

Interaktionen der Fette und Eiweiße des Fleisches

2. Mitteilung: Verdaulichkeit der Eiweiße in vitro, Thermohydrolyse des Kollagens, Änderungen im Gehalt an essentiellen Aminosäuren und des Koeffizienten des relativen Nährwertes des Eiweißes

W. Janitz

Institut für Ernährungsforschung der Landwirtschaftlichen Universität zu Poznań (Polen)
(Direktor: Prof. Dr. Z. Pazola)

Zusammenfassung: In Modellexperimenten wurden Änderungen von Nährwertkennzahlen des Fleisches unter dem Einfluß einer Interaktion oxiderter Fette mit Eiweißen untersucht. Parameter waren die Verdaulichkeit der Eiweiße, die Empfindlichkeit des Bindegewebes gegenüber Thermohydrolyse, Änderungen im Gehalt an essentiellen Aminosäuren sowie Änderungen des RNV-Koeffizienten des Eiweißes. Als Fleischsubstrat dienten ein Muskelgel- und ein Bindegewebspräparat. Fettsubstrate waren der Methylester der Linolsäure und Produkte seiner Oxidation. Es wurde festgestellt, daß Reaktionen der Oxidationsprodukte von Methyl-linoleat mit Fleischeiweißen eine Quervernetzung der Eiweißstoffe bewirkten. Hexanal und Hydroperoxyde des oxidierten Methyl-linoleats beeinflußten die Abnahme der Verdaulichkeit der Muskeleiweiße und den Prozeß der Thermohydrolyse des Kollagens. Eiweiße von pasteurisierten Gelen wiesen Verluste an essentiellen Aminosäuren auf, was sich in einer Verminderung ihres (am Werte des Koeffizienten RNV gemessenen) Nährwertes niederschlug.

Summary: Changes in the nutritive value of meat under the influence of an interaction between oxidized fats and proteins were studied in model experiments. Parameters were the digestibility of protein, sensitivity of tissue against thermohydrolysis, changes in the content of essential amino acids and in the RNV coefficient of the protein. Muscel gel and tissue served as meat substrates, methyl ester of linoleic acid and its oxidation products were used as fat substrates. It has been found that reactions of the oxidation products of methyl linoleate with meat proteins lead to a crosslinking of proteins. Hexanal and hydroperoxide of the oxidized methyl linoleate influence the decrease in digestibility of muscle protein and the thermohydrolysis of the collagen. Proteins of pasteurized gels showed losses in essential amino acids, which corresponded to a lower nutritive value (determined in the RNV coefficient).

Schlüsselwörter: Eiweiß-Fett-Komplexe, Thermohydrolyse des Kollagens, essentielle Aminosäuren des Fleisches, RNV

Einleitung

Ergebnisse bisheriger Untersuchungen im Bereich der Fett- und Eiweiß-Interaktion kann man in bezug auf technologische Probleme und Ernährungsprobleme prüfen. Ernährungsaspekte der Eiweiß-Fett-Interaktion sind im Bereich der Verdaulichkeit der Eiweiße (16, 17) und des Gehalts an Aminosäuren, besonders der essentiellen Aminosäuren, untersucht (4, 5, 26).

Viele Beobachtungen und Untersuchungsergebnisse haben einen spekulativen Charakter und sind Gegenstand laufender Forschungen. Ziemlich selten sind Ergebnisse von Untersuchungen im Bereich der Eiweiß-Fett-Interaktion in bezug auf Fleisch (4, 20, 25). Es handelt sich vor allem um Modelluntersuchungen.

Zweck der vorliegenden Arbeit war die Klärung einiger Erscheinungen der gegenseitigen Beeinflussung von Fleischeiweißen und Fetten im Zusammenhang mit ausgewählten technologischen Faktoren wie Änderungen der Muskelgewebeeiweiße bei thermischer Denaturierung, Kühl-lagerungszeit und Zusatz von Natriumchlorid.

Material und analytische Methoden

Untersuchungsmaterial

Als Fleischeiweiß wurden ein Muskelgelpräparat und ein Bindegewebepräparat verwendet; als Fettoxidationsprodukt diente intensiv oxidiertes Methyllinoleat (als Quelle für Hydroperoxide) sowie gereinigtes Hexanal*).

Analytische Methoden

Gesamtstickstoff wurde nach Kjeldahl (2), gesamtes und lösliches Kollagen mit der Hydroxyprolinmethode bestimmt (3).

