

Aus dem Institut für Chemie und Physik der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach

Kolloidchemische und biochemische Aspekte bei der Verarbeitung von Fleisch*)

Von Reiner Hamm

Einleitung

Brühwürste sind Erzeugnisse, die durch Kuttern von Fleisch mit Wasser und Fett hergestellt, heiß geräuchert und meist auch gebrüht werden. Hierzu gehören Frankfurter und Wiener Würstchen, Fleischwurst, Weißwurst, Lyoner, Gelbwurst, Mortadella, Schinkenwurst, Bier- und Jagdwurst, Krakauer, Leberkäse usw. Sind nun Brühwürste so wichtig, daß sich die Lebensmittelwissenschaft mit ihnen befassen soll?

Geht man davon aus, daß etwa 40 % des bei uns konsumierten Fleisches in Form von Fleischwaren verzehrt werden und daß etwa die Hälfte des verarbeiteten Fleisches auf Brühwurstzeugnisse entfällt, so ergibt sich ein Wert der jährlichen Brühwurstproduktion in der Bundesrepublik von 6 bis 8 Milliarden DM. Diese Beträge unterstreichen deutlich genug die eminente volkswirtschaftliche Bedeutung, die dieser Art von Lebensmitteln in unserem Lande zukommt.

Da die Herstellung von Brühwurstzeugnissen nicht jedermann geläufig ist, sei sie in Kürze skizziert. Rindfleisch, das ein möglichst gutes Wasserbindungsvermögen aufweisen soll, wird entweder im Fleischwolf vorzerkleinert, oder auch unzerkleinert in den Kutter gegeben. In der rotierenden Schale des Kutters wird das Fleisch unter Zusatz von 2 bis 4 % Salz oder Nitritpökelsalz und etwa 50 % Eis oder Eiswasser durch rotierende Schneidmesser fein zerkleinert. Der Wasserzusatz ist zur Erzielung einer wohlgeschmeckenden Ware unerlässlich; er dient also nicht zur Übervorteilung des Verbrauchers. In den Kutter werden dann gekühltes Fett (meist Schweinebauch) in etwa der gleichen Menge wie das Fleisch, ferner Gewürze und eventuell Kutterhilfsmittel gegeben. Die nach diesem Schneid- und Mischvorgang erhaltene breiartige Masse wird als „Brühwurstbrät“ bezeichnet. Das Brät wird in Därme gefüllt; diese werden zu Würsten abgebunden, die dann kurz heißgeräuchert und schließlich gebrüht werden. Räuchern und Brühen können auch in einem Arbeitsgang erfolgen.

Bedeutung des Wasserbindungsvermögens des Fleisches für die Brühwurstherstellung

Mageres Rindfleisch enthält etwa 75 % Wasser. Dieses Wasser ist in irgendeiner Weise gebunden oder immobilisiert, da es beim Anschneiden von Muskelfleisch normalerweise nicht ausfließt. Verantwortlich für die Bindung des Wassers ist das die Struktur der Muskelfasern bildende Muskeleiweiß. Die Muskelfaser (Muskelzelle; Durchmesser 0,01 bis 0,1 cm, Länge bis zu

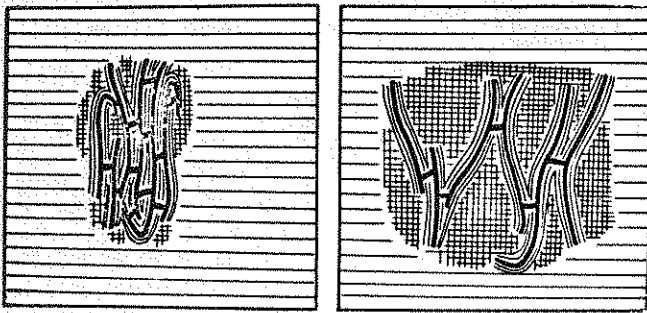
einigen cm) wird von einer dünnen Membran, dem Sarkolemm, umgeben. Innerhalb des Sarkollems sind die Muskelfibrillen (Myofibrillen) wie die Litzen eines Kabels angeordnet. Die Fibrillen wiederum bestehen aus feinen, fadenförmigen Eiweißfilamenten, wobei sich dünne und dicke Filamente längs der Faserrichtung einander abwechseln. Die dicken Filamente bestehen aus dem Eiweißkörper Myosin, die dünnen Filamente aus den Proteinen Actin, Tropomyosin und Troponin. Actin und Myosin stellen die kontraktile Substanz des Muskels dar, während Tropomyosin und Troponin an der Regelung der Muskelkontraktion beteiligt sind. Myosin ist nicht nur ein Strukturprotein, sondern ein Enzym, welches die Dephosphorylierung von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) katalysiert.

Das im Fleisch von Natur aus enthaltene Wasser ist hauptsächlich in den feinen Hohlräumen zwischen den Myofibrillen und zwischen den Filamenten eingelagert und zwar derart, daß es nicht ohne weiteres auszutreten vermag^{1, 2)}. Welche Kräfte es letztlich sind, welche die Immobilisierung des Gewebewassers bedingen, ist trotz zahlreicher neuerer Untersuchungen (vor allen NMR-Studien) auf diesem Gebiet noch wenig bekannt³⁾. Dagegen besteht kein Zweifel, daß es bestimmte Faktoren gibt, welche den Grad der Immobilisierung des Wasser beeinflussen und dafür verantwortlich sind, daß bei Anwendung von Druck — z. B. beim Pressen zwischen zwei Platten — oder beim Erhitzen je nach Beschaffenheit des Fleisches unterschiedliche Mengen an Wasser austreten. Tritt viel Wasser aus, so spricht man von geringem Wasserbindungsvermögen (WBV), tritt nur wenig Wasser aus, so ist das WBV hoch^{1, 2)}.

Unter gewissen Bedingungen vermögen Muskelfasern aus einer umgebenden Flüssigkeit Wasser aufzunehmen, wobei sie je nach Stärke des Wasserbindungsvermögens mehr oder weniger stark quellen. Bei der Quellung von Muskelfasern oder noch verhältnismäßig intakten Faserbruchstücken handelt es sich um eine „begrenzte Quellung“, da das die Faser umschließende Sarkolemm eine sehr weitgehende Volumenzunahme verhindert.

*) Vortrag, gehalten auf dem Deutschen Lebensmittelchemikertag 1976 in Münster.

