

A spektrofotometriás fehérjetartalom-meghatározás alkalmazása új feltérési eljárással különböző húsok és húsipari termékek esetében

G Á B O R M I K L Ó S N É

Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem, Élelmiszeripari Főiskolai Kar,
Szeged

Érkezett: 1986. május 15.

Az élelmiszerek fehérjetartalma meghatározható fehérjeoldatuk ultraibolya tartományban történő optikai sűrűség mérésével. A peptid kötések erős fényabszorpciót mutatnak a 230–180 nm tartományban, s a fehérjéket alkotó egyes aminosavak (tirozin, triptofán, fenilalanin) egy kisebb, de jellegzetes fényelnyelést mutatnak a 300–250 nm értékek között. Az optikai sűrűség a fehérjekoncentrációval arányos (1., 2., 3., 4., 6.).

A fehérje feltérására a szokásos (elsősorban kénsavas) roncsolás helyett egy gyorsabb – a fehérje teljes oldásán alapuló – eljárást választottunk. Ehhez speciális reagensekre vagy reagens elegyekre van szükség, amelyek összetétele – továbbá az oldási eljárás körülményei – nagymértékben függenek a vizsgálandó anyag kémiai összetételétől és szerkezetétől.

Toma és *Nakai* lúgos karbamid oldatot használtak több élelmiszer esetében a fehérje oldására (5). Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy ez az oldat nem minden esetben volt használható. Gondot jelentett továbbá, hogy a nagy töménységű oldatból állás közben gyakran következett be kikristályosodás, amely a spektrofotometriás mérések pontosságát bizonytalanná tette.

Az általunk javasolt kombinált oldási eljárással megbízható módszert dolgoztunk ki a fehérjetartalom spektrofotometriás mérésére. A spektrofotometriás módszer általános húsipari alkalmazhatóságát is megállapítottuk korábban végzett mérésekkel (4) különböző húsok és húsalapú termékek vonatkozásában, amelyek más fehérjetartalmú adalékot nem tartalmaznak.

1. Húsok és húsipari termékek spektrofotometriás fehérjetartalom meghatározása

1.1. Anyagok és módszerek

1.1.1. Vegyszerek és eszközök

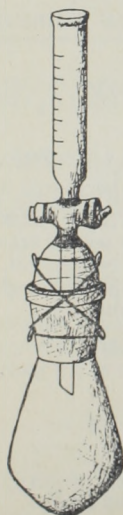
hangyasav, 98% alt.,
sósav oldat: HCl/H₂O (1 : 2),
absz. etilalkohol alt.,
n-propilalkohol alt.,
diklórmétán alt.,
589² Schleicher Schuell kvantitatív szűrőpapír,
1 cm kvarcküvetta,
UV spektrofotométer,
speciális lombik oldáshoz, adagoló feltétellel.