Die Abtrennung des löslichen Kollagens erfolgte mittels Extraktion mit warmem Wasser (10) unter Berücksichtigung eigener Rationalisierungen (12).

Die Verdaulichkeit des Eiweißes *in vitro* bestimmte man über den Aminostickstoff (23), wobei der Verdauung mit Pepsin und Trypsin die Entfettung der Proben vorangegangen war (18).

Die Bestimmung der essentiellen Aminosäuren wurde unter Anwendung eines automatischen Aminosäure-Analysators vom Typ AAA-881 der Firma Mikrotechna (ČSSR) durchgeführt.

Den Wert des relativen Koeffizienten des Nährwertes des Eiweißes – RNV – (19) bestimmte man unter Anwendung des Protozoons *Tetrahymena pyriformis* W (ATCC 10542), wobei Entfettung (24) und Verdauung mittels Pepsin (15) berücksichtigt wurden.

Das Standard-Kontrollsubstrat wurde aus Casein hergestellt (7). Die Populationsgröße des Protozoons wurde mikroskopisch bestimmt (15). Die „protein efficiency ratio“ PER bestimmte man aus dem relativen Nährwert des Eiweißes – RNV –, wobei $PER = 0,286 + 0,022$ (RNV), $r = 0,90$ (7).

Zwecks Vergleichs der Mittelwerte der Kennzahlen berechnete man den Standardfehler des Unterschieds der Mittel, woraus der kleinste signifikante Unterschied bestimmt wurde (KU). Die Signifikanz der Unterschiede wurde auf dem Vertrauensniveau $\alpha = 0,05$ getestet.

*) Gewinnungsmethoden und chemische Charakteristik dieser Produkte siehe 1. Mitt., Z Ernährungswiss 26:62–72 (1987).

Ergebnisse und Diskussion

Änderungen der Verdaulichkeit der Muskelgeleweiße in vitro und der Empfindlichkeit des Bindegewebepräparats gegen Thermo hydrolyse

In den Untersuchungen zum Einfluß von oxidiertem Methylinoleat und von Hexanal auf die Verdaulichkeit der Geleweiße berücksichtigte man denaturierte Eiweiße sowie den Einfluß des thermischen Faktors während deren Denaturierung. In bezug auf das Bindegewebepräparat wurde der Einfluß von Natriumchlorid und der Inkubationstemperatur mit Methylinoleat und Hexanal geprüft.

Wie sich aus den gemessenen Verdaulichkeiten ergibt, bestimmte jeder der angewendeten technologischen Faktoren – ausgenommen der Zusatz von Natriumchlorid – in verschiedenem Grade die Verdaulichkeit der Muskelgeleweiße (Abb. 1). Die Pasteurisierung des Gels in Gegenwart von Produkten der Methylinoleatoxidation bewirkte die größte Verringerung der Eiweißverdaulichkeit. Im Verhältnis zum pasteurisierten Kontrollgel reichte die Verringerung der Verdaulichkeit fast bis zu 30 %. Eiweiße des nativen Gels wiesen eine minimale Verringerung der Verdaulichkeit auf.

Änderungen der Empfindlichkeit des Bindegewebepräparats auf Thermo hydrolyse wurden vor allem durch den Einfluß der Inkubationstempe-

