

## **Interaktionen der Fette und Eiweiße des Fleisches**

### **3. Mitteilung. Veränderungen im Gehalt an Tryptophan und verfügbaren Formen von Lysin, Methionin und Cystein**

**W. Janitz**

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

**Zusammenfassung:** In Modelluntersuchungen wurde der Einfluß von oxidiertem Methylolinoleat und Hexanal auf Gehaltsveränderungen von Tryptophan und der verfügbaren Formen von Lysin, Methionin sowie Cystein in Eiweißen unter Berücksichtigung der Einwirkung ausgewählter, technologischer Faktoren analysiert. Als Fleischsubstrat diente ein Muskelgel, das vor allem myofibrilläres Eiweiß enthielt. Es wurde festgestellt, daß thermische Denaturierung von Eiweißen sowie Natriumchlorid die Reaktion von Hydroperoxiden des Methylolinoleats und Hexanals mit Eiweißen erleichtern. Am empfindlichsten gegen die Wirkung von Produkten der Fettoxidation waren Cystein und Lysin. Hexanal und der Zusatz von Natriumchlorid zum Muskelgel bewirkten den größten Abbau der zugänglichen SH-Gruppen.

**Summary:** In experimental models the effect of hydroperoxides of the methyl ester of linoleic acid, and hexanal, on the contents of tryptophan, "available" forms of lysine, methionine and cystine in proteins were analyzed. Conditions typical for technological treatment of meat were simulated. A muscle gel containing large quantities of myofibrillar proteins served as meat substrate. It was found that thermal denaturation and the presence of sodium chloride in the medium stimulate the reactivity of methyl linoleate hydroperoxides and hexanal with proteins. Cystine and lysine demonstrated the highest reactivity with oxidated fats. Addition of hexanal and sodium chloride to the muscle gel caused a distinct decrease in the accessible sulfhydryl groups content.

**Schlüsselwörter:** Eiweiß-Fett-Komplexe; verfügbare, schwefelhaltige Aminosäuren des Fleisches; Tryptophan des Fleisches; verfügbares Lysin des Fleisches

**Key words:** protein-fat complex; amino acids in meat; tryptophan in meat; lysine in meat

#### **Einleitung**

Das Interesse an der Einwirkung von oxidierten Fetten auf Eiweiße von Nahrungsmitteln steht im Zusammenhang unter anderem mit den ernährungsphysiologischen Konsequenzen dieser Reaktionen. In Modelluntersuchungen wurde gezeigt, daß die Inkubation von Eiweiß mit Fettoxidationsprodukten eine Abnahme der Eiweißverdaulichkeit bewirkt (20, 21, 34), daß die Menge der essentiellen Aminosäuren sich verringert (2, 10)

und der Nährwert des Eiweißes, gemessen unter Anwendung von biologischen Testen, abnimmt (20). Es ist anzunehmen, daß beim Fleisch die Interaktionen der Eiweiß-Aminosäuren mit Fettoxidationsprodukten nicht nur von der Eigenart der nativen Fleischeiweiße, sondern auch von technologischen Faktoren abhängig sind. Die thermische Denaturierung der Eiweiße, das Vorhandensein von Pökelsalzen, besonders von Natriumchlorid, kann die Dynamik dieser Reaktionen erheblich beeinflussen. Wie sich aus früheren Untersuchungen ergibt, waren Lysin, Tryptophan und schwefelhaltige Aminosäuren sehr empfindlich gegenüber oxidierten Fetten (2, 3, 10).

Bezüglich der Fleischeiweiße entscheiden die erwähnten Aminosäuren, besonders die schwefelhaltigen, über den ernährungsphysiologischen Wert von Fleisch und dessen Produkten.

