

Einfluss des Legehennenalters auf chemische und physikalische Veränderungen bei Eiinhaltsstoffen während der Lagerung

Influence of hen age on chemical and physical changes of egg components during storage

Rita POSER, Monika STÜBINGER, L. KRÖCKEL und F. SCHWÄGELE

Zusammenfassung

Die Entwicklung einer schnellen, sicheren und zerstörungsfreien Methode zur Bestimmung der Qualität von Eiern mittels niederauflösender ^1H -Kernresonanzspektroskopie (LR ^1H NMR) setzt voraus, dass die chemisch-physikalischen Veränderungen der Eiinhaltsstoffe während der Lagerung in Abhängigkeit vom Alter der Legehennen untersucht werden. Veränderungen in der Proteinstruktur und der Proteinzusammensetzung in verschiedenen Eikomponenten beeinflussen die Relaxationszeiten. Zur Dokumentation dieser Veränderungen wurden in fünf Versuchsreihen Eier von Legehennen der Herkunft Lohmann Braun untersucht. Da die Relaxationszeiten T2(2) starken individuellen Schwankungen von Ei zu Ei unterliegen, können Aussagen zur Frische immer nur für definierte Kollektive getroffen werden. Demnach beeinflusst das Alter der Legehennen die Relaxationszeiten T2(1) und T2(2) signifikant. Die ermittelten Regressionskoeffizienten bestätigen, dass Lagerzeit und Lagertemperatur im Vergleich zum Alter der Legehennen einen weitaus größeren Effekt auf die resultierenden Relaxationszeiten T2(2) haben. Das gilt auch für die Haugh units. Im Gegensatz dazu lassen sich zu den Veränderungen des Lysozym- und Conalbumingehaltes in Abhängigkeit von Lebensalter und Lagerzeit aufgrund der Streubreite der Einzelwerte keine statistisch gesicherten Aussagen treffen. Das trifft auch auf die untersuchten Proteine der Vitellinmembran zu.

Summary

The development of a fast, reliable and non invasive method for determination of egg quality by means of low resolution ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy requires investigations on chemical and physical changes of egg components during storage in dependence on the age of laying hens. Changes in protein structure and composition of the different protein components are influencing relaxation times. For documentation of these changes eggs of Lohmann Brown hens were stored under various conditions. As relaxation time T2(2) is varying from egg to egg it is not possible to use the resulting data as an absolute freshness indicator. However, the method can be applied for this purpose if relaxation times of larger egg collectives are taken into consideration. The age of the laying hens is significantly influencing the resulting relaxation times T2(1) and T2(2). It can be shown, that there is a much higher influence of storage time and temperature on relaxation times and Haugh units than of hen age. In contrast there seem to be no significant changes in lysozyme and conalbumin content of the egg white as well as in lysozyme, VMOI and VMOII content of the vitelline membrane in dependence upon storage and laying age of the hens.

Schlüsselwörter Hühnereier – Qualitätsparameter – Lagerungsbedingungen – niederauflösende NMR – Eiproteine – Haugh unit

Key Words hen-eggs – quality parameters – storage conditions – low-resolution NMR – egg proteins – Haugh unit

Einleitung

Bis zum heutigen Tage existiert neben an sich einfach handhabbaren physikalischen und relativ langwierigen chemischen Methoden, die zumeist voraussetzen, dass die Eier zerstört werden, keine schnelle und effiziente Möglichkeit, den Frischegrad von intakten Eiern zuverlässig zu bestimmen. Daher erschienen die Ergebnisse der NMR-Untersuchungen von CAPOZZI *et al.* (1998) mit intakten Eiern von Interesse, die einen Zusammenhang zwischen den Relaxationszeiten und der Verflüssigung des Eiklars fanden. Die durchgeführten Untersuchungen waren Bestandteil des EU-Forschungsprojektes „EggDefence“ zur Verbesserung der Qualität von Eiern im Interesse des Erzeugers und Verbrauchers. Die Lagerbedingungen orientierten sich an den Vorgaben der Verordnung zur Lagerung und das Inverkehrbringen von Hühnereiern.