Wird nun Fleisch zerkleinert, so werden die Muskelfasern zerschlagen und ihre Sarkolemmhüllen zerstört. Bei grober Zerkleinerung (z. B. im Fleischwolf) werden sich noch viele Bruchstücke mit intakter Faserstruktur finden; nach intensiver Zerkleinerung, wie sie im Kutter erfolgt, sind die Fasern jedoch weitgehend in Actin- und Myosinfilamente zerfallen, die nunmehr ein praktisch „unbegrenzt quellbares“ Gel bilden. Unter bestimmten Bedingungen wird auch ein Teil des myofibrillären Eiweißes kolloid gelöst. Zahlreiche Untersuchungen, die vor allem in unserem Laboratorium durchgeführt wurden, haben ergeben, daß alle Faktoren, die eine Schwächung oder Spaltung von Bindungen zwischen den Filamenten oder den Molekülen der myofibrillären Proteine verursachen, auch eine Zunahme des WBV des Brätes bedingen (z. B. Kochsalz, hohe pH-Werte, Polyphosphate, ATP), während eine Verstärkung der Wechselwirkung zwischen Filamenten oder Proteinen (z. B. pH-Senkung, Rigor mortis) den entgegengesetzten Effekt ausübt¹⁾. Stark vernetzte Strukturen vermögen nur geringe Mengen an Wasser aufzunehmen und zu immobilisieren, während eine aufgelockerte Struktur in ihrem weitmaschigen Netzwerk weit mehr Wasser aufzunehmen und festzuhalten vermag (Abb. 1). Bei den zwischen Fila-



Gel (entquollen)

Gel (gequollen)

Abb. 1. Schema des Zusammenhanges zwischen Proteinstruktur und Wasserbindungs- und Quellungsvermögen. Die waagrechten Linien stellen das nicht immobilisierte, die karierten Flächen das immobilisierte Wasser dar. Die starken Linien bedeuten das Netzwerk der Eiweiß-Moleküle oder -Filamente, die parallel zu ihnen verlaufenden dünnen Linien das fest gebundene Hydratwasser, das durch den Quellungszustand nicht beeinflusst wird. Näheres siehe Text¹⁾.

menten bzw. Proteinen wirkenden Kräften, deren Verstärkung oder Schwächung WBV und Quellungsvermögen des Fleisches so entscheidend beeinflussen, handelt es sich in erster Linie um die Wirkung elektrischer Ladungen der Proteine, also um Anziehung entgegengesetzter Ladungen oder Abstoßung gleichsinnig geladener Gruppen. Auf diese experimentell gut unterbaute elektrostatische Theorie der Wasserbindung und Quellung des Fleisches¹⁾ sei hier jedoch nicht näher eingegangen.

Beim Erhitzen des Brätes gerinnt das aus Myosin und Actin gebildete Protein-Netzwerk zu festen Strukturen, in deren Hohlräumen Wasser festgehalten, also „gebunden“ wird. Je weniger Wasser in der nicht erhitzten Eiweißstruktur gebunden war, umso mehr Wasser wird bei Hitzekoagulation ausfließen und umso geringer wird die Qualität der Brühwürste sein. Je höher das Wasserbindungsvermögen des zerkleinerten Muskelgewebes ist, umso mehr des zugesetzten Fettes vermag das weitmaschige Protein-Netzwerk in seinen Hohlräumen festzuhalten, umso besser wird das sogenannte Fettemulgierungsvermögen des Brätes sein^{1, 2)}.

ATP- und Glykogen-Abbau post mortem und ihre Bedeutung für das Wasserbindungsvermögen des Fleisches

Unmittelbar nach dem Schlachten besitzt das Fleisch ein hohes WBV und daher erhält man bei der Verarbeitung von schlachtwarmem Fleisch Brühwürste von besonders guter Qualität, die ausgezeichnete Bindung, günstige Fettemulgierung, guten Geschmack und geringe Gewichtsverluste beim Räuchern, Brühen und Lagern aufweisen und bei Hitzeconservierung weder Wasser- noch Fettabsatz zeigen.

Innerhalb von etwa 12 Stunden nach dem Schlachten nimmt jedoch das WBV des Fleisches stark ab. Aus solchem Material gefertigte Würste neigen zu Wasser- und Fettabsatz; in Biß und Geschmack fallen sie gegenüber Erzeugnissen aus schlachtwarmem Material stark ab. Was ist geschehen?

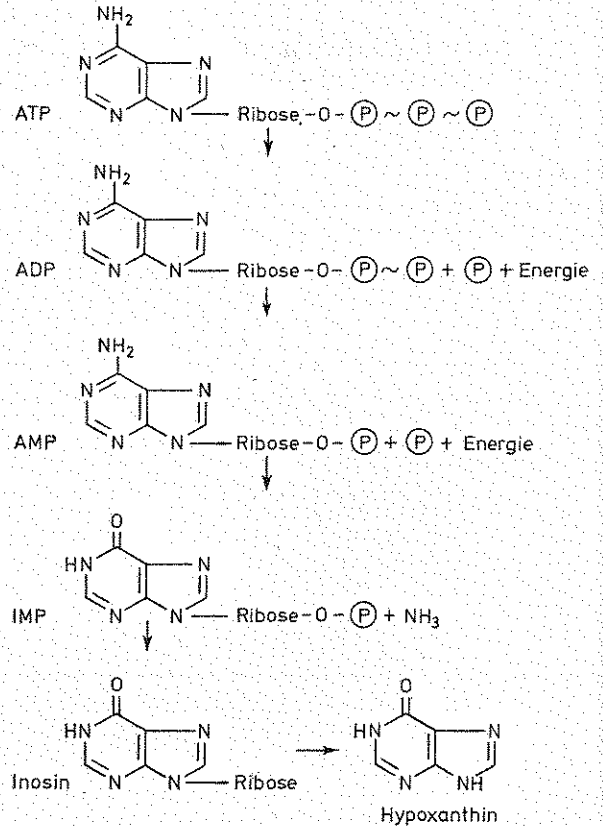


Abb. 2. Schema des ATP-Abbaues post mortem.

