

H. Geßl
P.P. Hoppe
I. Elmadfa

Reduzierung der Lipidperoxidation in gefroren gelagertem Forellenfilet durch Supplementierung des Futters mit Vitamin E

Effect of dietary vitamin E supplementation in trout on lipid peroxidation in fillets during frozen storage

Zusammenfassung Filet von Forellen, die 18 Wochen lang ein Futter mit 12 mg Menadion/kg und mit drei im Konzentrationsverhältnis von 1 : 10 : 100 gestaffelten Dosierungen von all-rac- α -Tocopherylacetat (20, 200 und 2 000 mg/kg) erhalten hatten, wurde homogenisiert und bei -18 °C gelagert. Nach Lagerung über 4, 6 und 8 Monaten wurden die Konzentrationen an α -Tocopherol und Phyllochinon sowie von freien Fettsäuren, Peroxiden, Malondialdehyd und Lipofuszin als Parameter der Lipidperoxidation analysiert.

Die mittleren α -Tocopherolgehalte betrugen 1,4; 2,7 und 16,3 mg/100 g Filet, entsprechend einem

Konzentrationsverhältnis von etwa 1 : 2 : 12. Der dosisabhängige Anstieg bewirkte eine deutliche Verbesserung der Lagerstabilität. Die hohen Dosen an Vitamin E führten zu abnehmenden Gehalten an Phyllochinon im Fischmuskel, die ohne Einfluß auf die Prothrombinzeit waren.

Die dosisabhängige Hemmung der enzymatisch katalysierten Fettoxidation spiegelte sich in abfallenden Gehalten an freien Fettsäuren im Rohfett wider. Peroxide waren an keinem Untersuchungstermin nachweisbar. Die Gehalte an Malondialdehyd sanken mit zunehmender Supplementierung von Vitamin E signifikant ab. Derselbe Einfluß zeigte sich bei Lipofuszin.

Die Anreicherung der Filets mit α -Tocopherol nach Supplementierung des Futters begünstigte eine längerfristige Qualität bei Gefrierlagerung infolge einer effektiven Hemmung der Lipidperoxidation. Bereits mit der Dosierung von 200 mg α -Tocopherylacetat/kg Futter konnte im Vergleich zur Dosierung von 20 mg/kg eine meßbare Verbesserung der Lagerstabilität erzielt werden.

Summary Rainbow trouts were fed a complete diet with 12 mg vitamin K₃ and supplemented with 20, 200 or 2 000 mg all-rac- α -tocopheryl-acetate/kg for 18 weeks. The ratio of the vitamin E-sup-

plementation was 1 : 10 : 100. Fillets were minced and stored at -18 °C. Concentrations of α -tocopherol and phyloquinone and parameters of lipid peroxidation were measured after 4, 6, and 8 months of storage. The effects of α -tocopherol incorporated into fillets on storage stability were assessed by measuring free fatty acids, peroxides, malondialdehyde and lipofuscin.

Mean α -tocopherol-concentrations in fillets were 1.4, 2.7 and 16.3 mg/100 g, respectively representing ratios of 1 : 2 : 12. The increase in α -tocopherol concentration resulted in a significant improvement of storage stability. The phyloquinone concentration in fillet was reduced in treatments with ≥ 200 mg vitamin E/kg; however, this did not affect the prothrombin time. No peroxides were detectable at any time. The concentrations of malondialdehyde significantly decreased with increasing supplementation of vitamin E. Lipofuscin concentrations were higher with low than with high vitamin E supplementation. The dose-related inhibition of lipid peroxidation became apparent in decreased concentrations of free fatty acids in the crude fat.

These results confirm the effectiveness of α -tocopherol as antioxidant in fish flesh. In this study the incorporation of α -tocopherol from dietary supplementation improved

Eingegangen: 7. Dezember 1994
Akzeptiert: 13. März 1995

H. Geßl · Prof. Dr. I. Elmadfa (✉)
Institut für Ernährungswissenschaften
Universität Wien
Althanstraße 14
1090 Wien, Österreich

P.P. Hoppe
Tierernährungsstation der BASF AG
76877 Offenbach

the long-term storage quality of trout fillets due to the effective inhibition of the lipid peroxidation. A measurable improvement of the storage stability was achieved with a supplementation of 200 mg vitamin E/kg feed.

Schlüsselwörter Forelle – Tocopherol – Phyllochinon – Antioxidans – Lipidstabilität

Key words Trout – tocopherol – phyloquinone – antioxidant – storage

Abbreviation index *BHT* = Butylhydroxytoluol · *DGF* = Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft · *FS* = Fettsäuren · *HPLC* = High pressure liquid chromatography · *LP* = Lipofuszin · *MDA* = Malondialdehyd · *ODS* = Octadecylsilan · *p* = Irrtumswahrscheinlichkeit ·

r = Korrelationskoeffizient · *RP* = Reversed-Phase (Umkehrphasen-Chromatographie) · *TBA* = Thiobarbituric acid (Thiobarbitursäure) · *TBARS* = Thiobarbituricacid reactive substances · *TEP* = 1,1',3,3'-Tetraethoxypropan · *UV* = Licht im ultravioletten Spektralbereich · *UV-VIS* = Licht im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich · *v/v* = Volumenverhältnis

Einleitung

Bei der Verarbeitung und Lagerung von Fleisch und Fisch ist der autoxidative und enzymatisch katalysierte Fettverderb die Hauptursache für die Qualitätsverminderung. Auch bei der Gefrierlagerung (-18 °C) laufen die Fettverderbsprozesse verlangsamt weiter (20).