Die ab 01.01.2004 geltende EU-einheitliche Kennzeichnung mit dem Erzeuger-Code gibt Auskunft über die Art der Haltung, die Herkunft des Eies sowie den Betrieb. Diese Angaben einschließlich Legedatum werden heute schon von vielen Erzeugern freiwillig gemacht, wodurch der Verbraucher beim Kauf bewusst zwischen den Produkten auswählen kann. Durch den freiwilligen Aufdruck des Legedatums erhöht sich die Sicherheit, keine überlagerten Eier zu kaufen, die Notwendigkeit geeigneter Kontrolluntersuchungen bleibt jedoch bestehen.

In Zusammenarbeit mit Partnern aus Frankreich, Belgien, Schweden, Schottland und Spanien werden im genannten EU-Projekt unterschiedliche Ansätze zur Verbesserung und Kontrolle der Eiqualität zur Anwendung gebracht. Die Eignung neuer Methoden für den Einsatz in der Praxis wird in diesem Zusammenhang geprüft.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen ist die Schaffung einer zerstörungsfreien, zuverlässigen, schnellen und preisgünstigen Methode zur Bestimmung des Frischezustandes von Eiern nach dem Legen unter Anwendung der LR ¹H NMR.

Methoden

LR ¹H NMR-Messung. Gemessen wurde mit dem minispec mq 10 der Firma Bruker, dessen Probenkopfdurchmesser 55 mm beträgt und intakte Eier fasst. Das Gerät ist mit einem Computer gekoppelt, der die Spin-Echo-Amplituden aufzeichnet, die in der Impulsfolge $90^\circ/\tau/180^\circ$ (τ = Impulsabstand) aufgenommen werden. Bestimmt wird die transversale Relaxationszeit T2 bei unterschiedlichen Amplituden [T2(1) und T2(2)]. Die Proben temperatur entsprach den jeweiligen Lagerbedingungen $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

Haugh unit-Bestimmung. Bei der Messung der Haugh units wird das Verhältnis zwischen Eiklarhöhe und Eigewicht bestimmt (HAUGH, 1937). Dazu wurde ein System bestehend aus Waage, einem Aufschlagtisch mit Spiegel und einem Eiklarhöhenmesser mit Kalibrierblock, der an einen Computer angeschlossen ist, von der Firma Technical Services and Supplies, England verwendet. Zur Berechnung der Haugh units wurde eine geeignete Software eingesetzt.

HPLC. Die Bestimmung der einzelnen Proteine erfolgte mit einem HPLC-System der Fa. Beckmann (München), bestehend aus Pumpenteil, automatischem Probengeber und Diodenarray-Detektor, an einer C-18 Poroshell 300SB-Säule. Die mobile Phase setzt sich zusammen aus dem Puffer A mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) und Puffer B mit 0,08 % TFA in Acetonitril (ACN) der Firma Merck. Bei einer Flussrate von 1,5 ml/min steigt Puffer B von 5 % in 9 Minuten auf 98 % für die Trennung der Proteine des Eiklars und für die Trennung der Proteine der Vitellinmembran von 5 % auf 80 % in 9 Minuten.

Herkunft und Lagerung der Eier. Die untersuchten Eier der Gewichtsklasse M, 53-63 g, stammten aus Käfighaltung und waren bei Anlieferung maximal 24 Stunden alt. Zu Beginn der Versuche befanden sich die Legehennen der Herkunft Lohmann Braun in der 26. Lebenswoche. Mit Eiern dieser Legehennen wurden insgesamt 5 Lagerversuche durchgeführt.

Die Legehennen waren am Ende der Versuchsreihen in der 63. Lebenswoche. Eingelagert wurden die Eier in Klimakammern mit kontrollierter Temperatur und Luftfeuchtigkeit auf handelsüblichen Kartonpaletten. Die Eier wurden in Isolierbehältern zur Messung am minispec mq 10 transportiert und vor Ort weiter temperiert. Die einzelnen Eier wurden maximal für 1 Minute zur Messung aus dem Behälter entnommen.