1.1.2. A meghatározás menete

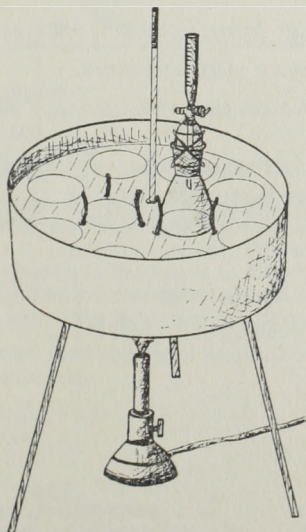
0,5000 g jól aprított homogenizált anyagot vékony üveglemezen (mikroszkóp fedőlemez) bemérünk és 100 cm³-es csiszolt dugós lombikba juttatjuk, amely adagoló feltéttel van ellátva. A lombikba 5,00 cm³ hangyasavat mérünk és forró vízfürdőbe helyezük 5 percre. (Felmelegedéskor az adagolócsap pillanatnyi kinyitásával megszüntetjük a túlnyomást.) Ezután az adagolón keresztül 5,00 cm³-sósavoldatot juttatunk a rendszerbe, s további 15 percig tartjuk a vízfürdőben. (Az oldódás elősegítésére többször átforgatjuk az anyagot. A fehérjeoldódás akkor gátjeljes, ha a minta részecskéi teljesen eltűntek a reakcióelegyben, s egy homogén szuszpenzió alakult ki.) A lombikot vízzel töltött pohárba állítjuk a reakcióelegy lehűtésére. Lehűtés után az adagolócsap kinyitásával nyomáskiegyenlítést eszközölünk, majd a feltétet meglazítva 5,00 cm³ etilalkoholt, 5,00 cm³ diklórmétánt és 5,00 cm³ n-propilalkoholt mérünk a reakcióelegyhez. A feltét visszahelyezése után alkalapos összerázással homogén elegyet állítunk elő. Ebből a törzsolatból 2,00 cm³-t csiszolt dugós kémcsőbe mérünk és 8,00 cm³ etilalkohollal felhígítjuk (spektrofotometriás oldat). Homogenizálás után a spektrofotometriás oldatot szűrőpapíron száraz kémcsőbe szűrjük, s 278 nm-en 1 cm-es kvarcküvetében mérjük az optikai besűrűséget (abszorbancia értéket).

A spektrofotometriás kompenzáló oldatot a fentiekkel megegyezően készítjük a vizsgálandó minta nélkül.

Az oldáshoz speciális lombikot készítettünk enyhén kúpos fenékkel a viszonylag kis mennyiségű oldószer rétegvastagságának megnövelésére. A lombikhoz csiszolatos, csappal ellátott feltét csatlakozik a sósav adagolására elsősorban (1. ábra). A lombikot megfelelő lyukátmérőjű, tartópálcákkal ellátott lemeze állítva helyezzük a vízfürdőbe (2. ábra).



1. ábra: Speciális reakcióedény



2. ábra. Vízfürdő

2. Kalibráció

Négy különböző fehérjetartalmú mintát készítettünk az alábbi összetételben. 1. a vizsgált minta; 2. 50 g minta + 50 g tengeri homok; 3. 75 g minta + 25 g tengeri homok; 4. 95 g minta + 5 g fehérje. A fehérjeadalek lehet pl. plazmapor, tojásfehérjepor. A mintaösszetételek az eredeti anyag fehérje mennyiségétől is függenek. Ha ez kicsi, más arányokkal kell dolgozni.

A minták homogenitását maximálisan biztosítani kell arra alkalmas elektromos keverő (pl. Biomix homogenizátor) segítségével, amelyet az előapított hús, illetve a különböző összetételű minták végleges homogenizálására használunk.

A minták fehérjetartalmának megfelelő optikai sűrűséget mérjük az 1.1.2 fejezetben leírt receptúra szerint (E_x). Meghatározzuk a minták fehérjetartalmát Kjeldahl szerint is.

A receptúra szerint (1.1.2) készített szuszpenzió (törzsoldat) 1 cm³-ének fehérjetartalma az alábbiak szerint számítható:

$$p_x + \frac{G}{25} \cdot \frac{p\%}{100} \cdot 1000, \quad (1)$$

ahol

p_x = a fehérjetartalom 1 cm³ szuszpenzióban Kjeldahl szerint számolva (mg),

G = anyagbemérés a szuszpenziókészítéshez = 0,5000 (g),

$p\%$ = a minta százalékos fehérjetartalma Kjeldahl szerint.

Tekintettel arra, hogy $G = 0,5000$, az egyenlet egyszerűsíthető:

$$p_x = 0,2 \cdot p\%. \quad (2)$$

A törzsoldat 2 cm³-ben a Kjeldahl szerint mért fehérjetartalom mennyisége $2p_x$ mg, de a spektrofotometriás oldatban a további hígítás során az oldat optikai sűrűsége ötödére csökken, s így a számításoknál $\frac{2p_x}{5}$ érték használata felel meg helyesen a mért értékeknek.

