alpha = 0,01$ |
| pH | K | 5,97 | 5,83 | 5,50 | 1,49 | 2,58 |
| | E | 6,10 | 6,03 | 5,83 | | |
| Wasseraufnahmefähigkeit /% (water-holding capacity) | K | 62,00 | 48,18 | 30,94 | 28,48 | 17,95 |
| | E | 66,33 | 66,33 | 32,56 | | |
| Zartheit (kg/cm ²) (tenderness) | K | 11,98 | 16,20 | 16,70 | 4,04 | 2,55 |
| | E | 11,67 | 12,86 | 15,17 | | |
| Hydrothermische Widerstandsfähigkeit von Kollagen /% (hydrotermic resistance, of collagen) | K | 7,21 | 7,26 | 6,81 | 3,92 | 2,28 |
| | E | 20,93 | 21,53 | 8,96 | | |

Symbole - Erläuterungen in Tabelle 3
 (Explanation of signs - the same as in table nr 3)

Tabelle 2 - Gewichtsverluste bei den untersuchten Proben (C-%) sowie pH-Wert in Bezug auf Verarbeitungsart und angewandtes Enzym.
 Table 2 - Weight losses (C-%) and pH-value of investigated samples depend on the technological process and applied enzyme

| Enzymart (Type of enzyme) | Art der Probe (Kind of sample) | Technologische Verarbeitung (Technological processes) | | | | | | | | | | MWU (SSD) | | | | | |
|------------------------------|-----------------------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|-------|--------|----|-------|----|
| | | C | | P | | WD | | WG | | KD | | KG | | =0,05 | | =0,01 | |
| | | C | pH | C | pH | C | pH | C | pH | C | pH | C | pH | C | pH | C | pH |
| E | K | 35,81 | 16,07 | 24,96 | 15,90 | 14,39 | 15,77 | 17,50 | 15,77 | 10,75 | 15,97 | 14,50 | 15,93 | | | | |
| E | K | 34,69 | 16,03 | 21,41 | 16,00 | 13,54 | 15,93 | 18,54 | 15,87 | 14,50 | 15,97 | 13,00 | 15,83 | | | | |
| E | K | 39,11 | 15,90 | 25,73 | 15,87 | 10,86 | 16,03 | 22,02 | 16,03 | 16,16 | 15,87 | 17,83 | 15,87 | 9,454 | | | |
| E | K | 149,76 | 15,93 | 23,80 | 15,90 | 11,80 | 16,01 | 18,80 | 16,03 | 17,00 | 15,90 | 15,69 | 15,87 | 0,834 | | | |
| E | K | 135,61 | 15,63 | 25,51 | 15,73 | 13,34 | 15,87 | 23,57 | 15,90 | 25,21 | 15,57 | 19,50 | 15,47 | 12,429 | | | |
| E | K | 135,27 | 15,47 | 23,93 | 15,97 | 13,00 | 15,97 | 16,52 | 15,90 | 31,72 | 15,67 | 26,78 | 15,50 | 1,097 | | | |

Symbol-Erläuterungen in Tabelle 3
 (Explanation of signs - the same as in table nr 3)

Tabelle 3 - Verhältnis des Kollagen zum Gesamteiweiß (K₁ - %) sowie zur Mürbheit (Kr-kg/cm²) der untersuchten Proben in Bezug auf technologische Verarbeitungsart und angewandtes Enzym.
 Table 3 - Collagen to total protein ratio (K₁ - %) and tenderness (Kr -KG/cm²) of investigated samples depend on the technological process and applied enzyme.