Folgende Lagerbedingungen wurden angewandt: Durchgängig wurde in allen 5 Lagerversuchen ein Eikollektiv bei 20 °C und 60 % Luftfeuchtigkeit gelagert. Außerdem wurden Eikollektive bei 5 °, 10 °, 15 ° und 25 °C eingelagert. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug durchgängig 60 %. Zum Vergleich wurde ein Eikollektiv bei 45 % relativer Luftfeuchtigkeit eingelagert.

Beleuchtung. Zur Untersuchung des Einflusses von Licht wurden in einem Versuch die Eier über 5 Wochen mit einer Beleuchtungsstärke von 800 Lux und der Lichtfarbe Tageslicht 11 von Osram gelagert.

Probenvorbereitung. Die Eier wurden bei Anlieferung durchnummeriert und gewogen. Um Temperaturunterschiede zu vermeiden, wurden die Eier vor der ersten NMR-Messung einen Tag bei der gewünschten Lagertemperatur eingelagert.

CO₂-Lagerung. Die Eier lagerten in einem speziell gefertigten Schrank im Klimaraum, der mit CO₂ begast war. Der CO₂-Durchfluss wurde mit einem Massendurchflussmengenregler der Firma Aalborg so eingestellt, dass der CO₂-Gehalt $5\% \pm 2$ betrug. Die CO₂-Gehaltsbestimmung erfolgte mit dem CO₂-Analyser der Firma Bacharach.

Ergebnisse

Einfluss des Lebensalters auf die Relaxationszeit T₂(2). Auffällig ist die große Streubreite der gemessenen Einzelwerte, die sich unabhängig von den Lagerbedingungen im Verlauf der Lagerung nicht entscheidend veränderte. Zur Beurteilung des

Frischezustandes konnte daher immer nur ein Kollektiv mit einer Stichprobenzahl ≥ 70 herangezogen werden. Ausreißer ($\mu \pm 4\sigma$) wurden festgestellt und nicht in die Auswertung einbezogen. Für Eier, die in der 26. Lebenswoche gesammelt wurden, gab es bei den Relaxationszeiten T₂(2) Abweichungen von den eigentlich erwarteten Werten (SCHWÄGELE *et al.* 2001), wenn man die Veränderungen von Woche 0 zu Woche 1 betrachtet. Unter Einbeziehung der Ergebnisse aus den pH-Wertmessungen war anzunehmen, dass die Eier bei Anlieferung bereits 48-72 h alt waren.

Unter den gegebenen Bedingungen während der Lagerung von 20 °C und 60 % r. F. stieg der T₂(2)-Wert im Maximum von 498 ms bei den Eiern aus der 31. Lebenswoche auf 552 ms in der 46. Lebenswoche an und verringerte sich zur Woche 63 wieder auf 535 ms. Der Median veränderte sich von 435 ms in der 31. Lebenswoche über 425 ms in der 38. Lebenswoche auf 450 ms in der 46. Lebenswoche um sich in der 63. Woche wiederum auf 440 ms zu verringern (Abb.1).

Zwischen den im Vergleich erhöhten T₂(2)-Werten in der 46. Lebenswoche und einer erhöhten Flüssigkeitsaufnahme durch die Hühner aufgrund hoher Temperaturen scheint ein Zusammenhang zu bestehen, da die Haugh units den umgekehrten Effekt zeigten, d. h. sie lagen für diese Eier um mehrere Einheiten niedriger (vgl. Abb. 4).

Das mit Hilfe der polynomen Regression errechnete 3D-Modell in Abb. 2 zeigt die Abhängigkeit der Relaxationszeit T₂(2) sowohl vom Alter der Legehennen als auch der Lagerzeit, wobei gut sichtbar wird, dass die Lagerzeit den größeren Einfluss hat. Das Bestimmtheitsmaß R² beträgt 0,5, d. h. 50 % der Grundgesamtheit der Einzelwerte werden erklärt. Der Regressionskoeffizient β für das Alter der Legehennen ist positiv (0,1), d. h. mit zunehmendem Alter erhöht sich der T₂(2)-Wert. Im Gegensatz dazu ist der Regressionskoeffizient für die Lagerzeit negativ (-0,7), d. h. mit zunehmender La-

gerzeit verringert sich T2(2). Da der Absolutwert des Regressionskoeffizienten für die Lagerzeit mit 0,7 deutlich größer ist als der Wert für das Alter – dieser beträgt nur 0,1 – hat die Lagerzeit auch den größeren Einfluss auf die Relaxationszeit.