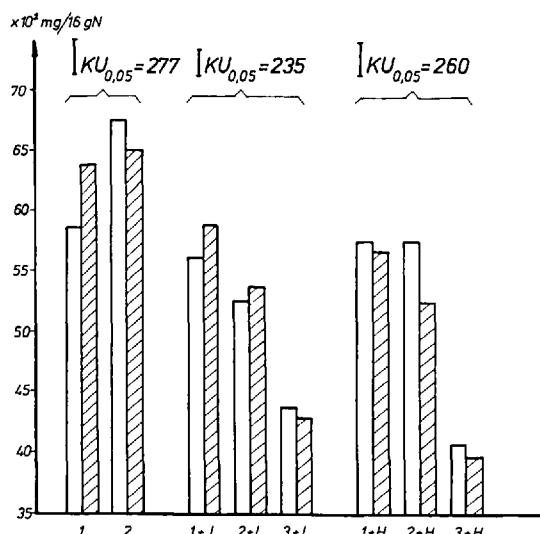


Abb. 1. Änderungen der Verdaulichkeit des Muskelgeleweißes in vitro durch Zusatz von oxidiertem Methylinoleat und Hexanal (n = 9). 1 – rohes Kontrollgel; 2 – pasteurisiertes Gel (90 °C/60 Min.) – Kontrollgel; □ – ohne NaCl; ■ – mit 2,5 % NaCl; 1 + L – rohes Gel mit oxidiertem Methylinoleat (m/m 10:2) inkubiert 4 °C/96 Std.; 2 + L – pasteurisiertes Gel inkubiert nach Pasteurisierung mit oxidiertem Methylinoleat (m/m 10:2) 4 °C/96 Std.; 3 + L – pasteurisiertes Gel mit oxidiertem Methylinoleat (m/m 10:2); 1 + H, 2 + H, 3 + H – analoge Varianten des Gels mit Hexanal (m/m 10:1); KU – kleinster statistisch signifikanter Unterschied.

ratur und den Zusatz von Natriumchlorid hervorgerufen (Abb. 2 und 3). Der Zusatz von Natriumchlorid war nicht nur dem Einfluß des angewendeten Methyllinoleats und Hexanals überlegen, sondern auch dem Einfluß der Inkubationstemperatur. Die Menge des löslichen Kollagens im Bindegewebepräparat, das einen Zusatz von Natriumchlorid enthielt, war durchschnittlich um 15 % kleiner. Der Einfluß des oxidierten Methyllinoleats und Hexanals auf die Hydrolyse des Kollagens des Bindegewebepräparats trat nur bei Inkubation bei einer Temperatur von 60 °C auf. Hexanal verringerte die Thermohydrolyse des Kollagens stärker als das oxidierte Methyllinoleat. Im Verhältnis zum Kontroll-Bindegewebepräparat lagen diese Abhängigkeiten nach Ablauf von 48 Stunden Inkubation bei 15 % und 8 %.

Das Gesamtbild der Änderungen der Verdaulichkeit der Muskelgelleiweiße und der durch das Vorhandensein von oxidiertem Methyllinoleat oder von Hexanal bewirkten Änderungen der Empfindlichkeit des Bindegewebepräparats auf Thermohydrolyse muß man ursächlich vor allem mit der Entstehung zusätzlicher Bindungen im Bereich nur der Eiweiße allein sowie von Bindungen der Eiweiße mit den Produkten der Fettoxidation in Zusammenhang bringen. In der Fachliteratur sind diese Bindungen oft Kreuz- oder Querbindungen genannt, und ihre Entstehung wird als Quervernetzung oder Oligomerisation der Eiweiße bezeichnet. Es sind kovalente Bindungen, wobei Anreger ihrer Entstehung freie Fettradikale sind (14, 20). Der Entstehungsmechanismus zusätzlicher Bindungen im Bereich nur der Eiweiße allein wurde noch nicht geklärt. Bis jetzt wurden

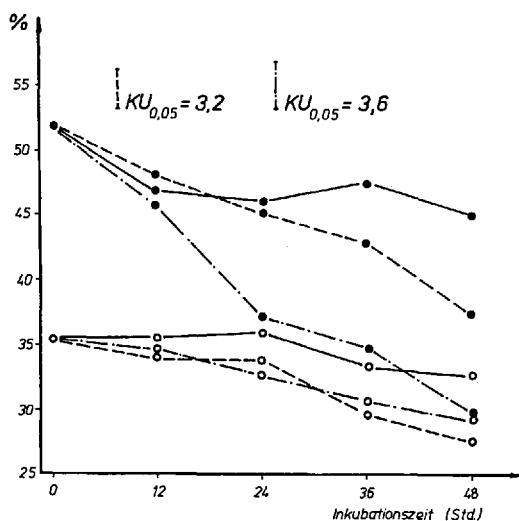


Abb. 2. Einfluß der Inkubation des Bindegewebepräparats mit oxidiertem Methyllinoleat und Hexanal bei 60 °C auf Gehaltsänderungen des löslichen Kollagens ($n = 12$). Bindegewebepräparat gesättigt mit H_2O im Verhältnis m/m 1:3; — — Kontrollbindegewebepräparat; - - - Bindegewebepräparat mit Methyllinoleat (m/m 10:2); - - - - Bindegewebepräparat mit Hexanal (m/m 10:1); ● — ohne NaCl , ○ — mit 2,5 % NaCl ; KU — kleinster statistisch signifikanter Unterschied.