Unter den Produkten der Fettoxidation, die an den Reaktionen mit Eiweißen teilnehmen, weisen Hydroperoxide und Aldehyde die größte Aktivität auf. Der Umfang der Wirkung von Hydroperoxiden und Aldehyden auf Eiweiße ist von der chemischen Struktur dieser Verbindungen sowie von der Art des Eiweißes (10, 27) abhängig. Es wurde festgestellt, daß Hexanal das dominierende Produkt der sekundären Oxidation von Schweinfett ist (9).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, den Einfluß von Hydroperoxiden und Hexanal auf Veränderungen des Gehaltes an Tryptophan, an verfügbarem Lysin, an Methionin und Cystein in Fleischeiweißen zu beweisen unter Berücksichtigung einiger technologischer Faktoren, wie Eiweißveränderungen bei thermischer Denaturierung und Zusatz von Natriumchlorid.

## Material und analytische Methoden

Als Fleischeiweiß wurde ein Muskelgelpräparat verwendet, als Fettoxidationsprodukt diente intensiv oxidiertes Methylolinoleat<sup>1)</sup> sowie gereinigtes Hexanal<sup>1)</sup>.

Der Gesamtstickstoff wurde nach Kjeldahl bestimmt (1), Tryptophan mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (11), unter Berücksichtigung von Modifikationen, die die Hydrolysate von interferierenden Substanzen bei der kolorimetrischen Messung dieser Aminosäure abtrennen (17).

Verfügbares Lysin bestimmte man mittels der Carpenter-Methode, verbessert durch Rao u. a. (28).

Verfügbares Methionin wurde der Methode von Pieniżek u. a. (25) erfaßt, wobei die direkte Messung von Methionin nach McCarthy und Sullivan (22) erfolgte.

Verfügbares Cystein bestimmte man mit der Methode von Pieniżek u. a. (25), unter Berücksichtigung der methodischen Grundsätze von Zahler und Cleland (36).

Die Bestimmung der freien SH-Gruppen erfolgte amperometrisch (13) unter Berücksichtigung eigener instrumenteller Verbesserungen (18). Bei einem Zusatz von Natriumchlorid enthaltenden Proben wurde die Titrationskurve korrigiert (14).

Zum Vergleich der Mittelwerte der Kennzahlen berechnete man den Standardfehler des Mittelwertunterschieds, mit dem der kleinste wirkliche Unterschied bestimmt wurde (KU).

Die Signifikanz der Unterschiede wurde auf dem Vertrauensniveau  $\alpha = 0,05$  getestet.

<sup>1)</sup> Gewinnungsmethoden und chemische Charakteristik dieser Produkte siehe 1. Mitt. Z Ernährungswiss 26:62 (1987).

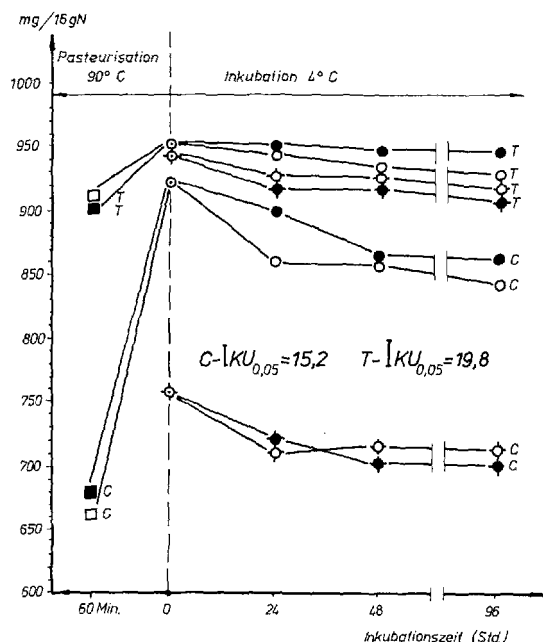


Abb. 1. Veränderungen des Gehaltes an verfügbarem Cystein und Tryptophan im Muskelgel unter Zugabe von oxidiertem Methyllinoleat ( $n = 9$ ). Methyllinoleat mit Gel im Verhältnis m/m 2:10; ● ○ – rohes Gel inkubiert mit Methyllinoleat bei +4 °C; ● ○ – Gel pasteurisiert bei 90 °C/60 min, inkubiert nach Pasteurisierung mit Methyllinoleat bei +4 °C; ■ □ – Gel pasteurisiert mit Methyllinoleat bei 90 °C/60 min; ● ○ – ohne NaCl; ○ ○ – mit 2,5 % NaCl; C = Cystein; T = Tryptophan; KU = kleinster statistisch signifikanter Unterschied.