Im lebenden Tier wie auch unmittelbar nach dem Schlachten enthält das Muskelgewebe etwa 6 μMol /ATP/g Gewebe ($\sim 3 \text{ mg ATP/g Gewebe}$). Dieses organische Polyphosphat verhindert eine Assoziation von Myosin- und Actinfilamenten und bedingt daher ein lockeres Protein-Netzwerk mit hohem WBV. Innerhalb weniger Stunden post mortem werden aus dem sarkotubulären System der Muskelzelle (sarkoplasmatisches Reticulum) winzige Mengen an Ca^{++} -Ionen freigesetzt, die eine Aktivierung der Myosin-ATPase hervorrufen. Unter dem Einfluß der ATPase wird ATP zu ADP dephosphoryliert. Solange noch Creatinphosphat (CP) im Muskel vorhanden ist, wird aus CP und ADP unter der Wirkung des Enzyms Creatinphosphokinase ATP resynthetisiert. Da jedoch der CP-Vorrat schon innerhalb etwa einer Stunde post mortem erschöpft ist und auch der gleichzeitig verlaufende anaerobe Glykogen-Abbau (s. u.) nicht genügend ATP

nachzuliefern vermag, sinkt der ATP-Gehalt des Gewebes ab, wobei das gebildete ADP durch das Enzym Myokinase (Adenylatkinase) weitgehend in Adenosinmonophosphat (AMP) übergeführt wird. AMP aber wird sehr rasch durch Adenylat-Desaminase zu Inosinmonophosphat (IMP) desaminiert^{4, 5} (Abb. 2). Wir fanden in allen unseren Untersuchungen bei sinkender ATP-Konzentration im Gewebe stets die Bildung einer äquimolaren Menge an IMP^{6, 7, 8, 9}. Im Gegensatz zum ATP ist IMP nicht mehr in der Lage, eine Verknüpfung von Myosin und Actin zum Actomyosin-Komplex zu verhindern und so das hohe WBV des Fleisches zu erhalten; es bildet sich daher ein verdichtetes Netzwerk von Actomyosin, das wesentlich weniger Wasser zu immobilisieren vermag als dies bei Anwesenheit von ATP der Fall ist (Abb. 3). Die Asso-

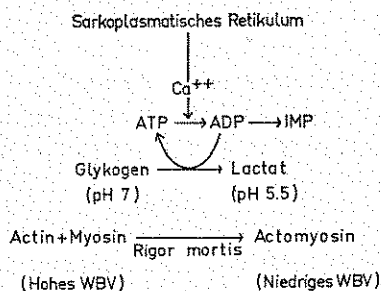


Abb. 3. Schema der biochemischen Veränderungen im Muskel post mortem.

ziation der Actin- und Myosinfilamente führt ferner zu einem Starrwerden des in schlachtfischem Zustand noch weichen Muskels, zu dem „Rigor mortis“ (Abb. 4).

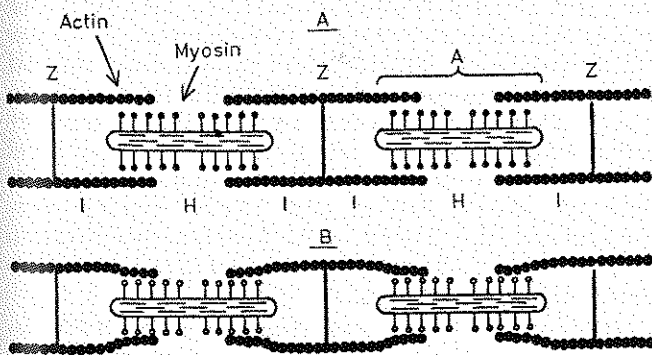


Abb. 4. Schema des Rigor mortis. A: Actin- und Myosin-Filamente im Zustand prae rigor (in Anwesenheit von ATP); B: Actin- und Myosin-Filamente im Zustand des Rigor mortis (kein ATP zugegen). Die „Köpfe“ der Myosin-Moleküle sind mit den Actin-Einheiten verknüpft.

Der weitere enzymatische Abbau von IMP über Inosin zum Hypoxanthin (Abb. 2) geht wesentlich langsamer vonstatten und ist auch nach mehreren Tagen Kühlagerung noch nicht abgeschlossen.

Neben der Myosin-ATPase kommen in der Muskelzelle noch einige weitere, an die Membranen verschiedener Organellen (Mitochondrien, sarkoplasmatisches Reticulum, Sarkolemm etc.) gebundene ATPasen vor¹⁰). Durch das Studium des Einflusses von Aktivator- und Inhibitoren der verschiedenen ATPasen konnten wir jedoch zeigen, daß für den ATP-Abbau im Muskel post mortem in erster Linie die myofibrilläre ATPase (Myosin- bzw. Actomyosin-ATPase) verantwortlich ist¹¹).

Für die quantitative Bestimmung von ATP und seinen Abbauprodukten bis zum Hypoxanthin entwickelten wir eine dünn-schicht-chromatographische Methode, bei der die Mengen der getrennten Komponenten unmittelbar von der Platte mit hoher Empfindlichkeit mittels eines Chromatogramm-Spektralphotometers gemessen werden können^{12, 13}). Die Zuverlässigkeit der Analyse kann für jeden Ansatz leicht überprüft werden, da alle gemessenen Metaboliten, die post mortem im Muskel auftreten, fast ausschließlich durch Abbau von ATP entstehen. Es muß daher die Summe der Konzentrationen aller ATP-Metaboliten einschließlich des ATP selber zu jedem Zeitpunkt p. m. die gleiche sein. Ist dies nicht der Fall, so war bei der Analyse ein Fehler unterlaufen⁶).

Der ATP-Abbau im Muskel nach dem Tod des Tieres ist begleitet von einer Abnahme des pH-Wertes von Werten über 7 auf etwa pH 5,5. Diese pH-Abnahme, die auf dem anaeroben enzymatischen Abbau des Muskelglykogens zu Lactat beruht¹⁴), bedingt ebenfalls eine Abnahme des WBV des Fleisches, da das Gewebe bei pH 7 ein wesentlich höheres WBV zeigt als bei pH 5,5. Bei pH 5, dem isoelektrischen Punkt des myofibrillären Eiweißes, zeigt das WBV ein ausgeprägtes Minimum, da hier eine maximale Anzahl entgegengesetzt geladener, sich elektrostatisch anziehender Gruppen der Proteine und daher eine besonders starke intermolekulare Vernetzung besteht. Etwa zwei Drittel der postmortalen WBV-Abnahme sind dem ATP-Abbau, ein Drittel der pH-Senkung zuzuschreiben¹).