| Enzymart (Type of enzyme) | Art der Probe (Kind of sample) | Technologische Verarbeitung (Technological processes) | | | | | | | | | | MWU (SSD) | | | | | |
|------------------------------|-----------------------------------|--|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|-------|----------------|----|----------------|----|
| | | G | | P ₁ | | WD | | WG | | KD | | KG | | =0,05 | | =0,01 | |
| | | K ₁ | Kr | K ₁ | Kr | K ₁ | Kr | K ₁ | Kr | K ₁ | Kr | K ₁ | Kr | K ₁ | Kr | K ₁ | Kr |
| E | K | 3,99 | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | K | 5,70 | 3,60 | 4,87 | 3,90 | 10,80 | 4,23 | 12,67 | 3,60 | 10,77 | 3,76 | 12,30 | | | | | |
| E | K | 5,03 | 3,18 | 3,43 | 3,62 | 10,53 | 2,87 | 1,97 | 3,36 | 10,63 | 3,50 | 1,83 | | | | | |
| E | K | 9,97 | 3,92 | 10,43 | 3,49 | 10,83 | 3,45 | 6,80 | 3,55 | 10,47 | 3,87 | 4,40 | 0,662 | | | | |
| E | K | 8,77 | 2,94 | 7,40 | 2,77 | 10,13 | 2,73 | 4,23 | 2,84 | 10,33 | 3,17 | 2,83 | 2,031 | | | | |
| E | K | 12,53 | 3,34 | 12,27 | 2,91 | 10,77 | 2,85 | 7,20 | 3,29 | 10,73 | 3,23 | 3,93 | 2,323 | | | | |
| E | K | 6,67 | 3,07 | 6,10 | 2,48 | 10,67 | 2,47 | 14,70 | 3,14 | 10,70 | 2,96 | 13,23 | 2,671 | | | | |

Kontrollprobe (control sample) G - Kochen (cooking)
 Probe mit Enzym (sample treated pre- P₁ - Braten (roasting)
 paration of proteolytic enzyme) WD - feinerkleinerte Wurstware
 ("finly ground" sausage)
 Pankreatin-Präparat WG - grobzerkleinerte Wurstware
 ("coarsely ground" sausage)
 (pancreatin preparation) KD - feinerkleinerte Konserve
 ("finly ground" can)
 Präparat aus neutraler Protease
 (preparation from swine pancreas)

Forts.Tab.4 (cont'd table 4)

Tabelle 4 - Zartheits- (Kr) sowie Geschmacksveränderungen (S) des Fleisches im Verhältnis zum angewandten Enzym und technologischer Verarbeitung, wurden organoleptisch beurteilt.
 Table 4 - Organoleptic evaluations of changes in tenderness /Kr/ and taste /S/ of meat depend on the technological process and applied enzyme (5-score scale)

| Enzymart (Type of enzyme) Art der Probe (Kind of sample) | Technologische Verarbeitung (Technological processes) | | | | | | | | | | | | | | MWU (SSD) | | |
|---|--|------|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|--------------|------|------|
| | G | | P ₁ | | WD | | WG | | KD | | KG | | =0,05 | | =0,01 | | |
| | Kr | S | Kr | S | Kr | S | Kr | S | Kr | S | Kr | S | Kr | S | Kr | S | |
| P | K | 2,87 | 4,47 | 3,13 | 2,87 | 4,33 | 4,20 | 3,67 | 4,47 | 4,33 | 4,53 | 3,67 | 4,53 | | | | |
| | E | 3,47 | 4,60 | 3,87 | 2,87 | 4,87 | 3,47 | 4,13 | 3,73 | 4,80 | 3,87 | 4,27 | 3,80 | | | | |
| B | K | 2,87 | 4,60 | 2,93 | 2,87 | 4,07 | 4,27 | 3,47 | 4,47 | 4,07 | 4,47 | 3,87 | 4,47 | | | | |
| | E | 4,07 | 4,53 | 3,87 | 2,87 | 4,90 | 3,67 | 4,33 | 3,87 | 4,87 | 3,73 | 4,67 | 3,80 | 0,272 | 0,892 | 0,54 | 0,11 |
| T | K | 2,93 | 4,53 | 2,93 | 3,13 | 4,20 | 4,20 | 3,60 | 4,40 | 4,20 | 4,53 | 3,73 | 4,47 | | | | |
| | E | 3,13 | 2,80 | 3,00 | 2,60 | 4,20 | 2,27 | 3,60 | 2,33 | 4,20 | 2,67 | 3,80 | 2,73 | | | | |

Forts.von Tab.3 (cont'd from table 3):

KG - grobzerkleinerte Konserve
 ("coarsely ground" can)

MWU- Minimalster wesentlicher Unterschied
 (SSD) - (the smallest significantly difference)

Die Symbol-Erläuterungen betreffen auch die übrigen Tabellen
 (Explanation of signs /they refer also to the other tables/)