## Ergebnisse und Diskussionen

Von den verschiedenen technologischen Behandlungen der Gele war die Pasteurisierung des Gels (Abb. 1, 2, 3 und 4) der wesentlichste Faktor, der den Abbau der erfaßten Aminosäuren bestimmte. Dies traf insbesondere dann zu, wenn das Gel mit Zusatz von oxidiertem Methyllinoleat und Hexanal pasteurisiert worden war. Die Inkubation des Gels mit Methyllinoleat und Hexanal bewirkte größere Verluste an Aminosäuren im pasteurisierten Gel als im rohen Gel. Einigermaßen charakteristisch war auch der Gehalt an Tryptophan und an verfügbaren schwefelhaltigen Aminosäuren. Inkubation und sogar Pasteurisierung des Gels mit oxidiertem Methyllinoleat bewirkte einen sehr geringfügigen Abbau von Tryptophan (Abb. 1 und 2). Der Gehalt an verfügbarem Cystein verringerte sich stark im rohen Gel bei Vorhandensein von Methyllinoleat oder Hexanal (Abb. 1 und 2). Der Einfluß von Natriumchlorid war abhängig von der technologischen Behandlung des Gels und der jeweiligen Aminosäure. Er war jedoch am stärksten im rohen Gel. Methyllinoleat bewirkte vor allem während der ersten 24 oder 48 Inkubationsstunden des Gels eine Abnahme von Aminosäuren. Die Einwirkung von Hexanal war gekenn-

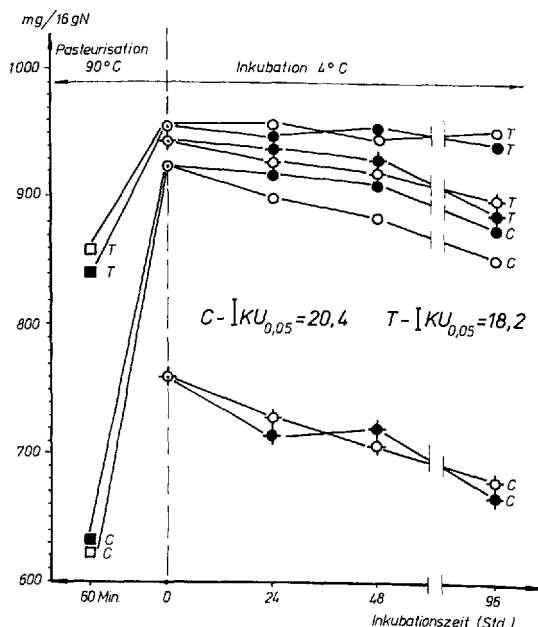


Abb. 2. Veränderungen des Gehalts an verfügbarem Cystein und Tryptophan im Muskelgel unter Zugabe von Hexanal (n = 9). Hexanal mit Gel im Verhältnis m/m 1:10; ● ○ – rohes Gel inkubiert mit Hexanal bei +4°C; ● ○ – Gel pasteurisiert bei 90°C/60 min, inkubiert nach Pasteurisierung mit Hexanal bei +4°C; ■ □ – Gel pasteurisiert mit Hexanal bei 90°C/60 min; ● ● – ohne NaCl; ○ ○ – mit 2,5 % NaCl; C = Cystein; T = Tryptophan; KU = kleinster statistisch signifikanter Unterschied.

zeichnet durch allmähliche Abnahme von Aminosäuren während der ganzen 4tägigen Dauer der Inkubation, und dies besonders im pasteurisierten Fleisch (Abb. 3 und 4).