Beim polynomen Regressionsmodell der Relaxationszeit T2(1) ließ sich kein signifikanter Einfluss der Lagerzeit feststellen (Abb. 3). Dafür scheint das Alter der Legehennen signifikant Einfluss auf die Relaxationszeiten T2(1) zu nehmen. Allerdings deckt das Modell mit einem R² von 0,09 nur 9 % der Grundgesamtheit.

Einfluss des Lebensalters auf die Haugh units. Das Regressionsmodell beschreibt, dass sich sowohl Lagerzeit als auch Lebensalter der Hennen auf die Haugh units auswirken (Abb. 5). Der Regressionskoeffizient β ist sowohl für das Alter der Legehennen (-0,4) als auch die Lagerzeit (-0,7) negativ. Das bedeutet, dass sowohl Lagerzeit als auch Lebensalter die Haugh units negativ beeinflussen. Wegen des größeren Absolutwertes ist jedoch der Einfluss der Lagerzeit stärker.

Die Veränderungen des Proteingehaltes sind in Abb. 6 erfasst. Von der 26. Lebenswoche bis zur 46. Lebenswoche reduziert sich der Proteingehalt im Eiklar von 140 mg/ml \pm 30 auf 130 mg/ml \pm 25. Aufgrund der großen Streubreite der Einzelwerte wäre eine größere Stichprobenzahl erforderlich, um die Streuung zu minimieren.

Bei der Lagerung unter Licht traten im Vergleich mit den dunkel gelagerten Eiern größere Gewichtsverluste ein, die durch das Verdunsten von Wasser zustande kommen. Daraus erklärt sich auch der höhere Proteingehalt der Eier.

Die mittels HPLC ermittelten Gehalte an Lysozym und Conalbumin im Eiklar zeigten keinen einheitlichen Trend bezüglich einer Zu- oder Abnahme während der Lagerung bei 20 °C und 60 % r.F. Trotz Erhöhung der Stichprobenzahl von 5 auf 16 ab der 46. Lebenswoche lassen sich beim Conalbumingehalt aufgrund der großen Streubreite der Einzelwerte keine

Aussagen zu Veränderungen in Abhängigkeit von Hennenalter oder Lagerzeit treffen (Abb. 7). Bei Lysozym ist in Abhängigkeit von der Lagerzeit ein Trend hin zu abnehmenden Gehalten zu erkennen.

Im Gegensatz zum Eiklar scheint sich der Proteingehalt der Membranen (VMOI) mit zunehmendem Lebensalter zu erhöhen. Der Median betrug in der 26. Lebenswoche 2,7 mg je Membran, wobei die Schwankungen von 1,6 mg bis zu 3,9 mg reichten. In der 63. Lebenswoche lag der Median bei 4,1 mg, bei einer Variabilität von 3,5 mg bis zu 8,4 mg. Bei der Isolierung der Membranen war zu beobachten, dass zwischen den einzelnen Membranen große Unterschiede in der Dicke und im Blick auf Auflagerungen bestanden, die aber unabhängig von der Größe des Dotters waren.

Beim Vergleich der Lysozymgehalte der Vitellinmembran der Eier von Woche 26 und Woche 63 bestätigt sich der Trend zur Gehaltszunahme, wobei teilweise aber die individuellen Unterschiede der einzelnen Eier überwiegen.

Bei VMOI lagen die ermittelten Peakflächen der Eier aus der 63. Lebenswoche im Vergleich zur 26. Lebenswoche deutlich höher, allerdings waren auch hier starke individuelle Abweichungen feststellbar.