Die enzymatische Hydrolyse des ATP initiiert und kontrolliert den Abbau von Glykogen im Muskelgewebe nicht nur in vivo, sondern auch post mortem. Anhand von Modellsystemen aus Substraten und Enzymen konnte Scopes¹⁵) zeigen, daß Glykolyse nur eintritt, wenn ATP dephosphoryliert wird. Der physiologische „Sinn“ der Glykolyse (eigentlich „Glykogenolyse“) besteht in der Aufrechterhaltung der ATP-Konzentration in der Muskelzelle, da ein Teil der bei dem Glykogenabbau freiwerdenden Energie zur Resynthese von ATP aus ADP genützt wird (Abb. 5), unter aeroben Bedingungen allerdings in weit stärkerem Maße als unter den post mortem gegebenen anaeroben Verhältnissen. Die Geschwindigkeit der Glykolyse wird durch die Geschwindigkeit des ATP-Abbaues bestimmt¹⁶), welche hauptsächlich die Phosphorylase- und Phosphofruktokinase (PFK)-Stufen der Glykolyse beeinflusst (siehe (1) und (2) in Abb. 5). Abnahme der ATP-Konzentration stimuliert diese Reaktionen und umgekehrt. Hohe ATP-Konzentrationen hemmen ferner die Pyruvatkinase (Stufe (4) in Abb. 5). Wir konnten zeigen, daß Beschleunigung oder Verlangsamung der ATP-Hydrolyse im Rindermuskel post mortem durch bestimmte Behandlungsverfahren wie z. B. Zerkleinern, Temperatursenkung, Zusatz von NaCl oder Diphosphat etc. die Geschwindigkeit der Glykolyse vor allem über die Phosphorylase- und PFK-Stufe beeinflusst^{17, 18, 19, 20}).

Bei solchen Studien bestimmten wir zu verschiedenen Zeitpunkten p. m. sämtliche Metaboliten der Glykolyse einschließlich des Glykogens, des Lactats und der während der Spaltung des Glykogenmoleküls zu Hexosephosphaten unter dem Einfluß des „debranching enzyme“ entstehenden freien Glucose. Diese Untersuchungen wurden durch die Entwicklung einer neuen Methode erleichtert, die es gestattet, in

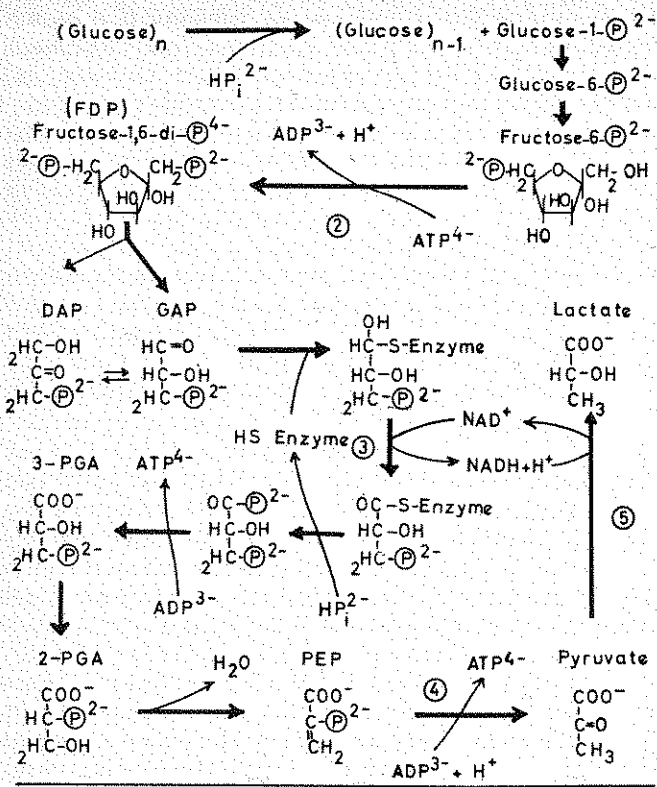
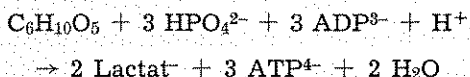


Abb. 5. Anaerober Abbau von Glykogen im Muskel ¹⁴⁾.
(P) ²⁻ = -O-PO₃²⁻.

dem gleichen Perchlorsäure-Extrakt, in dem die Metaboliten mit den üblichen enzymatischen Methoden bestimmt werden, auch das Glykogen durch enzymatischen Abbau mittels Amyloglucosidase und enzymatische Bestimmung der entstandenen Glucose zu ermitteln ²¹⁾. Zu allen Zeitpunkten zwischen 0 und 24 Std. post mortem machten Glykogen, Glucose, Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat und Lactat mehr als 95 % aller Metaboliten der Glykolyse aus ¹⁹⁾. Die Glykolyse post mortem endet durch eine Inaktivierung der Phosphorylase und der PFK auf Grund des Mangels an Nucleotiden und/oder der pH-Senkung.

Wir stellten ferner fest, daß im unzerkleinerten wie im zerkleinerten Muskel neben der Glykolyse (einschließlich der Bildung von Glucose durch das „debranching enzyme“) im allgemeinen keine anderen Abbauege für das Glykogen und die Hexosephosphate in Betracht kommen ¹⁹⁾. In Einzelfällen ließ sich aber die Möglichkeit anderer Abbauege nicht ganz ausschließen ^{7, 11, 18, 19)}.

Es sei betont, daß die Geschwindigkeit der die Verarbeitungsqualität des Fleisches so stark bestimmenden ATP-Abnahme post mortem nicht unbedingt das Ausmaß des insgesamt im Gewebe abgebauten ATP, des „ATP-Turnover“ und daher auch nicht die Höhe der ATPase-Aktivität im Muskel widerspiegelt. Man muß nämlich berücksichtigen, daß durch die gleichzeitig ablaufende Glykolyse ADP wieder zu ATP phosphoryliert wird (Abb. 5); es muß auch der Abbau dieses durch Resynthese gebildeten ATP in Rechnung gestellt werden ²²⁾.



Bleibt z. B. unter bestimmten Bedingungen der ATP-Gehalt im Gewebe post mortem konstant, so kann dies auf einer vollständigen Hemmung der ATP-Hydrolyse und damit auch der Glykolyse beruhen oder aber auf einem raschen ATP-Turnover derart, daß das hydrolysierte ATP via Glykolyse sofort wieder resynthetisiert wird. Die tatsächliche ATPase-Aktivität post mortem kann nur durch Berechnung des ATP-Turnover aus der gemessenen Abnahme der ATP-Konzentration im Gewebe ($\Delta[\text{ATP}]$) und der gleichzeitigen Zunahme der Lactat-Konzentration ($\Delta[\text{Lactat}]$) berechnet werden, wobei nach der oben angeführten Formel dem Auftreten von einem Lactatmolekül die Bildung von 1,5 Molekülen ATP entspricht ²²⁾:

$$\text{ATP-Turnover} = [\text{ATP hydrolysiert}] = \Delta[\text{ATP}] + 1,5 \Delta[\text{Lactat}].$$