Gegenüber dem Fleisch warmblütiger Tiere ist das Fischmuskulergewebe gekennzeichnet durch eine hohe Reaktivität der Fettkomponente, in der die langkettigen, hoch ungesättigten Fettsäuren dominieren. Qualitätseinbußen durch Sauerstoffanlagerung oder enzymatische Prozesse werden begünstigt durch die lockere Gewebestruktur, einen geringen Bindegewebsgehalt und eine hohe Wasseraktivität. Letztere hat darüber hinaus eine hohe Aktivität endogener und mikrobieller Enzyme zur Folge. Im Falle einer Kontamination handelt es sich überwiegend um kälteliebende Mikroorganismen (2).

Die Beständigkeit von Fettgewebe gegenüber Oxidation wird in hohem Ausmaß beeinflusst zum einen durch den Grad der Ungesättigtheit der Fettsäuren, zum anderen durch den Gehalt an Antioxidantien im Gewebe (18). In der Lipidphase im Gewebe, vor allem in den Zellmembranen, kommt den Tocopherolen eine wesentliche Schutzfunktion als Antioxidans zu. Dabei fungiert das α -Tocopherolmolekül als Elektronendonator, wodurch eine durch molekularen Sauerstoff eingeleitete Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren inhibiert wird (5). Deshalb ist die Fütterung höherer Vitamin-E-Dosierungen an Forellen, die zur Einlagerung in die Muskulatur führt, eine zunehmend angewandte Methode, den Verderbsprozess zu verzögern.

Primäres Ziel dieser Studie war es zu quantifizieren, in welchem Konzentrationsverhältnis supplementiertes α -Tocopherol im Fischmuskel gespeichert wird, und in welchem Ausmaß das verabreichte all-rac- α -Tocopherylacetat dosisabhängig die Lagerfähigkeit der Filets bei -18 °C verbessert. Daneben sollte der Einfluß steigender α -Tocopheroldosen auf die Konzentration an Vitamin K im Muskel bestimmt werden.

Material und Methoden

Versuchsaufbau

Im Rahmen dieser Studie erhielten Forellen ein bedarfsgerechtes Futter mit ansteigendem Zusatz von all-rac- α -Tocopherylacetat im Verhältnis 1 : 10 : 100 [mg/kg] und jeweils gleichbleibender Supplementierung von 12 mg Menadion (Vitamin K₃/kg. Der Zusatz von all-rac- α -Tocopherylacetat betrug 20 mg, 200 mg und 2 000 mg/kg für die Behandlung 1, 2 und 3. Pro Behandlung wurden drei Becken mit jeweils 20 Forellen eingesetzt. Die Fütterungsdauer betrug 18 Wochen, das mittlere Schlachtgewicht der Forellen betrug 370 ± 71 g. Nach der Schlachtung wurden die Filets von je 10 Forellen pro Becken gemeinsam homogenisiert, portioniert und vier, sechs bzw. acht Monate bei -18 °C gelagert. Aus Tabelle 1 sind die einzelnen Versuchsbedingungen zu entnehmen.

Tabelle 1 Versuchsbedingungen

* Anfangsgewicht der Forellen:	60 g
* Schlachtgewicht der Forellen:	370 ± 71 g
* Wasser (Süßwasser):	
Temperatur:	16 °C
pH:	> 6,8
O ₂ :	10 mg/l
* Futter:	bedarfsgerechtes, pelletiertes Futter mit Vitamin-E- und Vitamin K-Zusätzen
* Futtermenge:	1,8 % der Lebendmasse/Tag
* Versuchsdauer:	18 Wochen
* Lagertemperatur:	-18 °C
* Untersuchungen:	nach 4, 6 und 8 Monaten
	Lagerzeit
* Stichprobenumfang:	pro Behandlung: drei Filetpools aus je n = 10
	pro Pool: zwei Proben als Doppelbestimmung

Untersuchte Parameter und Methoden

Die Tabelle 2 zeigt einen Überblick über die einzelnen untersuchten Parameter und angewandten Methoden.

Vor der Analytik der Parameter erfolgte die Extraktion der lipidlöslichen Phase aus den Muskelhomogenaten nach der Methode von Folch et al. (11). Dazu wurden jeweils Proben von 7 bis 8 g aufgetaut. Das Extraktionsmittel, bestehend aus einem Gemisch von Chloroform und Methanol (2 + 1, v/v + 0,005 % BHT), wurde im Verhältnis 25 ml auf 1 g Einwaage zugesetzt. Nach kräftigem Schütteln erfolgte die Extraktion über Nacht im Kühlschrank. Der Extrakt wurde filtriert und nach Zugabe von 0,05 molarer Calciumchloridlösung (1/5 des Extraktionsvolumens) in zwei Phasen getrennt. Die über Natriumsulfat filtrierte Chloroform-Öl-Phase wurde mittels eines Rotationsverdampfers sukzessive eingengt. Das gewonnene Rohfett wurde für die Analyse eingesetzt.