Diskussion

Problematisch für die Auswertung der Ergebnisse sind die verschiedenen hohen Schwankungen in den ermittelten Werten der Eier und fehlende Korrelationen zwischen Gesamtproteingehalt und einzelnen Proteinkomponenten. Die Relaxationszeiten T2(2) der Eier unterliegen starken individuellen Schwankungen, so dass Aussagen zur Eifrische immer nur für definierte Kollektive getroffen werden können. Wie die statistische Auswertung gezeigt hat, beeinflusst das Lebensalter der Legehennen die sich ergebenden Relaxationszeiten T2(1) und T2(2) signifikant, jedoch haben Lagerzeit und Lagertemperatur wegen des größeren

Absolutwertes des Regressionskoeffizienten einen weitaus stärkeren Effekt. Aufgrund der Streubreite der Einzelwerte kann zu den Veränderungen des Lysozym- und Conalbumingehaltes und hinsichtlich möglicher Korrelationen mit den Relaxationszeiten keine statistisch gesicherte Aussage getroffen werden. Der Proteingehalt, bezogen auf das Eiklarvolumen, verringert sich mit zunehmendem Lebensalter. Im Gegensatz dazu erhöht sich der Proteingehalt der Vitellinmembran. Die Haugh units werden vom Alter der Legehennen ebenfalls signifikant beeinflusst, jedoch sind Lager-temperatur und Lagerzeit dominant.

Danksagung

Wir danken den Kollegen vom Department of Animal Product Quality Center for Agricultural Research Ghent in Belgien für die Zusammenarbeit bei der statistischen Auswertung.

Die durchgeführten Arbeiten wurden im Rahmen eines Forschungsvorhabens (QLRT-2000-01606) durch die Europäische Union gefördert.

Literatur

- (1) Hühnereierverordnung (BAnz. 5.Juli 1994 S. 6973, geändert durch V vom 16.12.1994 (BGBl. I S. 3837) und V vom 7.7. 1998 (BGBl. I S. 1807)
- (2) Schwägele, F. et. al. (2001) Anwendung der niederauflösenden NMR-Spektroskopie bei intakten Eiern. *Fleischwirtschaft* 81, S 103
- (3) Capozzi et al. (1998) Thinning of the egg albumen as followed by low field ¹H-NMR. 4th Int. Conf. on the Application of Magnetic Resonance to food Science. Norwich Uk, 7.-9. Sept., S 72
- (4) Haugh R.R. (1937) The Haugh unit for measuring egg quality. *US poultry magazine* 43, S 552

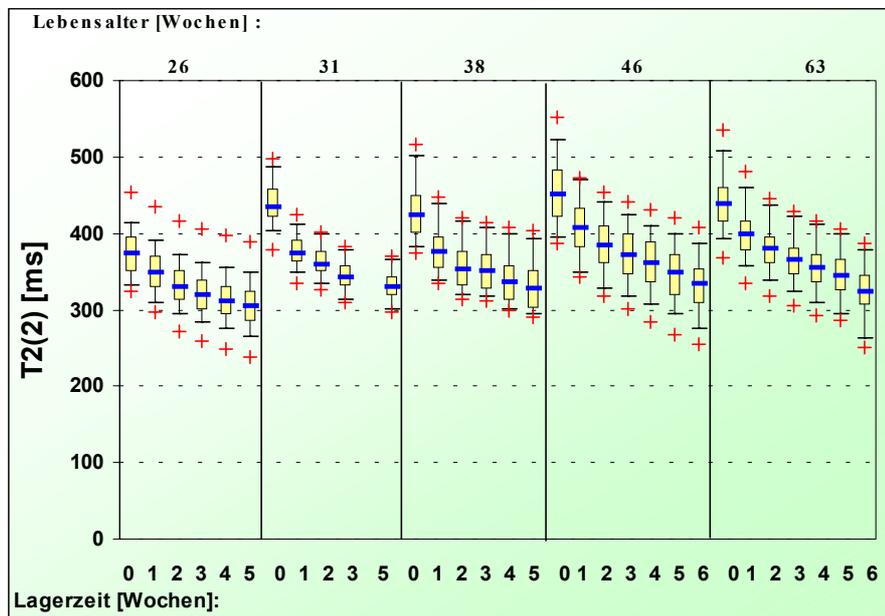


Abb. 1: Verlauf der Relaxationszeit T2(2) von je 70 Eiern bei 20 °C und 60 % relativer Luftfeuchte in Abhängigkeit vom Lebensalter und Lagerzeit