Vorsalzen von schlachtwarmem Fleisch

Kehren wir aber wieder zur Brühwurst zurück. Für die Abnahme des WBV post mortem ist, wie eben gezeigt wurde, der Abau von ATP und Glykogen verantwortlich. Aus praktischen Gründen ist es oft nicht möglich, schlachtwarmes Fleisch sofort zu verarbeiten. Man kann jedoch das hohe WBV des schlachtfrischen Rindfleisches über mehrere Tage aufrecht erhalten, indem man 2 bis 4 % Kochsalz zusetzt, noch ehe der ATP-Abbau begonnen hat, d. h. innerhalb von etwa 4 Stunden post mortem. Diese Kochsalzmenge wird für die Brühwurstfabrikation ohnehin benötigt. Brühwürste aus solchem schlachtwarm vorgesalzenem Fleisch besitzen die gleiche ausgezeichnete Bindung und „Fett-emulgierung“ wie Produkte, die aus frischem, schlachtwarmem Material hergestellt sind ^{1, 2)}. Dies ist in der Praxis seit langem bekannt, doch war man sich über die Ursache des Effektes nicht im klaren. Zunächst lag es nahe, zu vermuten, daß NaCl-Zusatz den Abbau von ATP post mortem hemmt und damit eine Abnahme des WBV verhindert. Wir haben hier zwei Schritte der Verarbeitung zu unterscheiden, von welchen jeder die Geschwindigkeit der biochemischen Veränderungen im Fleisch post mortem beeinflussen kann: (1) die Zerkleinerung des schlachtwarmen Fleisches und (2) das Salzen.

Zerkleinern ruft eine Beschleunigung des ATP-Abbaues post mortem hervor ⁶⁾ (Abb. 6); der ATP-Turnover wird um etwa das dreifache gesteigert ²²⁾. Es handelt sich hier also um eine Steigerung der ATPase-Aktivität. Diese wird sehr wahrscheinlich dadurch hervorgerufen, daß aus dem zerstörten sarkoplasmatischen Reticulum myofibrilläre ATPase aktivierende Ca⁺⁺-Ionen rascher freigesetzt werden, als aus dem noch intakten Reticulum. Zusatz von NaCl bewirkt nicht etwa eine Hemmung, sondern sogar eine weitere Beschleunigung der ATP-Abnahme im zerkleinerten Gewebe ⁷⁾; aus einer gleichzeitigen Erhöhung des ATP-Turnover kann auf eine zusätzliche Aktivierung der ATPase geschlossen werden ^{7, 22)}. Dies ist überraschend, da aus Studien mit isoliertem Myosin und Actomyosin NaCl in der hier in Betracht kommenden Ionenstärke eine Hemmung und keine Aktivierung des Enzyms erwartet werden sollte ⁷⁾. Im Rigor- und Post-Rigor-Muskel konnten wir auch tatsächlich eine solche Hemmung der ATPase-Aktivität durch NaCl beobachten ⁹⁾ nicht aber im Prae-rigor-Muskel. Wir

führen diesen Effekt darauf zurück, daß im zerkleinerten schlachtfrischen Fleisch noch erhebliche Mengen an Ca^{++} -Ionen an die Bruchstücke des sarkoplasmatischen Reticulums gebunden sind, die bei Kochsalzzusatz durch Austausch gegen Na^+ -Ionen freigesetzt werden und Myosin-ATPase aktivieren⁷⁾. Warum aber sinkt hier trotz des ATP-Abbaues das WBV des Fleisches nicht ab?

WBV erfolgen kann. Sehr wahrscheinlich werden durch die kombinierte Wirkung von ATP, Natriumchlorid und hohem pH-Wert im schlachtwarm gesalzenen Fleisch die elektronegativen Ladungen der Muskelproteine so stark erhöht, und hierdurch die Assoziation von Myosin- und Actinfilamenten so weitgehend verhindert, daß sich kein Rigor mortis entwickeln kann^{1, 9)}.

Verarbeitung von schlachtfrisch eingefrorenem Fleisch

Das Vorsalzen von schlachtwarmem Fleisch ist nur von bedingtem praktischem Wert, da dieses Material nur wenige Tage aufbewahrt werden kann. Da heute aber viele Betriebe nicht mehr selber schlachten, sondern das Fleisch in gekühltem oder gar gefrorenem Zustand von Groß- und Versandschlachtereien beziehen, erhebt sich die Frage, ob es nicht möglich ist, das hohe WBV des schlachtfrischen Fleisches über Wochen oder gar Monate dadurch aufrecht zu erhalten, daß man das Fleisch noch vor Abbau des ATP rasch einfriert. Durch rasches Gefrieren von zerkleinertem Rindfleisch bei etwa -20°C (oder tiefer) wird nämlich der enzymatische Abbau von ATP und Glykogen fast völlig unterbunden²⁵⁾. Taut man jedoch solches Material zur Verarbeitung wieder auf, so werden ATP und Glykogen mit erhöhter Geschwindigkeit abgebaut und es kommt daher zu einem verstärkten Rigor mortis („Tau-Rigor“). Die Folge ist eine sehr starke Abnahme des WBV^{1, 5)}. Würste aus solchem Fleisch sind von ganz unbefriedigender Qualität. Ursache dieses intensiven Tau-Rigors ist eine Schädigung des sarkoplasmatischen Reticulums durch Gefrieren und Auftauen, die eine Freisetzung von Ca^{++} -Ionen aus dem Reticulum und damit erhöhte ATPase-Aktivität hervorruft.

Zerkleinert man jedoch das schlachtfrisch vor ATP-Abbau gefrorene Material ohne vorheriges Auftauen zusammen mit Kochsalz im Kutter, so erhält man aus solchen Bräten Würste von hervorragender Qualität¹⁾. Entscheidend hierbei ist es, daß das Salz die Teilchen des zerkleinerten Fleisches im Augenblick des Auftauens durchdringt und hierdurch das Eintreten des Rigor mortis in den Faserfragmenten und Filamenten verhindert⁹⁾. Auch mit schlachtwarm gesalzenem und eingefrorenem Fleisch erhält man selbst nach längerer Gefrierlagerung bei Verarbeitung des gefrorenen Materials im Kutter vorzügliche Würstergemische¹⁾. Der bei der Verarbeitung von Kaltfleisch zulässige Zusatz von Diphosphat ist bei diesen Verarbeitungstechniken unnötig; ein Phosphatzusatz wird ohnehin von vielen Herstellern nicht verwendet, da die erforderliche Deklaration ihre eigenen Probleme mit sich bringt.