Pro Supplementierungs-dosis wurden drei Proben von Forellen aus drei verschiedenen Becken mit je einer Doppelbestimmung analysiert.

Tocopherol

Die quantitativen Bestimmungen von α -Tocopherol wurden im extrahierten Rohfett, in Anlehnung an die Methode von Sierakowski und Elmadfa durchgeführt (29). Es handelte sich um eine Reversed-phase-HPLC mit anschließender UV-VIS-Detektion bei 295 nm. Die HPLC-Apparatur bestand aus: Hochdruckpumpe (Gyncotek-High Precision Pump, Model 300 C), Injektor mit Schleifenvolumen 100 μ l (Gyncotek), Säulensystem (Vorsäule und analytische Säule, Gyncochrom reversed-phase-C₁₈-Material, ODS-Hypersil, Partikelgröße 5 μ m), UV-Detektor (Linear UVIS 204), Integrator (Gyncotek C-R3A).

HPLC-Parameter: Eluent: Methanol/Dichlormethan (85 + 15, v/v), Fließrate: 0,8 ml/Min., Wellenlänge: 295 nm, Säulentemperatur: Raumtemperatur.

Die Berechnung der Tocopherol-Konzentrationen erfolgte anhand der linearen Regression mit Hilfe von Tocopherol-Standards.

Phyllochinon

Phyllochinon wurde nach der Methode von Jakob und Elmadfa (19) mittels Reversed-phase-HPLC und anschließender Fluoreszenzdetektion bestimmt.

Zum Einsatz gelangten: Hochdruckpumpe (Gyncotek, Model 300 B), Säulensystem mit Vorsäule, analytischer Säule (Gyncochrom Fertigsäule RP-C₁₈-Material ODS-Hypersil, Partikelgröße 5 μ m) und Reduktionssäule (Edelstahlsäule GCart K2, mit Zinkpulver, Partikelgröße < 60 μ m), Detektor (Fluorescence Spectrophotometer, Fa. Merck-Hitachi), Integrator (D-2500 Chromato-Integrator, Fa. Merck-Hitachi).

HPLC-Meßbedingungen: Fließmittel: Methanol/Dichlormethan/Zinkchlorid-Säuremischung (900 + 100 + 5,

v/v), Fließrate 1,0 ml/Min., Säulentemperatur: 40 °C, Fluorimetrie: Anregung: 243 nm, Emission: 430 nm.

Freie Fettsäuren

Die freien Fettsäuren wurden mit einem Halbmikro-Test nach Shimizu et al. (28) photometrisch, basierend auf einer enzymatischen Farbreaktion, erfaßt.

Die freien Fettsäuren der in Ethanol gelösten Proben reagieren durch das Enzym Acyl-CoA-Synthetase zu Acyl-Coenzym A und durch die Acyl-CoA-Oxidase weiter zu 2,3-Enoyl-Coenzym A. Durch das freiwerdende Wasserstoffperoxid entsteht in Anwesenheit von Peroxidase ein roter Chinonfarbstoff, der photometrisch bei 546 nm mit einem UV-VIS-Spektralphotometer UV-160 A der Firma Shimadzu gemessen wurde. Der Vorteil dieser Methode lag im geringen Probeneinsatz und einer hohen Spezifität.

Peroxidzahl

Die Peroxidzahl im Rohfett wurde mit der Einheitsmethode der Deutschen Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF) nach Wheeler iodometrisch bestimmt (8).

Dazu wurde 1 g Rohfett in 30 ml eines Eisessig-Chloroform-Gemisches (3 + 2, v/v) gelöst und mit 0,5 ml einer gesättigten Kaliumiodid-Lösung versetzt. Das nach kräftigem Schütteln freigesetzte Iodid wurde nach Zugabe von 30 ml dest. Wasser durch Titration mit 0,01 molarer Natriumthiosulfat-Lösung bestimmt. Als Indikator diente eine 1 %ige Stärke-Lösung.

Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (Malondialdehyd)

Die thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen, ausgedrückt als Malondialdehyd (MDA), wurden im Muskelhomogenat mittels RP-HPLC nach der Methode von Wong et al. quantitativ erfaßt (32). In Puffer gelöstes Muskelhomogenat wurde mit 1,5 %iger Phosphorsäure und TBA-Lösung 60 Minuten bei 100 °C inkubiert, anschließend in Eis gestellt, mit methanolischer NaOH neutralisiert und in die HPLC-Anlage eingespritzt.

Mit TEP-Lösungen bekannter Konzentrationen wurde eine Eichgerade aufgestellt, aus der die Konzentrationen an TBARS in den Proben berechnet werden konnten.

Die HPLC-Anlage bestand aus den Elementen: Hochdruckpumpe (High-Precision Pump, Model 300 C, Gyncotek), Probenschleife (100 μ l), Säulensystem (Vorsäule und analytische Säule, LiChroCart 100, Reversed-phase-ODS-Hypersil, Partikelgröße 5 μ m bzw. 10 μ m), Detektor (Fluorescence Spectromonitor RF-530, Fa. Shimadzu), Integrator (Gyncotek C-R3A).

HPLC-Parameter: Eluent: Lösung von KH₂PO₄, 1 M KOH, pH 6,8 ad 2,0 l und bidest. Wasser/Methanol (3 + 2, v/v), Fließrate: 1,3 ml/Min., Säulentemperatur: Raumtemperatur, Detektion: Anregung: 532 nm, Emission: 563 nm.