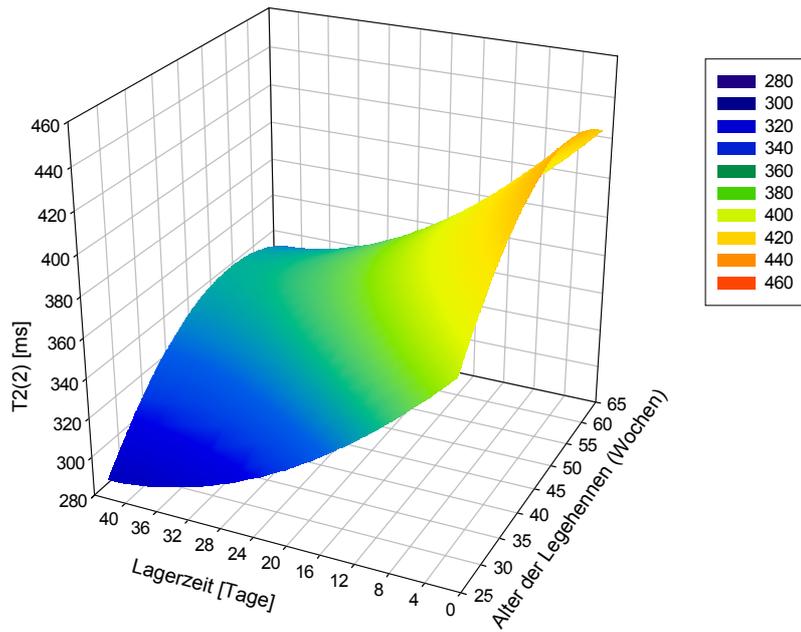


Abb. 2: Einfluss von Lagerzeit und Alter der Legehennen auf die Relaxationszeit T2(2) während der Lagerung bei 20 °C und 60 % r. F.

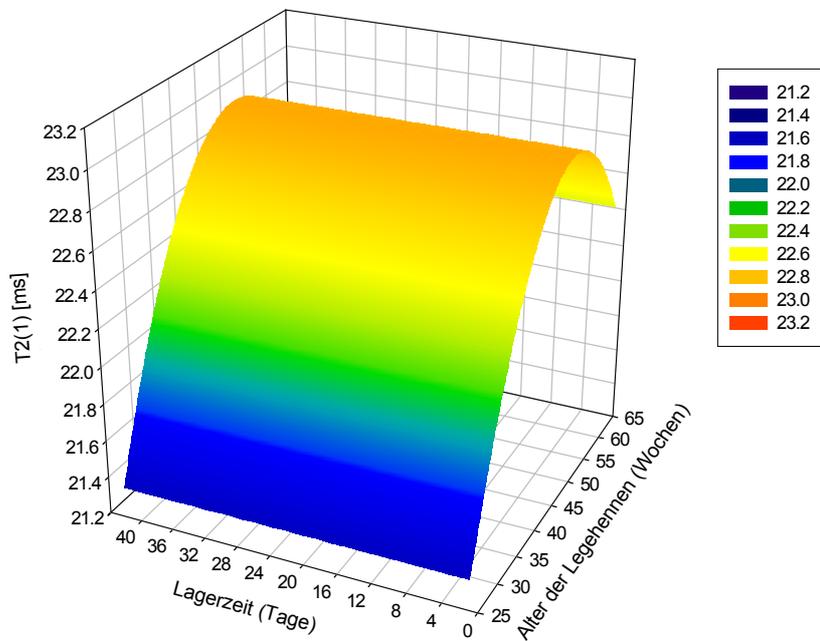


Abb. 3: Regressionsmodell zur Veränderung der T2(1)-Werte im Verlauf der Lagerung bei 20 °C und 60 % r. F.