Gefriergetrocknetes Brühwurstfleisch

Wichtig für die eben erörterte Wirkung des Salzens von schlachtwarmem Fleisch ist es, daß Kochsalz das Gewebe durchdringt, noch ehe der ATP-Abbau eingesetzt hat. Dieses Prinzip läßt sich mit Erfolg auch auf die Gefrier Trocknung von Fleisch anwenden. Bekanntlich zeigt konventionell gefriergetrocknetes Fleisch nach Rehydratation ein erheblich schlechteres WBV als das frische Ausgangsmaterial²⁶⁾. Der Gedanke lag nahe, zur Erzielung eines gefriergetrockneten, rehydratisierten Produktes mit guter Wasserbindung Fleisch in schlachtwarmem Zustand rasch einzufrieren und gefrierzutrocknen. Bei entsprechenden Untersuchungen

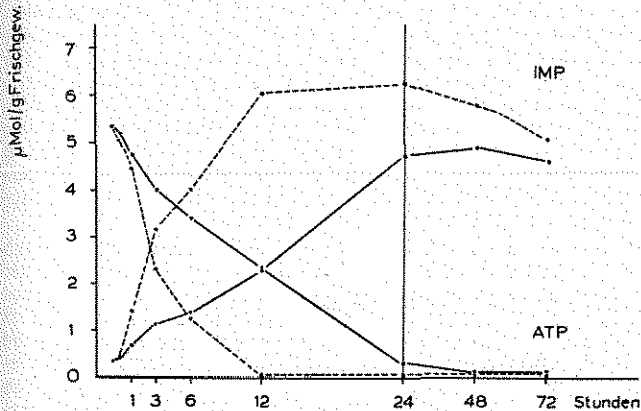


Abb. 6. Einfluß des Zerkleinerns von Rindermuskel auf den enzymatischen Abbau von ATP zu IMP post mortem. —: intakter Muskel; - - - - -: zerkleinerter Muskel⁹⁾.

Die Antwort auf diese Frage gaben uns Untersuchungen über das rheologische Verhalten von Muskelhomogenaten mittels des Rotationsviskosimeters^{23, 24)}. Innerhalb der ersten Stunden nach dem Schlachten nahmen im zerkleinerten Fleisch die rheologischen Werte (scheinbare Viskosität, Fließgrenze) stark zu; nach etwa 24 Stunden, also im Zustand des Rigor mortis, erreichten die Werte ein Maximum, um dann wieder abzusinken. Dieses Maximum, das eine Folge des in den Faserbruchstücken eintretenden Rigors ist, trat nicht auf, wenn das Fleisch in schlachtwarmem Zustand gesalzen war (Abb. 7).

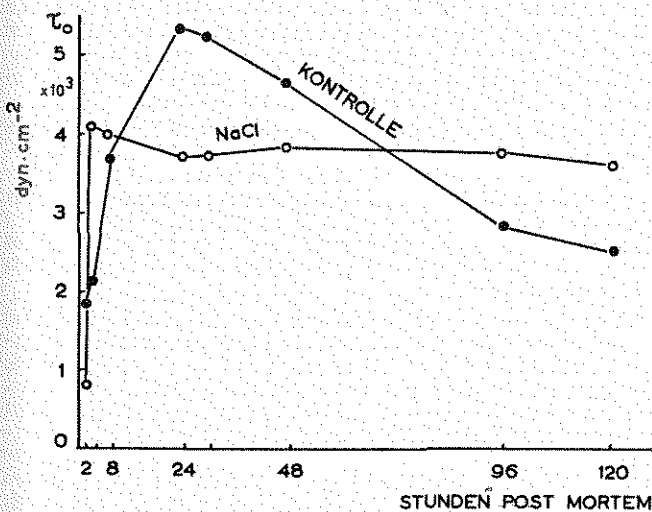


Abb. 7. Fließgrenze zu verschiedenen Zeitpunkten post mortem von Homogenaten, hergestellt aus Rindermuskel, der prae rigor (schlachtwarm) zerkleinert und mit und ohne NaCl-Zusatz (3%) die angegebene Zeit gelagert worden war. Wasserrzusatz 50%^{23, 24)}.

Daraus ist zu folgern, daß in den Faserfragmenten und Filamenten des gesalzenen Materials kein Rigor, also keine enge Assoziation von Myosin und Actin eintritt. Es ist klar, daß dann auch keine Abnahme des

kamen uns Ergebnisse von Studien zustatten, die wir zuvor auf Anregung von Acker, Münster, durchgeführt hatten. Es hatte sich gezeigt, daß während der Lagerung von Fleisch, das vor Einsetzen der biochemischen Abbauvorgänge gefriergetrocknet worden war, unterhalb von 40 % rel. Luftfeuchtigkeit der enzymatische Abbau von ATP, Glykogen und Hexosephosphaten völlig gehemmt ist^{27, 28}). Die Hydrolyse von Triglyceriden und Cholesterin durch Muskellipasen, die zu nachteiligen Geschmacksveränderungen während der Lagerung führt, ist jedoch erst bei rel. Luftfeuchtigkeit unter 10 % unterbunden, so daß das Fleisch auf einen Wassergehalt von höchstens 3 % getrocknet werden muß²⁸). Die Enzyme der Glykolyse und die ATPase behalten auch nach längerer Lagerung des Trockenproduktes ihre Aktivität. Bei Rehydratation kommt es — aus gleichen Gründen wie beim Tau-Rigor (s. o.) — zu einem sehr raschen Abbau von ATP und Glykogen; schon nach 5 Minuten ist alles ATP verschwunden. Die Folge ist ein intensiver Rigor mortis in den Partikeln und ein entsprechend starker Verlust des WBV des Fleisches^{28, 29}). Nach den oben geschilderten Erfahrungen war nun zu erwarten, daß der Abbau keinen Rigor und daher auch keinen Wasserbindungsverlust hervorrufen sollte, wenn noch vor dem ATP-Abbau, d. h. vor der Rehydratation, Kochsalz zugegen ist. Dies ist in der Tat der Fall.

Auf dieser Basis wurde ein neues Verfahren zur Herstellung von gefriergetrocknetem Brühwurstfleisch entwickelt^{30, 31}). Das schlachtfrische Rindfleisch wird so rasch wie möglich grob geschrotet, mit 2 bis 4 % Kochsalz vermischt, in verhältnismäßig dünner Schicht bei etwa 40° C rasch eingefroren und dann gefriergetrocknet. Das Material wird unter Vakuum in Plastikbeuteln verpackt und bei Zimmertemperatur gelagert. Zur Verarbeitung wird das hellbraune Pulver im laufenden Kutter mit etwa soviel Eiswasser rehydratisiert wie dem Fleisch durch Trocknung entzogen war (3 Teile Wasser auf 1 Teil Trockenfleisch). Die weitere Verarbeitung zu Brühwurst entspricht völlig dem konventionellen Prozeß. Man erhält mit diesem Verfahren Produkte, die in ihrer Qualität (WBV, Fettemulgierung, Aroma, Biß) von Würsten aus frischem, schlachtwarmem Fleisch nicht zu unterscheiden sind.