Lipofuszin

Die Polymerisationsprodukte aus der Lipidperoxidation wurden nach der Methode von Hammer (16) mittels Fluorimetrie bestimmt. Nach der Extraktion mit einem Lösungsmittelgemisch von Chloroform und Methanol (2 + 1, v/v + 0,005 % BHT) wurde die relative Fluoreszenzintensität [% RFI/g Frischgewicht] fluorenszenzspektrometrisch ermittelt (Anregung: 350 nm, Emission: 450 nm). Als Referenzsubstanz diente eine frisch bereitete schwefelsaure Chininsulfatlösung (1 µg Chininsulfat/ml 0,1 N Schwefelsäure).

Aktivierte partielle Prothrombinzeit

Die aktivierte partielle Prothrombinzeit wurde mit Hilfe des Kugelcoagulometers bestimmt. Citratblut wurde durch Punktion der dorsalen Aorta gewonnen, zentrifugiert (3 000 g, 5 min) und das Citratplasma innerhalb von max. 4 Stunden zur Messung verwendet. 50 µl Plasma wurden mit 50 µl Prothrombin (Behring, Marburg) für 2 min bei 37 °C inkubiert. Die Gerinnung wurde durch Zusatz von 50 µl CaCl₂ (0,025 Mol/l) gestartet.

Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS/PC+ Version 4,0. Für alle Variablen wurden das arithmetrische Mittel (n = 6) und die Standardabweichung ermittelt. Der Vergleich der Stichprobe erfolgte mittels der Testverfahren nach Kruskal-Wallis (H-Test), Mann-Whitney (U-Test), sowie nach Wilcoxon. Statistisch ausgewertet wurden der Einfluß der verschiedenen Supplementierungsdosen und der Lagerdauer. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden auf dem Niveau von 5 % (p < 0,05) und 1 % (p < 0,01) der Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben.

Ergebnisse

α-Tocopherol

In Abhängigkeit von der Tocopherol-Zufuhr und der Lagerungsdauer lag die mittlere Konzentration im Filet zwischen 1,08 mg und 16,26 mg/100 g (Tab. 3).

Das Verhältnis der Konzentrationen an α-Tocopherol im Fischmuskel verhielt sich bei allen drei Untersuchungsterminen wie 1 : 2 : 12 (p < 0,01). Das Supplementierungsverhältnis im Futter (1 : 10 : 100) wurde im Fischfilet somit nicht wiedergefunden. Bei der niedrigsten Supplementierung (20 mg/kg Futter) reduzierte sich die Konzentration zwischen dem ersten und dritten Untersuchungstermin (nach 18 und 32 Wochen Lagerung) um 22 %, bei der höchsten Supplementierung hingegen nur um 11 %.

Phyllochinon

Die Konzentrationen lagen in Abhängigkeit von der Vitamin-E-Dosierung und der Lagerdauer zwischen 1,05 und 0,55 µg/100 g Filet (Tab. 4). Nach 18 Wochen war der Gehalt in Behandlung 1 signifikant höher als in den Behandlungen 2 (p < 0,01) und 3 (p < 0,05). Nach 25 und 32 Wochen war die ermittelte Vitamin K₁-Konzentration im Filet bei der höchsten Vitamin-E-Dosierung signifikant niedriger (p < 0,01) im Vergleich zur mittleren und niedrigsten Vitamin-E-Dosierung. Die Veränderungen des Gehalts während der Beobachtungszeit waren uneinheitlich: Während in den Behandlungen 1 und 3 ein signifikanter Abfall zwischen 18 und 25 Wochen von 31 bzw. 24 % ermittelt wurde, der sich nach der 25. Woche nicht fortsetzte, blieb der Gehalt in Behandlung 2 während der gesamten Beobachtungszeit konstant.

Tabelle 3 Gehalte an α-Tocopherol [mg/100 g] im Fischfilet in Abhängigkeit vom Zusatz an all-rac-α-Tocopherylacetat zum Futter und der Lagerdauer bei -18 °C

Vitamin E mg/kg Futter	Lagerdauer bei -18 °C (Wochen)		
	18	25	32
20	1,40 ± 0,09 ^{a1}	1,10 ± 0,12 ^{b1}	1,08 ± 0,12 ^{c1}
200	2,71 ± 0,05 ^{a2}	2,55 ± 0,12 ^{b2}	2,53 ± 0,85 ^{c2}
2000	16,26 ± 1,37 ^{a3}	14,42 ± 0,17 ^{b3}	14,40 ± 0,23 ^{c3}
Signifikanzen: a1<a2<a3 (p<0,01); b1<b2<b3 (p<0,01); c1<c2<c3 (p<0,01) a1>b1 (p<0,05); a2>b2 (p<0,05); a3>b3 (p<0,05)			

Tabelle 4 Gehalte an Phyllochinon im Fischfilet [µg/100 g] in Abhängigkeit vom Zusatz an all-rac-α-Tocopherylacetat zum Futter und der Lagerdauer bei -18 °C