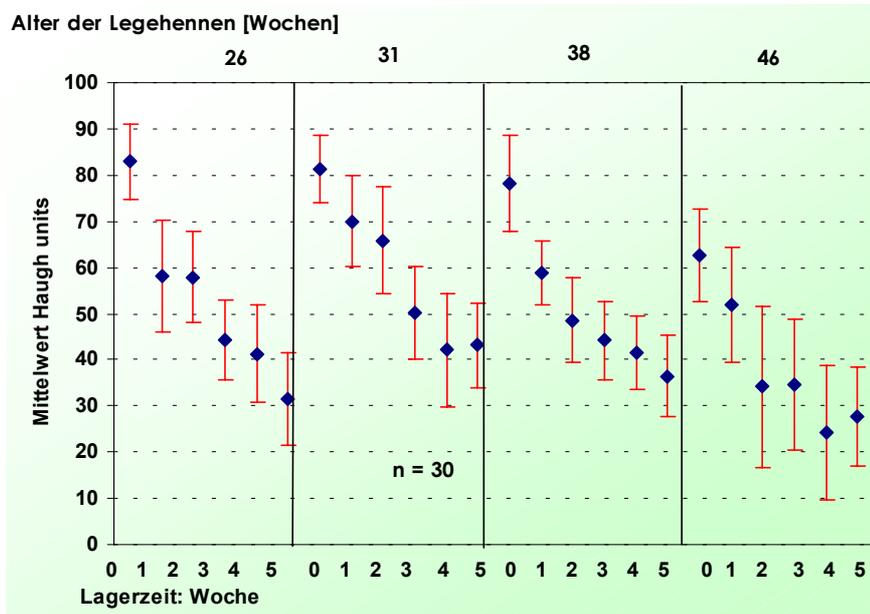


Abb. 4: Veränderungen der Haugh units in Abhängigkeit vom Alter der Legehennen und der Lagerzeit bei 20 °C und 60 % r. F.

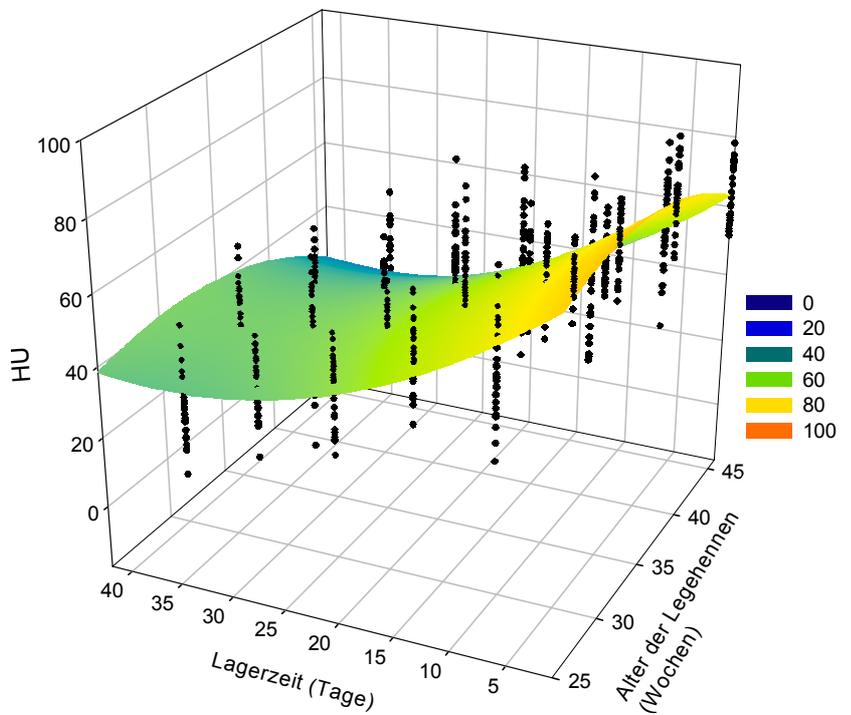


Abb. 5: 3D-Modell Veränderungen der Haugh units in Abhängigkeit vom Alter der Legehennen und der Lagerzeit bei 20 °C und 60 % r. F.