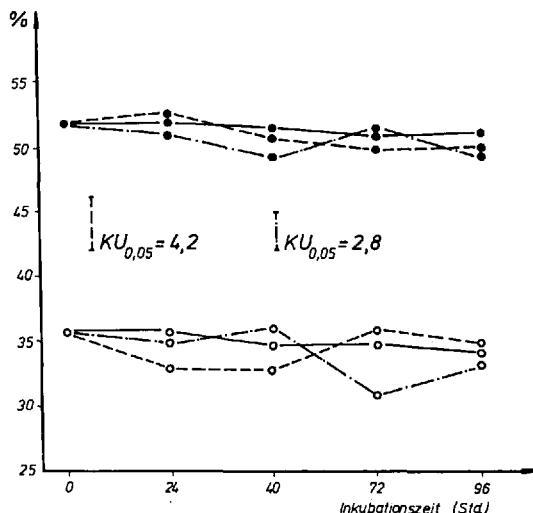


Abb. 3. Einfluß der Inkubation des Bindegewebepräparats mit oxidiertem Methyllinoleat und Hexanal bei 4°C auf Gehaltsänderungen des löslichen Kollagens (n = 12). Abkürzungen und Zeichen wie in Abb. 2.

drei Verlaufsrichtungen dieser Reaktionen ermittelt. Die erste betrifft die durch schwefelhaltige Aminosäuren bedingten Reaktionen, wo die Oxidation der SH-Gruppen zur Entstehung von Disulfidbrücken führt (8). Die zweite sind die durch basische Aminosäuren angeregten Reaktionen, unter denen Histidin und Arginin besondere Aktivität zur Bildung zusätzlicher Bindungen aufweisen (21). Als letzte sind durch oxidiertes Tyrosin angeregte Reaktionen zu nennen (25, 27). Die Effektivität des Verlaufs der erwähnten Reaktionen ist verhältnismäßig groß und findet bereits ihre praktische Anwendung in der Quervernetzung modifizierter Eiweiße (22).

Viel weniger bekannt sind die Entstehungsmechanismen der kovalenten Bindungen der Eiweiße mit Fett. Seit Veröffentlichung der ersten Informationen (1, 20), die das Vorhandensein stabiler Bindungen des Eiweißes mit freien Peroxidradikalen andeuten, lassen sich die Ergebnisse bisheriger Untersuchungen eigentlich auf die Mengen- und Qualitätsanalyse der am Entstehen dieser Bindungen teilnehmenden Eiweiße und Fette zurückführen.

Man muß annehmen, daß alle besprochenen Reaktionen ihren Einfluß auf die Verdaulichkeitsänderung der Muskelgeleweiße und auf die Thermo-hydrolyse des Kollagens im Bindegewebepräparat haben könnten.

Die angewendete Meßmethode für die Verdaulichkeit des Muskelgele-
eiweißes (Mengenmessung freier NH₂-Gruppen) macht es nötig zu berücksichtigen, daß die Blockierung freier Aminogruppen durch Produkte der Methyllinoleatoxidation und Hexanal einen Einfluß auf die Verdaulichkeitsänderungen der Eiweiße ausüben konnte.

Bei der Bestimmung von Kollagen muß man ebenfalls die Möglichkeit der Oxidation von Hydroxyprolin (Meßkriterium für Kollagen) durch Peroxide berücksichtigen (9).

Tab. 1. Gehaltsänderungen an essentiellen Aminosäuren im Muskelgel mit Zusatz von oxydiertem Methyllinoleat und Hexanal.

Muskelgel	Zusatz	Aminosäuren g/16 g N (n = 6)												Summe				
		Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Trp	Val									
		\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s					
Roh inkubiert – 4°C/96 Std.	Methyllinoleat	5,22	0,27	8,23	0,16	10,22	0,21	3,32	0,08	4,43	0,18	5,35	0,27	0,95	0,08	2,82	0,05	40,54
	Hexanal	5,18	0,19	8,06	0,28	9,86	0,32	2,85	0,12	4,26	0,21	5,41	0,17	0,95	0,06	2,85	0,12	39,42
Pasteurisiert 90 °C/60 Min.	Methyllinoleat	5,26	0,20	8,18	0,22	10,02	0,29	3,26	0,05	4,05	0,07	5,32	0,16	0,94	0,04	2,90	0,08	39,93
	Hexanal	5,19	0,12	8,31	0,12	10,34	0,12	3,10	0,09	4,49	0,17	5,40	0,20	0,95	0,09	2,80	0,11	40,58
Ohne Zusatz u. inkubiert 4°C/96 Std.	Methyllinoleat	5,23	0,09	8,26	0,20	8,86	0,33	2,84	0,14	4,15	0,21	5,32	0,19	0,92	0,05	2,78	0,15	38,36
	Hexanal	5,16	0,20	8,20	0,29	9,12	0,12	2,72	0,18	4,10	0,18	5,38	0,12	0,89	0,05	2,79	0,06	38,36
Pasteurisiert 90 °C/60 Min. mit Zusatz	Methyllinoleat	5,21	0,14	8,15	0,15	8,43	0,15	2,65	0,22	3,87	0,25	5,26	0,28	0,90	0,03	2,80	0,14	37,27
	Hexanal	5,23	0,16	8,08	0,19	8,25	0,20	2,42	0,10	3,72	0,15	5,40	0,18	0,84	0,09	2,81	0,15	36,75