Vitamin E mg/kg Futter	Lagerdauer bei -18 °C (Wochen)		
	18	25	32
20	1,05 ± 0,04 ^{a1}	0,76 ± 0,09 ^{b1}	0,73 ± 0,04 ^{c1}
200	0,75 ± 0,06 ^{a2}	0,74 ± 0,04 ^{b2}	0,76 ± 0,04 ^{c2}
2000	0,72 ± 0,19 ^{a3}	0,57 ± 0,04 ^{b3}	0,55 ± 0,03 ^{c3}
Signifikanzen: a1>a2 (p<0,01); b2>b3 (p<0,01); c2>c3 (p<0,01) a1>b1 (p<0,05); a3>b3 (p<0,05)			

Lipidperoxidationsparameter

Freie Fettsäuren

Zu allen Untersuchungszeitpunkten bestand eine deutliche inverse Beziehung ($p < 0,01$) zwischen der Vitamin-E-Dosierung im Futter und der Konzentration von freien Fettsäuren im Filet (Tab. 5). Nach 18 Wochen Lagerung enthielt das Filet aus Behandlung 3 eine um 63 % niedrigere Konzentration als in Behandlung 1. Das Vitamin-E-Niveau im Futter hatte einen unterschiedlichen Einfluß auf die Veränderung der freien Fettsäuren-Gehalte des Filets während der Lagerung. Während die Gehalte in den Behandlungen 1 und 2 im Zeitraum zwischen 18 und 25 Wochen signifikant anstiegen, kam es unter dem Einfluß der höchsten Vitamin-E-Dosierung (Behandlung 3) während des gesamten beobachteten Zeitraums lediglich zu einem numerischen, nicht signifikanten Anstieg. Insgesamt zeigte dieser Parameter die dosis- und zeitabhängigen Einflüsse am deutlichsten.

Peroxidzahl

Peroxide im Filet wurden an keinem Untersuchungstermin nachgewiesen

Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (Malondialdehyd) und Lipofusazine

Die mittleren MDA-Gehalte betrugen in Abhängigkeit vom verabreichten Futter und der Lagerdauer zwischen 13,94 μmol und 54,26 $\mu\text{mol/kg}$ Frischgewicht. Mit zunehmender Vitamin-E-Dosierung zeigte sich ein Abfall der Gehalte, nach 18 Wochen zunächst tendenziell, nach 25 bzw. 32 Wochen Lagerung bei der mittleren und höchsten Supplementierung signifikant ($p < 0,01$). Im

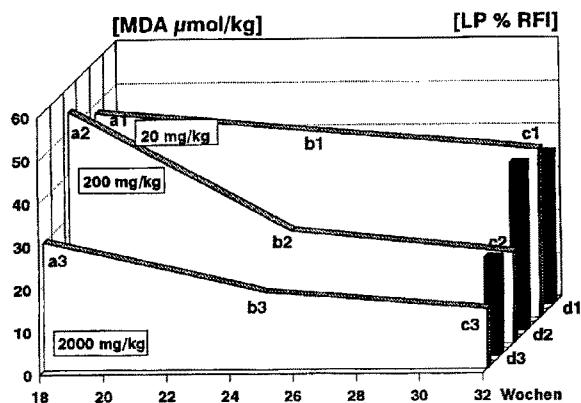
Vergleich zu Behandlung 1 lag die Konzentration in Behandlung 3 nach 18 Wochen Lagerung um 38 %, nach 25 Wochen um 58 % und nach weiteren sieben Wochen um 64 % niedriger. Die Untersuchungen nach 32 Wochen ergaben bei der niedrigsten, mittleren und höchsten Supplementierung Abnahmen von 18, 61 und 54 % im Vergleich zum Wert nach 18 Wochen (Abb. 1).

Malondialdehyd und andere Carbonylverbindungen, die sich von den anoxidierten Fettsäuren abspalten, reagieren mit Proteinen zu größeren fluoreszierenden Molekülen, die heute als Lipofusazine erfaßbar sind (15). Diese Folgeprodukte wurden nur beim letzten Untersuchungs-termin im Extrakt bestimmt (Abb. 1). Die Unterschiede korrelieren mit jenen der MDA-Werte ($r = 0,308$, $p < 0,05$). Bei 200 mg Tocopherylacetat/kg Futter lagen die Lipofusazin-Gehalte mit 38 % [RFI/g Frischgewicht] signifikant über jenen nach der Supplementierung von 2 000 mg/kg Futter 23 % RFI/g Frischgewicht ($p < 0,05$).

Tabelle 5 Gehalte an freien Fettsäuren im Fischfilet [mmol/100 g] in Abhängigkeit vom Zusatz an all-rac- α -Tocopherylacetat zum Futter und der Lagerdauer bei -18 °C

Vitamin E mg/kg Futter	Lagerdauer bei -18 °C (Wochen)		
	18	25	32
20	0,49 \pm 0,05 ^{a1}	0,67 \pm 0,15 ^{b1}	0,71 \pm 0,23 ^{c1}
200	0,29 \pm 0,06 ^{a2}	0,37 \pm 0,08 ^{b2}	0,34 \pm 0,06 ^{c2}
2000	0,18 \pm 0,01 ^{a3}	0,21 \pm 0,03 ^{b3}	0,23 \pm 0,02 ^{c3}

Signifikanzen: a1>a2>a3 ($p < 0,01$); b1>b2>b3 ($p < 0,01$); c1>c2>c3 ($p < 0,01$); a1<b1 ($p < 0,05$); a2<b2 ($p < 0,05$)



Sign.: b1>b2>b3; c1>c2>c3 ($p < 0,01$); d1<d2>d3; a2>b2>c2; a3>b3 ($p < 0,05$)

Abb. 1 Gehalte an TBAR-Substanzen (Malondialdehyd, MDA) im Fischfilet [$\mu\text{mol/kg}$] und Lipofusazin (LP) [% RFI/g Frischgewicht] in Abhängigkeit von der Konzentration an all-rac- α -Tocopherylacetat im Futter und der Lagerdauer bei -18 °C.