Das in der geschilderten Weise hergestellte „Instant-Wurstfleisch“ bietet gegenüber gekühltem Fleisch oder Gefrierfleisch eine Reihe bedeutender Vorteile:

1. Die Lagerung des Trockenproduktes kann selbst bei tropischen Temperaturen ohne Kühlung erfolgen.
2. Das Gewicht beträgt nur ein Viertel des frischen Fleisches; dies ist bei Transporten von Vorteil.
3. Das Produkt garantiert auch nach monatelanger Lagerung Brühwurstzeugnisse von ausgezeichneter Qualität.
4. Die Verwendung von Kutterhilfsmitteln (z. B. Diphosphat) ist nicht erforderlich.
5. Probleme bei der Verarbeitung von schlecht bindendem gekühltem oder gefrorenem Fleisch können durch Beimischen des Trockenproduktes, das wie ein Bindemittel wirkt, vermieden werden.
6. Das gefriergetrocknete Produkt ist für den Fleischwarenhändler wesentlich leichter zu lagern und zu handhaben als frisches oder gefrorenes Fleisch. Er muß sich nicht kurz vor der Herstellung um die Beschaffung geeigneten Rindfleisches bemühen, wenn er in seinem Lagerraum Behältnisse mit dem Trockenprodukt griffbereit verfügbar hat, aus dem er jederzeit Brühwurstzeugnisse erstklassiger Qualität fertigen kann.

Das Trockenprodukt eignet sich auch vorzüglich zur Herstellung von Rohwurst (z. B. Salami). Es eignet sich ferner für die Herstellung von Hamburger, Frikadellen, Kloppen und ähnlichen Erzeugnissen in Großküchen und am häuslichen Herd. Es ist nicht ausgeschlossen, daß in absehbarer Zeit einmal derartige Trockenprodukte auf den Markt kommen.

Zusammenfassung

Der Wert der jährlichen Produktion von Brühwurstzeugnissen in der Bundesrepublik Deutschland geht in die Milliarden. Die lebensmittelchemische Erforschung der für die Herstellung dieser Produkte optimalen Bedingungen ist daher von erheblicher volkswirtschaftlicher Bedeutung. Entscheidend für die Qualität von Brühwürsten ist ein gutes Wasserbindungsvermögen (WBV) des verwendeten Rindfleisches. Die Bindung des fleischeigenen und des zugesetzten Wassers erfolgt vorwiegend durch die strukturbildenden Muskeleiweißkörper Myosin und Actin.

Würste aus ganz frischem, noch „schlachtwarmem“ Fleisch sind von hervorragender Qualität, da das WBV durch die Anwesenheit von muskeleigenem Adenosintriphosphat (ATP) sowie durch den verhältnismäßig hohen pH-Wert sehr hoch ist. 12 bis 24 Stunden nach dem Schlachten ist jedoch das Fleisch für die Brühwurstherstellung weit weniger gut geeignet, da ATP enzymatisch zu Substanzen abgebaut ist, welche das WBV nicht mehr zu steigern vermögen. Der ATP-Abbau bewirkt eine enge Vernetzung der Myosin- mit den Actinfilamenten (Rigor mortis). Der gleichzeitige enzymatische Abbau des ebenfalls im schlachtfrischen Muskel enthaltenen Glykogens zu Lactat (anaerobe Glykolyse) bedingt durch die damit verbundene pH-Abnahme eine zusätzliche Verminderung des WBV.

ATP- und Glykogenabbau sowie ATP-Turnover im Rindermuskel post mortem und ihre Beeinflussung durch Zerkleinern, Salzen, Gefrieren und Gefrier-trocknen wurden eingehend studiert. Die enzymatische ATP-Hydrolyse bestimmt die Geschwindigkeit der Glykose, und zwar in erster Linie über die Phosphorylase- und Phosphofruktokinase-Stufe. Für die ATP-Hydrolyse ist die Aktivität der Myosin-Adenin-triphosphatase verantwortlich, die wiederum durch die Freisetzung von Ca⁺⁺-Ionen aus dem sarkoplasmatischen Reticulum stimuliert wird.

Durch Salzen des noch schlachtwarmen Fleisches läßt sich die Abnahme des WBV post mortem vermeiden, obwohl NaCl die ATP-Hydrolyse nicht hemmt, sondern beschleunigt. Der Effekt des Vorsalzens beruht darauf, daß durch die kombinierte Wirkung von ATP, hohem pH-Wert und hoher Ionenstärke (Salzzusatz) das System kolloidchemisch so stark verändert wird, daß ein Rigor mortis in den Fasern und Myofilamenten und damit auch eine Abnahme des WBV nicht mehr eintreten können.

Aufgrund der erhaltenen Resultate wurden für die Praxis Verfahren ausgearbeitet, bei welchen sich durch Kombination von Salzen und Einfrieren des schlachtfrischen Fleisches das hohe WBV des schlachtwarmen Materials über Monate zum Zwecke der Brühwurstherstellung aufrecht erhalten läßt. Solche Verfahren sind von wirtschaftlichem Interesse, da immer weniger Verarbeitungsbetriebe noch selber schlachten.

Weiterhin gelang es, aufgrund der biochemischen und kolloidchemischen Ergebnisse ein gefriergetrocknetes „Instant-Wurstfleisch“ zu entwickeln. Dieses Produkt ist bei geeigneter Verpackung ohne Kühlung fast unbegrenzt haltbar. Der Verarbeiter kann aus dem Trockenprodukt mit der konventionellen Verarbeitungstechnik Brühwurstzeugnisse herstellen, die eine ebenso hervorragende Qualität wie Produkte aus frischem, schlachtwarmem Fleisch aufweisen. Das Trockenmaterial eignet sich auch für die Herstellung von Rohwürsten, Hamburgern, Kloppen und anderen Fleischwaren.

LITERATUR

- 1) Hamm, R.: „Kolloidchemie des Fleisches“. Parey-Verlag, Berlin, Hamburg (1972).
- 2) Hamm, R.: Fleischwirtschaft 53, 73 (1973).
- 3) Hamm, R.: In „Meat“ (Hrsgb. J. D. A. Cole und R. A. Lawrie) S. 321. Butterworth Ltd. London (1975).
- 4) Hamm, R.: Fleischwirtschaft 53, 106 (1973).
- 5) Hamm, R.: Fleischwirtschaft 54, 455 (1974).