\bar{x} = arithmetisches Mittel aus 6 Wiederholungen; s = Standardabweichung.

Änderungen im Gehalt an essentiellen Aminosäuren und des Koeffizienten des relativen Nährwertes des Eiweißes – RNV

Weder der Zusatz von Methyllinoleat noch die angewendete Wärmebehandlung führten zu wesentlichen Änderungen im Gehalt an essentiellen Aminosäuren (Tab. 1).

Die Konsequenzen des Einflusses von Methyllinoleat und Hexanal traten jedoch bei den Koeffizienten des relativen Nährwertes des Eiweißes – RNV – sowie bei der PER (Tab. 2) hervor. Das Protozoon *Tetrahymena pyriformis* W erwies sich als geeigneter Testorganismus bei der biologischen Wertung der Muskelgeleieeiweiße. Man kann annehmen, daß die Änderungen des RNV- und PER-Wertes der Muskelgeleieeiweiße auf die – allerdings geringfügigen – Änderungen bei den essentiellen Aminosäuren beim verfügbaren Lysin und Methionin zurückzuführen sind; auch die Verdaulichkeitsänderung des Geleieeiweißes *in vitro* könnte eine Rolle spielen.

Auf den Anteil der Verdaulichkeit der Eiweiße am RNV- und PER-Wert hatte die Herstellungsmethode des Nährbodens, wo zur enzymatischen Hydrolyse der Muskelgeleieeiweiße Pepsin angewendet wurde, wesentlichen Einfluß. Dies insofern, als der Zusatz von Methyllinoleat oder auch Hexanal – was schon früher beobachtet wurde (Abb. 1) – die Verdaulich-

Tab. 2. Änderungen des Koeffizienten des relativen Nährwertes von Eiweiß (RNV) und der Protein efficiency ratio (PER) bestimmt unter Anwendung des Protozoons *Tetrahymena pyriformis* W bei Zucht auf Muskelgel mit Zusatz von Natriumchlorid, oxydiertem Methyllinoleat und Hexanal.

Art des Eiweiß- substrats	Zusatz	Menge der Organismen ($\bar{x} \cdot 10^4/\text{cm}^3$)	RNV (% gegenüber Casein)	PER
Casein	–	14,5	0,5	100,0
Gel roh inkubiert 4 °C/96 Std.	–	18,2	0,4	125,5
	Methyllinoleat	17,9	0,3	123,4
	Hexanal	17,3	0,2	119,3
	–	18,1	0,6	124,8
	NaCl	18,2	0,4	125,5
	Hexanal	17,1	0,8	117,9
Gel pasteurisiert 90 °C/60 Min., ohne Zusatz u. inkubiert 4 °C/96 Std.	–	18,4	0,2	126,9
	–	16,6	1,1	114,5
	Methyllinoleat	15,8	0,4	108,9
	Hexanal	–	0,7	123,4
	NaCl	16,4	0,5	113,1
	Hexanal	16,1	0,2	111,0
Gel pasteurisiert 90 °C/60 Min. mit Zusatz	–	16,0	0,6	110,3
	Methyllinoleat	14,6	0,5	100,7
	Hexanal	–	0,3	122,7
	NaCl	15,6	0,7	107,6
	Hexanal	14,4	1,0	99,3

keit der Geleiweiße *in vitro* bestimmte. Die geringere Populationszunahme des Protozoons *Tetrahymena pyriformis*, besonders auf dem Nährboden aus pasteurisiertem Eiweißgel, wurde vor allem durch den Mangel an schwefelhaltigen Aminosäuren und Lysin verursacht.