Diskussion

Die Kenntnis von der Bedeutung von α -Tocopherol als antioxidativer Schutzfaktor führte auch dazu, dieses lipidlösliche Vitamin in veresterter Form dem Futter von Tieren zuzusetzen, deren Fleisch der menschlichen Ernährung dienen. Dabei steht nicht im Vordergrund, vitaminisierte Lebensmittel zu produzieren, sondern in erster Linie die Lagerstabilität tierischer Produkte längerfristig zu verbessern. Über den Einfluß von supplementiertem α -Tocopherol auf die Qualität von Muskelfleisch von Geflügel sowie Schweinen während der Gefrierlagerung liegen zahlreiche Studien vor. Weniger erforscht hingegen ist der Einsatz im Fischsektor.

In der vorliegenden Studie wurde das Futter von Regenbogenforellen mit drei um den Faktor 10 gestaffelten Konzentrationen an all-rac- α -Tocopherylacetat supplementiert, um den Einfluß der Vitamin-E-Dosierung auf

die Lipidperoxidation und auf etwaige Interaktionen mit dem verabreichten Vitamin K erkennen zu können. Das biochemisch wirksame Vitamin ist Vitamin K₁ Hydrochinon. Es fungiert als Cofaktor bei der posttranslationalen γ -Carboxylierung von vier Blutgerinnungsfaktoren. Für den Einsatz in pelletierten Futtermitteln hingegen eignet sich Menadion als Bisulfit wegen seiner Stabilität sehr gut (14). Menadion entfaltet im Organismus die gleiche Wirkung wie Phyllochinon (10).

Die optimale Vitamin-E-Konzentration im Futter von Forellen zum Schutz vor rasch fortschreitender Lipidperoxidation während der Lagerung ist abhängig von der Supplementierungsdauer vor der Schlachtung und von den Lagerbedingungen (25). Der National Research Council (NRC) legte den Bedarf an α -Tocopherol für Welsarten und Salmoniden mit 50 mg/kg Futter fest (21, 24). In einer Studie von Cowey et al. (7) wurden nach 16wöchiger Supplementierung mit 20 bzw. 100 mg Vitamin E/kg Futter im Muskel von Regenbogenforellen 3,1 μ g bzw. 6,9 μ g α -Tocopherol/g Muskelfrischgewicht gefunden. In einer anderen Studie, mit Zusätzen von 50, 100 bzw. 200 mg α -Tocopherol/kg Futter (1 : 2 : 4) über acht Wochen, wurden nach drei Monaten Lagerung im Gewebe Tocopherol-Konzentrationen im Verhältnis 1 : 1,1 : 1,72 gefunden (13). α -Tocopherol wird nicht bevorzugt im Muskelgewebe gespeichert, sondern findet sich vor allem in der Leber, im Gehirn und in der Niere (7, 17). Dennoch bestätigen die von uns gemessenen Ergebnisse der Lipidperoxidationsparameter, daß höhere Tocopherol-Gehalte im Muskelgewebe einen deutlichen inhibierenden Einfluß auf den Fettverderbsprozeß nach vier, sechs und acht Monaten Lagerung ausüben.

Peroxide als Primärprodukte der Lipidperoxidation sind, so stellte sich durch einen Langzeit-Lagerversuch mit Fischkonserven heraus, als direkter Indikator für den Zustand eines Fettes eher ungeeignet (12). Peroxide sind kein bleibender Bestandteil autoxidierter Fette, sondern können bei veränderten chemischen und physikalischen Bedingungen leicht in nicht peroxidische Verbindungen übergehen (3). Da bei derartigen Studien vorzugsweise die TBA-reaktiven Substanzen erfaßt werden, liegen diesbezüglich kaum Diskussionsansätze vor.

Der Abfall der MDA-Gehalte mit zunehmender Vitamin-E-Dosierung ist signifikant. Hier kommt α -Tocopherol die Funktion zu, offenkettige Peroxylradikale der mehrfach ungesättigten Fettsäuren vor ihrer Zyklisierung zu stabilisieren (Abb. 2). Dadurch wird die Bildung von Malondialdehyd über Endoperoxide unterbunden (9). In einer Untersuchung an Forellen wurden Vitamin-E-Zulagen von 50, 100 bzw. 200 IE/kg Futter zu einer Vitamin-E-armen Basaldiät (10 IE/kg) gefüttert und anschließend die Filets auf die Vitamin-E-Konzentration, die TBA-Werte nach oxidativer Belastung der Filets, sowie auf die organoleptischen Eigenschaften untersucht (12). Die TBA-Werte zeigten eine deutliche Abhängigkeit von der Vitamin-E-Supplementierung und der Vitamin-E-Konzen-