- 6) Hamm, R. und J. van Hoof: Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 147, 193 (1971).
- 7) van Hoof, J. und R. Hamm: Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 150, 282 (1973).
- 8) van Hoof, J. und R. Hamm: Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 153, 271 (1973).
- 9) Hamm, R. und J. van Hoof: Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 156, 87 (1974).
- 10) Greaser, C., R. G. Cassens, E. J. Briskey und W. G. Hoekstra: J. Food Sci. 34, 120 (1969).
- 11) Hamm, R., R. H. Dalrymple und K. O. Honikel: Proceed. 19th European Meat Research Worker's Meeting, Paris, 1, 73 (1974).
- 12) Potthast, K. und R. Hamm: J. Chromatog. 42, 558 (1969).
- 13) Potthast, K.: J. Chromatog. 88, 168 (1974).
- 14) Honikel, K. O. und R. Hamm: Fleischwirtschaft 54, 557 (1974).
- 15) Scopes, R. K.: Proceed 17th European Meat Research Worker's Meeting, Bristol (England). S. 14 (1971).
- 16) Bendall, J. R.: In „The Structure and Function of Muscle“, 2. Aufl. (Hrsgb. B. H. Bourne), Bd. II, S. 243. Academic Press. New York 1973.
- 17) Dalrymple, R. H. und R. Hamm: Fleischwirtschaft 54, 1084 (1974).
- 18) Dalrymple, R. H. und R. Hamm: J. Food Sci. 39, 1218 (1974).
- 19) Dalrymple, R. H. und R. Hamm: J. Food Sci. 40, 850 (1975).
- 20) Dalrymple, R. H. und R. Hamm: Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 158, 333 (1975).
- 21) Dalrymple, R. H. und R. Hamm: J. Food Technol. 8, 439 (1973).
- 22) Hamm, R.: Meat Sci. 1, 15 (1977).
- 23) Hamm, R. und R. Rede: Fleischwirtschaft 52, 331 (1972).
- 24) Hamm, R.: Texture Studies 3, 182 (1975).
- 25) van Hoof, J. und R. Hamm: Fleischwirtschaft 51, 964 (1971).
- 26) Hamm, R.: Dtsch. Lebensm.Rdsch. 60, 97 (1964).
- 27) Hamm, R., K. Potthast und L. Acker: Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 154, 73 (1974).
- 28) Potthast, K., R. Hamm und L. Acker: In „Water Relations in Food“ (Hrsgb. R. B. Duckworth), S. 365. Academic Press. London 1975.
- 29) Potthast, K.: Dissertation. Universität Münster, 1972.
- 30) Hamm, R. und K. Potthast: Fleischwirtschaft 55, 87 (1975).
- 31) DBP.-Anm. A 23 B, 4/06. OS. 2 519 000 — offengelegt am 4. 11. 1976 (K. Potthast u. R. Hamm).

Control Laboratory of Nestlé Products,
Technical Assistance Co. Ltd., La Tour-de-Peilz, Switzerland

A rapid, low cost, small-scale clean-up method for the determination of organochlorine pesticide residues in fats and oils

T. Stijve and E. Brand

Introduction

Several methods are in use for the determination of organochlorine pesticide residues in fatty foods¹⁻⁵). Most of these methods are rather costly, because they require the use of large quantities of high purity adsorbents and solvents.

Holden and Marsden⁶) were the first residue analysts who successfully miniaturized sample clean-up by bringing 50 mg of fat on a small chromatography column consisting of 2 g deactivated aluminium oxide and eluting the different pesticides with 10–20 ml of hexane.

In spite of the fact that this small-scale procedure yields reliable results for most chlorinated pesticides, it is unlikely to be generally applied in the near future, because of the growing realization among residue analysts⁸) that all methods using alumina in the clean-up step give low and erratic recoveries for beta-BHC^{3, 6, 7}).

In fact, the results of the recent Codex collaborative study on the determination of organochlorine pesticides in butter fat revealed that 42 percent of the 120 participating laboratories failed to report beta-BHC, even if it was present at a concentration of 0.4 ppm⁹).

Considering the importance of beta-BHC as a residue in animal fats and tissues, there is a need for a small-scale clean-up method that gives reliable results for this compound and, of course, for all pesticide residues commonly encountered in fatty foods.

Large-scale methods that have actually been collaboratively tested for their suitability of giving high (> 80 %) recoveries for beta-BHC are the AOAC-procedure²) and, more recently, the methods of Specht⁴) and Stijve⁵).

Unfortunately, the first two methods cannot be miniaturized, because the volumes of the liquids involved in the solvent partition steps cannot be reduced without major inconveniences.

The procedure proposed by Stijve and Cardinale, in which extraction and clean-up of the pesticides from fat are simultaneously performed on a Florisil column, can be easily modified to a small-scale technique. A detailed description of the miniaturized method is given in this paper.

Experimental

Reagents:

- Florisil, 60–100 mesh Fluka.
- Remove interfering impurities by heating at 550° C overnight. Alter cooling, standardize adsorbent by adding 3 percent by weight of distilled water. Mix well and allow to equilibrate before use during at least 6 hours. Prepare fresh every three days.
- Light petroleum, redistilled, boiling range 40–60° C, quality suitable for pesticide residue analysis.
- Methylene chloride, quality suitable for pesticide residue analysis.

Procedure:

Weigh 1.00 g of the fat or oil sample in a 20 ml volumetric flask. Make up to volume with light petroleum and shake well to mix.

Tamp a small plug of glass wool into 8 × 200 mm glass chromatography tube, fitted with an outlet stopcock and having a 30 ml reservoir at the upper end.

Bring 15 ml of light petroleum into this tube and add slowly 3.0 g of standardized Florisil. Ensure tight packing of the adsorbent by gently tapping sides of the column with a glass rod.

When the adsorbent has settled, open the stopcock and let the solvent run through to about 1 cm from the top of the column. With a volumetric pipet transfer 2.00 ml (= 100 mg of sample) of the fat solution to the Florisil column. Allow the solution to penetrate into the column and elute pesticides with 30 ml of light petroleum — methylene chloride 4:1 v/v. Complete elution should not take less than 15 minutes. Gather the eluate into a 100 ml round bottomed flask.

Evaporate in a rotavapor apparatus until about 2 ml are left. Remove remaining solvent by gently blowing with an air current. Add 2.00 ml of iso-octane to invisible