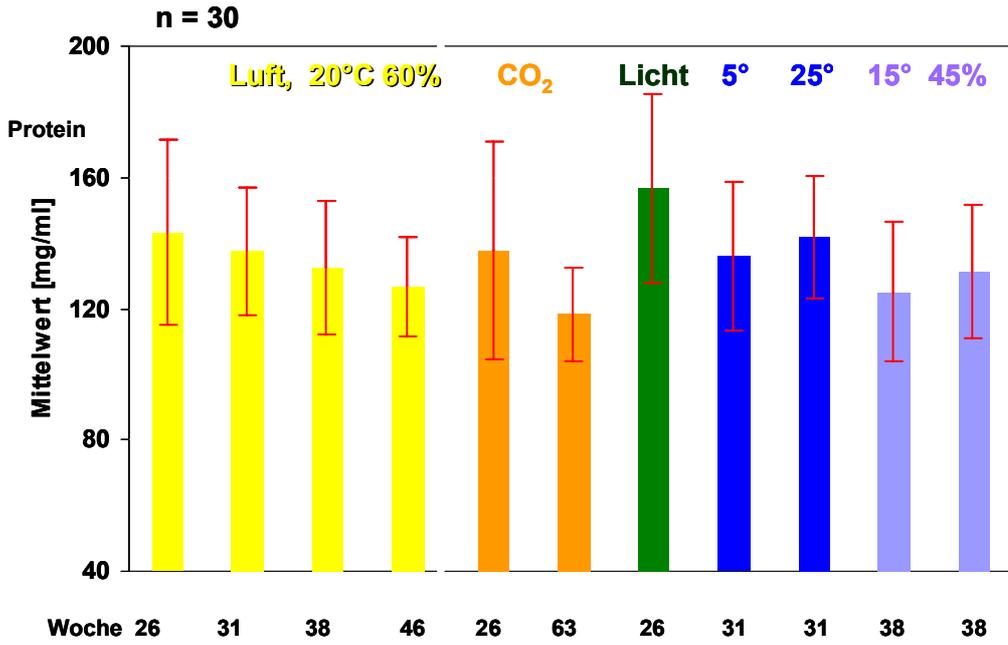


Abb. 6: Proteingehalt des Eiklars in Abhängigkeit vom Lebensalter und Lagerbedingungen

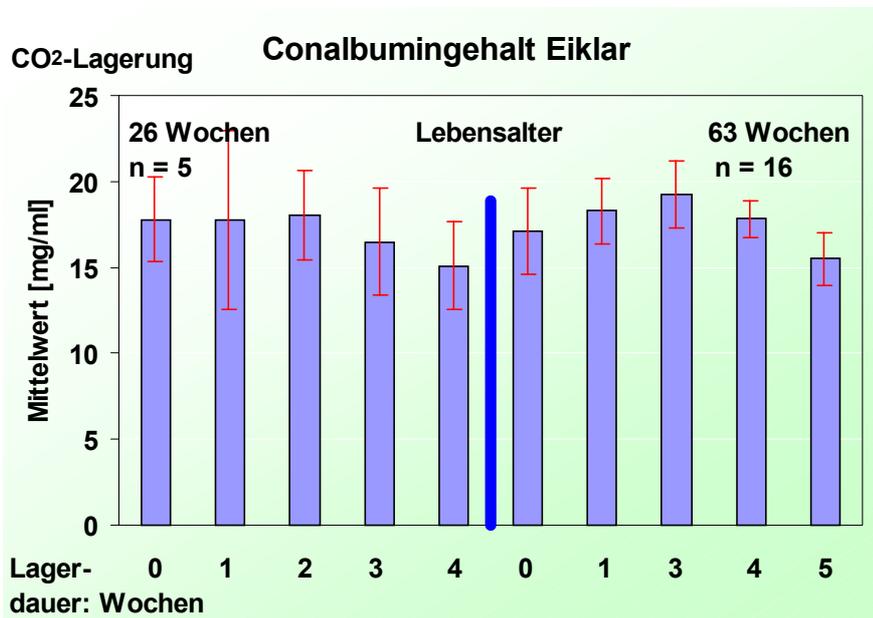


Abb. 7: Vergleich des Conalbumingehaltes im Eiklar in Abhängigkeit von Lagerdauer und Lebensalter