Die destruktive Wirkung von oxidierten Fetten auf Aminosäuren, besonders auf Lysin, Methionin und Cystein, ist schon mehrfach untersucht worden. Chemische Umwandlungen, die im erwähnten Versuch eintraten, kann man wohl in drei Gruppen systematisieren:

- Oxidation von Aminosäuren,
- Entstehung zusätzlicher Vernetzungen zwischen Eiweißen oder zwischen Eiweißen und Fetten,
- Blockierung oder Umgestaltung der Amino- und Sulfhydrylgruppen der Aminosäuren.

Die Oxidationsreaktionen betreffen Cystein, Methionin und Tryptophan. Aus diesen Aminosäuren entstehen Cysteinsäure, Methioninsulfon und Formylkynurenin (5, 30). An den zur Entstehung der Vernetzungen im Eiweiß führenden Reaktionen nahm von den analysierten Aminosäuren das Cystein teil (10) und wahrscheinlich das Lysin (29). Blockierung der Veränderungen der Amino- und Sulfhydrylgruppen betraf vor allem Lysin und Cystein (5, 26).

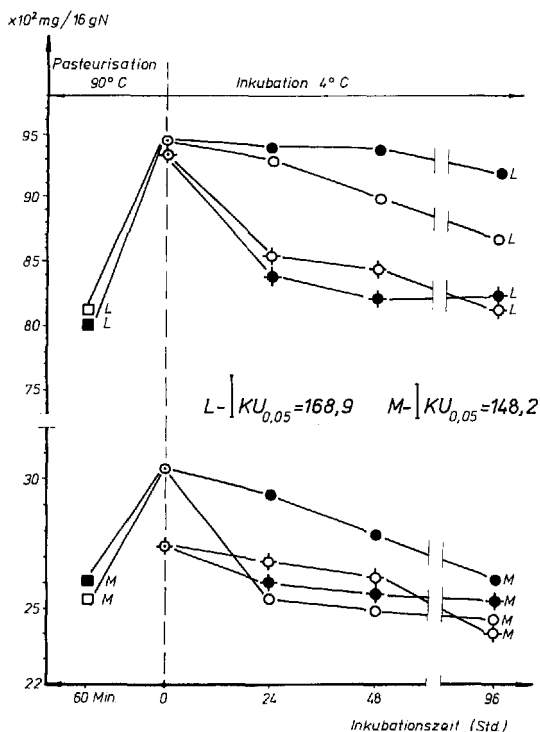


Abb. 3. Veränderungen des Gehalts an verfügbarem Lysin und Methionin im Muskelgel unter Zugabe von oxidiertem Methyllinoleat ( $n = 9$ ). Methyllinoleat mit Gel im Verhältnis m/m 2:10; L = Lysin; M = Methionin. Abkürzungen und Zeichen wie in Abb. 1.

Oxidiertes Methyllinoleat reagierte mit einzelnen Aminosäuren wahrscheinlich anders als Hexanal. Vernetzungen, Oxidation von Aminosäuren sowie Umbau von deren Aminogruppen in Iminogruppen wurden vor allem durch Hydroperoxide eingeleitet (10). Hexanal kann, ähnlich wie andere Aldehyde, die Vernetzung von Eiweiß sowie die Blockierung und den Umbau von deren Funktionsgruppen initiieren. Die mit der Sulfhydrylgruppe des Cysteins reagierenden Aldehyde bilden Thioacetal (26), und in Verbindung mit Aminogruppen des Lysins ergeben sich Schiff-basen (26). Aldehyde reagieren bedeutend schwächer als Hydroperoxide, deren Reaktionen mit Eiweiß sogar bei Zimmertemperatur heftig verlaufen können (7). Dies bestätigen auch die vorgelegten Versuche. Charakteristisch ist ebenfalls die Tatsache, daß sogar bei einer Temperatur von 4°C eine Schädigung der Aminosäuren durch Hydroperoxide deutlich war. Im rohen Muskelgel erreichte die Menge zugänglicher Sulfhydrylgruppen das Maximum ihres Abbaus schon während der ersten 12 Stunden Inkubation mit oxidiertem Methyllinoleat (Abb. 5). Darin ist auch der plötzliche Abbau von Cystein im rohen Gel begründet. Charakteristisch gestalteten sich die Gehaltsveränderungen des verfügbaren Methionins, das zu den besonders gegenüber Einwirkung von Produkten der Fettoxidation empfindlichen Aminosäuren gerechnet wird.