Hexanal wies wahrscheinlich einen größeren destruktiven Einfluß auf die erwähnten Aminosäuren als oxidiertes Methyllinoleat auf. Die – geringen – Änderungen der Werte von RNV und PER der Muskelgeleiweiße durch Natriumchloridzusatz erlaubt zweierlei Schlußfolgerungen. Die erste betrifft die Tatsache, daß die chemisch ermittelten Änderungen an verfügbaren Aminosäuren unter dem Einfluß von Natriumchlorid für die biologische Eiweißbewertung unter Anwendung des Protozoons *Tetrahymena pyriformis* unwesentlich sind. Die zweite interessante Erscheinung ist die metabolische Widerstandsfähigkeit des Protozoons gegenüber dem Vorhandensein von Natriumchlorid im Nährboden. Wie sich aus den bisherigen Informationen ergibt (11, 13), ist die Anwendungsmöglichkeit des Protozoons *Tetrahymena pyriformis* zur Bewertung des Eiweißnährwertes in einer ganzen Reihe verschiedener Nahrungsprodukte durch große Empfindlichkeit dieses Organismus gegen technologische Zusätze beschränkt.

Die erzielten Resultate erlauben die Annahme, daß die 2,5%ige Konzentration von Natriumchlorid im untersuchten Fleisch-Rohmaterial nach Berücksichtigung der Konzentrationsverminderung dieses Salzes infolge methodischer Verfahren bei der Selektion der Eiweißkonzentrate im untersuchten Nährboden keinen Einfluß auf die Vitalitätsänderungen dieses Organismus ausübt.

Literatur

1. Andrews F, Bjorksten J, Trenk FB, Henick AS, Koch RB (1965) *J Amer Oil Chem Soc* 42:779
2. AOAC. Methods of analysis. Ass Off Agr Chemists, Washington DC
3. Arneth W, Hamm R (1971) *Fleischwirtschaft* 51:1523
4. Buttkus H (1967) *J Food Sci* 32:432
5. Buttkus H (1969) *J Amer Oil Chem Soc* 46:88
6. Chio KS, Tappel AL (1969) *Biochem* 8:2821
7. Evancho GH, Hurt HD, Devlin PA, Landers RE, Ashton DH (1977) *J Food Sci* 42:444
8. Friedman M (1973) The chemistry and biochemistry of the sulphydryl group in amino acids, peptides and proteins. Pergamon Press, Oxford
9. Gruber HA, Melton EF (1975) *Anal Biochem* 66:78
10. Herring HK, Cassens RC, Briskey J (1967) *J Food Sci* 32:534
11. Hsu HW, Sutton NE, Banjo MD, Satterlee LD, Kendrick JG (1978) *Food Technol* 32:69
12. Janitz W (1985) Chemiczne wskaźniki wartości odżywcznej mięsa i jego przetworów oraz tłuszczy zwierzęcego. Zbiór wybranych metod analitycznych. Skrypty AR, Poznań
13. Janitz W, Karczewska E (1985) *Medycyna Wet* 41:506
14. Kanner J, Karel M (1976) *Agric Food Chem* 24:468
15. Landers RE (1975) Protein nutritional quality of foods and feeds. P 1. Assay methods biochemical and chemical. Marcel Dekker, Inc New York
16. Mareckova O, Vavrikova J (1968) *Nahrung* 12:765

17. Mareckova O, Vavrikova J, Pokorny J, Vavrikova H (1968) Nahrung 12:769
18. Pokrovski AA, Ertanov ID (1965) Vopr Pitanija 24:38
19. Rosen GD, Fernell WR (1956) Brit J Nutr 10:156
20. Roubal WT, Tappel AL (1966) Arch Biochem Biophys 113:150
21. Saunders DH, Hampson JW (1965) J Amer Oil Chem 42:136A
22. Schmandke H, Hartmann B (1977) Nahrung 21:215
23. Spies JR, Chambers DC (1951) J Biol Chem 191:787
24. Stott JA, Smith H, Rosen GD (1963) Brit J Nutr 17:227
25. Svdlenka I, Davidkova E, Rosmus J (1975) Z Lebensm Unters Forsch 157:263
26. Szebietko K, Grześkowiak Z, Olejnik D, Walkowska A, Kopras B (1979) Acta Aliment Pol 5:379
27. Taggart J (1971) Biochem J 123:48.

Eingegangen 12. Januar 1987

Anschrift des Verfassers:

Dr. W. Janitz, Institut für Ernährungsforschung der Landwirtschaftlichen Universität zu Poznań, Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań (Polen)