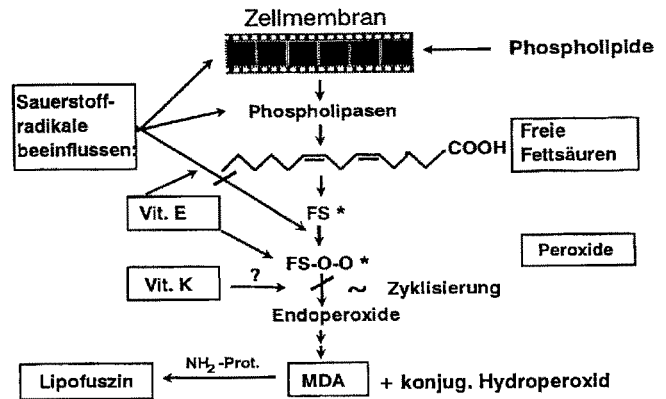


Abb. 2 Funktion von α -Tocopherol als Antioxidans im Bereich der Zellmembran.

tration im Filet. Bei der organoleptischen Beurteilung wurden die Filets mit höheren Vitamin-E-Konzentrationen signifikant bevorzugt.

In einer weiteren Studie an Forellen, die ein Futter ohne Vitamin-E-Zusatz (nativer Gehalt 26 IE/kg) bzw. mit Zusatz von 50 IE/kg erhalten hatten, bewirkte der Zusatz keine Verbesserung der Lipidstabilität bei Tiefkühlagerung (26). Möglicherweise wurden die für eine verbesserte Lipidstabilität erforderlichen Vitamin-E-Konzentrationen im Filet mit dieser Dosierung nicht erreicht.

Auch bei der Welsart *Ictalurus punctatus* bewirkten Vitamin-E-Zulagen von 50 bis 800 IE/kg zu einer Vitamin-E-freien Diät eine dosisabhängige Erniedrigung der TBA-Werte im Fleisch nach dreimonatiger Lagerung bei -10 °C (25). Dabei waren die Effekte bis zur Dosierung von 100 IE/kg Futter besonders ausgeprägt.

MDA-Werte über 3,0 mg/kg, das sind umgerechnet über 41 μ mol/kg, können ein Indikator für schlechte Qualität sein. Nach Gabe eines tocopherolfreien Futters bzw. mit einem Zusatz von 50 mg all-rac- α -Tocopherylacetat/kg Futter wurde diese Grenze überschritten (30).

In der vorliegenden Arbeit wurde keine sensorische Untersuchung vorgenommen. Orientierend an den ermittelten Werten von MDA, würde demnach eine Supplementierung von 20 mg α -Tocopherol/kg Futter zur Qualitätserhaltung nicht ausreichen.

Die Erfassung der Lipofusazine als Sekundärprodukte der Lipidperoxidation läßt eine Korrelation mit den MDA-Gehalten erkennen. Jedoch erlauben die alleinigen Ergebnisse vom letzten Untersuchungstermin ohne Vergleichswerte, auch nicht aus der Literatur, keine Aussage, inwieweit die Umsetzung von MDA mit Proteinen zu Lipofuszinen während der Lagerung stattgefunden hat.

Die Analysenergebnisse der freien Fettsäuren zeigten, daß die physikochemische Assoziation der Tocopherol-Seitenkette mit den Fettsäuren der Membranphospholipide auch eine Stabilisierung der Membranstruktur gegenüber der Aktivität der Phospholipasen bewirkt. Vermutlich re-

suliert dieser Effekt aus der Reduzierung der Lipidperoxidation, weil Lipidperoxide vor allem die Phospholipase A₂ aktivieren (22). Eine niedrige Konzentration an Lipidperoxiden führt somit auch zu einer geringeren Freisetzung an Fettsäuren aus den Zellmembranen. Diese These wird durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt.

Die signifikant geringeren Phyllochinon-Konzentrationen nach erhöhter Zufuhr von α -Tocopherol (200 mg bzw. 2 000 mg/kg Futter) können möglicherweise durch eine Beeinträchtigung der intestinalen Vitamin-K-Absorption im Futter erklärt werden (4). Im Hinblick auf die Blutgerinnung war diese Reduktion allerdings bedeutungslos, da die Aktivierte partielle Prothrombinzeit bei den Forellen auch bei der höchsten Vitamin-E-Dosierung normal war (Dierenfeld E, unveröffentlicht). Nach Supplementierung mit 2 500 mg IE/kg Futter wurden bei der Welsart *Ictalurus punctatus* keine nachteiligen Wirkungen festgestellt (21). In mehreren Fütterungsversuchen mit Küken und Ratten wurde vielfach dann von einer verlängerten Prothrombin-Zeit berichtet, wenn die Vitamin-K-Versorgung a priori unzureichend war und gleichzeitig hohe Dosen an Vitamin E appliziert wurden (1, 6, 23, 27, 31). Eine umfassende Erklärung der beobachteten Effekte kann bislang nicht gegeben werden.