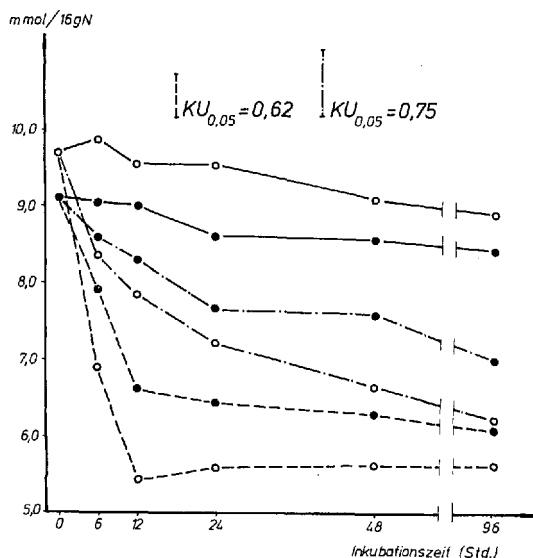


Abb. 5. Veränderungen des Gehaltes an Sulfhydrylgruppen im rohen Muskelgel, inkubiert bei +4°C mit oxidiertem Methyllinoleat und Hexanal (n = 12). Methyllinoleat mit Gel im Verhältnis m/m 2:10, Hexanal im Verhältnis m/m 1:10.

— Kontrollgel; --- Gel mit Methyllinoleat; - - - - Gel mit Hexanal; ● — ohne NaCl; ○ — mit 2,5 % NaCl.

sen Sojaweißhydrolysate auf, was an die Zugänglichkeit der Sulfhydrylgruppen gebunden war (35). Die Zugabe von Cystein zum Fleisch verringerte den thermischen Zerfall von Thiamin während der Sterilisation von Konserven (16). Im Unterschied zu Cystein war Tryptophan weniger empfindlich gegen Hydroperoxide. Erst die Inkubation des pasteurisierten Gels mit Hexanal und besonders die Pasteurisierung des Gels mit Zugabe von Hexanal bewirkten Verluste an dieser Aminosäure im Bereich von 10 % (Abb. 2). Die Veränderungen im Gehalt an Tryptophan im besprochenen Versuch weichen von früheren Informationen ab (24), die eine größere Empfindlichkeit gerade dieser Aminosäure gegenüber Hydroperoxiden andeuteten. In Modelluntersuchungen (31) wurde beobachtet, daß in dem Maße, wie die Menge der Hydroperoxide zunahm, der Abbau von Lysin größer war als der von Tryptophan. Andere Autoren (siehe (10)) halten die Frage noch für offen.

Differenzierte Reaktionen liefen während der Pasteurisierung des Gels mit Zusatz von oxidiertem Methyllinoleat oder Hexanal ab. Neben fortschreitender, thermischer Eiweißfragmentation unterlagen die zugegebenen Oxidationsprodukte der Linolsäure weiterem Zerfall im Pasteurisierungsprozeß. Gleichzeitig stieg die Geschwindigkeit der Interaktion der Geleiweiße mit oxidierten Produkten der Linolsäure, was jedoch nicht immer alle Produkte des Fettzerfalls betraf, da zum Beispiel Malondialdehyd mit Aminosäuren des Myosins ziemlich aktiv bei Temperaturen von -20°C reagiert (2). Thermische Denaturierung der Eiweiße steigerte die Zugänglichkeit von funktionellen Gruppen einzelner Aminosäuren und

erleichterte somit die Möglichkeit der Einwirkung von Hexanal und Hydroperoxiden des Methylolinoleats. Im Falle des oxidierten Methylolinoleats muß u. a. an das Vorhandensein niederer Aldehyde, Dehydroperoxide und sogar zyklischer Peroxide gedacht werden (8, 15). Die Identifizierung der Zerfallsprodukte der Hydroperoxide ist Gegenstand laufender Untersuchungen, wobei deren Resultate oft kontrovers sind. Grosch (12) meint, daß während der Oxidation der Linolsäure der Zerfall von Hydroperoxiden keinen wesentlichen Einfluß auf die Bildung flüchtiger Aldehyde hat; dagegen wurde in anderen Untersuchungen (23) unter den Zerfallsprodukten der Hydroperoxide der Linolsäure Pentanal und Malondialdehyd identifiziert. Was Hexanal betrifft, so konnte die Pasteurisierungstemperatur des Gels mit Zugabe von Aldehyd seinen Zerfall zu Capronsäure beschleunigen und die direkt entstandenen Produkte wirkten wahrscheinlich auf die Eiweiße (6, 23). Man kann also annehmen, daß das Bild der Mengenveränderungen der analysierten Aminosäuren während der Pasteurisierungszeit des Gels unter anderem von der Summe der Produkte des Zerfalls des vorher oxidierten Methylolinoleats sowie des Zerfalls des Hexanals beeinflußt wurde. Die Zerstörung der nativen Eiweißstruktur infolge thermischer Denaturierung erleichterte die Reaktionen einzelner Aminosäuren mit den Zerfallsprodukten der Linolsäure.

#### Literatur

1. AOAC (1960) Methods of analysis. Ass Off Agr Chemists. Washington, DC
2. Buttkus H (1967) The reaction of myosine with malonaldehyde. *J Food Sci* 32:432
3. Buttkus H (1969) Reaction of cysteine and methionine with malonaldehyde. *J Am Oil Chem Soc* 46:88
4. Carpenter KJ (1960) The estimation of the available lysine in animal-protein foods. *Biochem J* 77:604
5. Cheftel JC (1979) Nutritional and safety aspects of food processing. Tannenbaum SR. Ed Marcel Dekker, New York Basel 426
6. Davidek J, Janicek G, Pokorny J (1983) Chemie potravin. SNTL Alfa, Praha
7. El-Tarras MF, Pokorny J, Janicek G (1971) Reaktion oxidierter Lipide mit Eiweißstoffen. 6. Mitt. Bindung von Peroxidfraktionen oxidierter Lipide. *Nahrung* 15:663
8. Frankel EN, Neff WE, Selke E (1981) Analysis of autooxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry. 7. Volatile thermal decomposition products of pure hydroperoxides from autooxidized and photo-sensitized oxidized methyl oleate, linoleate and linolenate. *Lipids* 16:279
9. Gaddis AM, Ellis R (1959) Carbonyls in oxidizing fat. 2. The identity and amounts of steam volatile carbonyls in a rancid frozen pork fat. *Food Res* 24:392
10. Gardner HW (1979) Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids. A review. *J Agr Food Chem* 27:220
11. Graham CE, Smith EP, Hair SW, Klein D (1947) An improved method for the determination of tryptophane with p-dimethyloaminobenzaldehyde. *J Biol Chem* 168:711
12. Grosch W (1975) Ablauf und Analytik des oxidativen Fettverderbs. *Z Lebensm Unters Forsch* 157:70