Während der Lagerung blieb die mittlere Vitamin-E-Dosierung (200 mg/kg Futter) ohne Einfluß auf den Phyllochinongehalt im Fischmuskel. Bei der höchsten α -Tocopherol-Konzentration war das Ausmaß der Konzentrationsabnahme an Phyllochinon während der

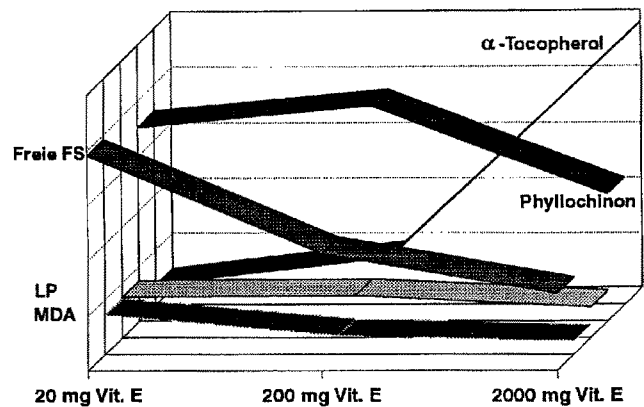


Abb. 3 Dosisabhängiger Einfluß von α -Tocopherol auf die untersuchten Parameter nach 8 Monaten Lagerung bei -18 °C.

32wöchigen Lagerung wesentlich geringer (24 %) als bei der niedrigsten α -Tocopherol-Konzentration. Dieses Phänomen kann unter dem Aspekt möglicher additiver Wirkungen der beiden Redoxsysteme α -Tocopherol und Phyllochinon diskutiert werden.

Mit den Untersuchungen über die dosisabhängige Wirksamkeit von Vitamin E konnte durch diese Studie gezeigt werden, daß bereits 200 mg dl- α -Tocopherylacetat/kg Futter eine Erhöhung der Lagerstabilität bewirken (Abb. 3).

Literatur

1. Abdo KM, Rao G, Montgomery CA (1986) Food Chem Toxicol 24:1043-1050
2. Antonacopoulos N (1968) Untersuchung und Beurteilung von Fischen und Fischerzeugnissen (I-IV). In: Acker L, Bergner KG, Diemair W, Heimann W, Kiermeier F, Schormüller J (Hrsg) Handbuch der Lebensmittelchemie, Band III/2, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S 1482-1537
3. Belitz H-D, Grosch W (1992) Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S 156-161
4. Bieri JG, Corash L, Hubbard VS (1983) New Engl J Med 308:1063
5. Burton GW, Ingold KU (1983) Protective agents in cancer. McBrien DCH, Slater TF (eds), Academic Press, London, p 81
6. Corrigan JJ, Ulfers LL (1981) Am J Clin Nutr 34:1701
7. Cowey CB, Adron JW, Youngson A (1983) Aquaculture 30:85-93
8. DGF-Einheitsmethoden (1984) Peroxidzahl, C-VI 6 a, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
9. Elmadfa I, Bosse W (1985) Vitamin E, Eigenschaften, Wirkungsweise und therapeutische Bedeutung. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S 59-64, 139-158
10. Elmadfa I, Leitzmann C (1990) Ernährung des Menschen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, S 257-272
11. Folch J, Lees M, Stoane-Stanley GH (1957) J Biol Chem 226:497-509
12. Fricker A (1957) Mitt Lebensmitt Hyg 59:428
13. Frigg M, Prabucki AL, Ruhdel EU (1990) Aquaculture 84:145-158
14. Gropp J, Mehringer W (1990) Z Ernährungswiss 29, 4:219-228
15. Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford
16. Hammer C (1988) Verteilung und Akkumulation autofluoreszierender Pigmente in Teleostieren und deren Bestimmungsgroßen. Dissertation, Hamburg
17. Hung SSO, Moon TW, Hilton JW, Linger SJ (1982) J Nutr 112:1590-1599
18. Hung SSO, Slinger SJ (1982) Int J Vit Nutr Res 52:119-124
19. Jakob E, Elmadfa I (1995) Int J Vit Nutr Res, 65:31-35
20. Kiermeier F (1952) Naturwiss 39:323-325
21. Lovell RT, Miyazaki T, Rabegnator S (1984) J Nutr 114:894-901
22. Machlin LJ (1991) Vitamin E. In: Machlin LJ (ed) Handbook of vitamins. Marcel Dekker Inc, New York, pp 99-144
23. March BE, Wong E, Seier L, Sim J, Biely J (1973) J Nutr 103:371-377
24. National Research Council (1993) Nutrient requirements of fish. National Research Council, National Academy Press Washington, D.C.
25. O'Keefe TM, Noble RL (1978) J Fish Res Board Can 35:457-460

26. Pozo R, Laveti J, Love RM (1988) *Aquaculture* 73:165–175
27. Schrogie JJ, Ridgewood NJ (1975) *Am Med Assoc* 232:19
28. Shimizu S, Tani Y, Yamada H, Tabata M, Murachi T (1980) *Anal Biochem* 107:193–198
29. Sierakowski B, Elmadfa I (1987) *Akt Ernährungsmed* 12:93–96
30. Sinnhuber RO, Yu TL (1958) *Food Technol* 12:9–12
31. Wheldon GH, Bhatt A, Keller P, Hummler H (1983) *Int J Vit Nutr Res* 53:287
32. Wong SHY, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach Jr CN, Sunderman Jr FW (1987) *Clin Chem* 33/2:214–220