13. Hamm R, Hofmann K (1961) Schwefelhaltige Verbindungen des Fleisches. 3. Bestimmung von Sulfhydryl- und Disulfide-Gruppen in Myofibrillen und Muskelgewebe mit Hilfe der amperometrischen Titration. *Z Lebensm Unters Forsch* 130:133
14. Hofmann K (1970) Beeinflussung der amperometrischen Titration von Sulfhydrylgruppen mit Silbernitrat durch Salze. *Z Anal Chem* 250:256
15. Henderson GK, Withwoot A, Nawar WW (1980) the autooxidation of linoleates at elevated temperatures. *J Am Oil Chem Soc* 57:409
16. Janitz W, Czyżewska S (1983) Thermischer Abbau des freien Thiamins in Schweinefleisch bei Vorhandensein technologischer Zusätze und Schwefelaminosäuren. *Fleischwirtsch* 63:1761
17. Janitz W, Korzeniowska L (1976) Metodyczne uwarunkowania pomiaru ilości tryptofanu w produktach mięsnych. *Rocz Państw Zakł Hig* 27:655
18. Janitz W, Kwieciński A (1975) Instrumentalne usprawnienie amperometryczne oznaczania grup sulfhydrylowych. *Pocz AR-Poznań* 79:31
19. Kanner J (1979) S-nitrocysteine (RSNO), an effective antioxidant in cured meat. *J Am Oil Chem Soc* 56:74
20. Mareckova O, Pokorny J, Skala I, Rizickova J (1976) Nutricni vyznam interakce bilkovin s oksidovanymi lipidy. *Prum Potravin* 27:196
21. Mareckova O, Vavrikova J, Pokorny J, Vavrinkova H (1968) Die biologische Bedeutung von Komplexen oxidierten Lipide mit Eiweiß. 4. Mitt. Die enzymatische Hydrolyse der Eiweißkomponente in vivo. *Nahrung* 12:769
22. McCarthy TE, Sullivan MX (1941) A new and highly specific colorimetric test for methionine. *J Biol Chem* 141:871
23. Michalski ST, Hammond EG (1972) Use of labeled compounds to study the mechanism of flavor formation in oxidizing fats. *J Am Oil Chem Soc* 49:563
24. O'Brien PJ (1966) The effects of hydrogen peroxide or lipid peroxide on cytochrome C. *Bioch J* 101:12P
25. Pieniązek D, Rakowska M, Szkiellądziowa W, Grabarek Z (1975) Estimation of available methionine and cysteine in proteins of food products by in vitro methods. *Brit J Nutr* 34:175
26. Pokorny J, Davidek J (1978) Influence of interactions of proteins with oxidized lipids on nutrition and sensory value of food. *Acta Aliment Pol* 5:2, 87
27. Pokorny J, Tai PT, Luan NT, Janicek G (1973) Reaktion oxidierten Lipide mit Eiweißstoffen. 8. Mitt. Reaktionen von Alkanalen mit Protein. *Nahrung* 17:621
28. Rao SR, Carter FL, Frampton VL (1963) Determination of a available lysine in oilseed meal proteins. *Anal Chem* 35:1927
29. Shimasaki H, Ueta N, Privett OS (1982) Covalent binding of peroxidized linoleic acid to protein and amino acids as models for lipofuscin formation. *Lipids* 17:878
30. Strange ED, Benedict RC, Miller AJ (1980) Effect of processing variables on the methionine content of frankfurters. *J Food Sci* 45:632
31. Szebiotko K, Grześkowiak Z, Olejnik D, Walkowska A, Kopras B (1979) Changes in the content of tryptophane and available lysine during autooxidation of protein-lipid preparations. *Acta Aliment Pol* 5:379
32. Tannenbaum SR, Barth H, Le Roux JP (1969) Loss of methionine in casein during storage with autooxidizing methyl linoleate. *J Agr Food chem* 17:1353
33. Taylor MJ, Richardson T (1980) Antioxidant activity of cysteine and protein sulfhydryls in a linoleate emulsion oxidized by hemoglobin. *J Food Sci* 45:1223
34. Vavrikova J, Pokorny J, Mareckova O (1968) Die biologische Bedeutung von Komplexen oxidierten Lipide mit Eiweiß. 2. Mitt. Der Ernährungswert der Eiweißkomponente. *Nahrung* 12:661
35. Yee JJ, Shiye WF, Kinsella JE (1980) Antioxidant effects of soy protein hydrolysates on copper-catalyzed methyl linoleate oxidation. *J Food Sci* 45:1082

36. Zahler WL, Cleland WW (1968) A specific and sensitive assay for disulfides. *J Biol Chem* 243

Anschrift des Verfassers:

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