A kalibrációs egyenest a négy minta $\frac{2p_x}{5}$ és a megfelelő átlag E_x értékek segítségével szerkesztjük meg, a $\frac{2p_x}{5}$ értékeket tekintve független változóknak.

A kalibrációs egyenest a vizsgálatok során úgy használjuk, hogy a mért érték alapján leolvassuk az ennek megfelelő fehérje mennyiséget (p_x) – amely a spektrofotometriás oldatra vonatkozik – s a 3. fejezetben leírtak szerint számolunk ezzel tovább. Itt az abszcisszáról leolvasott értéket X-be kell helyettesíteni.

A regressziós egyenletet a fenti spektrofotometriás és Kjeldahl meghatározásokból kapott adatpárókból számoljuk, lineáris program szerint:

$$Y' = a + b \cdot X, \quad \text{ebből} \quad (3)$$

$$X = \frac{Y' - b}{a}, \quad (4)$$

ahol

X = a spektrofotometriás oldat fehérjetartalma (mg),

Y' = az oldat mért optikai sűrűsége,

a, b = állandók, amelyek konkrét értékeit a számítás során megkapjuk.

A regressziós egyenletet úgy használjuk, hogy a vizsgált oldat Y' optikai sűrűség értékét behelyettesítjük a regressziós egyenesbe és megoldjuk X -re.

Sertéshús esetében a 2. pontban leírt mintaösszetételek az 1.1.2 pont és Kjeldahl szerinti vizsgálatait adatait az 1. táblázat mutatja.

1. táblázat

Kalibrációs mérések adatai sertéshús esetében

Minta-összetétel	Optikai sűrűség	Optikai sűrűség átlag	Fehérjetart. mg. (Kjeldahl)	Fehérjetart. mg. átlag (Kjeldahl)
1.	0,820 0,821 0,815 0,813 0,833	0,825	1,654 1,656 1,644 1,640 1,680	1,664
2.	0,463 0,455 0,442 0,439 0,424	0,443	0,935 0,915 0,889 0,887 0,857	0,895
3.	0,630 0,621 0,621 0,625 0,640	0,628	1,224 1,206 1,206 1,214 1,243	1,220
4.	1,400 1,400 1,451 1,453 1,420	1,421	2,812 2,812 2,915 2,893 2,893	2,855

Az adatokból kapott regressziós egyenes egyenlete:

$$Y' = 0,495X + 0,008.$$

(A kalibráció elvégzése hosszabb időt igényel, de azonos spektrofotometriás körülmények között ezt elegendő egyszer elvégezni. Korábbi méréseink szerint (4) egy kalibrációs mérés-sorozat több nyersanyagra és késztermékre is jól használható.)

3. A vizsgált minta fehérjetartalmának számítása

A vizsgálandó anyag százalékos fehérjetartalma a kalibrációs egyenes vagy a regressziós egyenlet segítségével számítható a vizsgálati eljárásnál használt bemért anyagmennyiség (G) és a hígítások figyelembevételével.

$$\text{Fehérjetartalom, \%} = \frac{X \cdot 62,5 \cdot 100}{G \cdot 1000}, \quad (5)$$

mivel $G = 0,5000$, tovább egyszerűsíthető az egyenlet:

$$\text{Fehérjetartalom, \%} = X \cdot 12,5. \quad (6)$$

4. A spektrofotometriás módszer pontossága

A sertéshús mintából 15 párhuzamos mérést végeztünk a spektrofotometriás és a Kjeldahl módszerekkel egyaránt. A kapott adatokat a 2. táblázat mutatja.

2. táblázat

Sertéshús fehérjetartalma spektrofotometriás méréssel és Kjeldahl szerinti meghatározással

Minta	Optikai sűrűség	A spektrofotometriás oldat fehérjetartalma, mg (a regressziós egyenlettel számolva)	A spektrofotometriás oldatban levő fehérje, mg (a Kjeldahl mérésből számolva)
1.	0,823	1,650	1,710
2.	0,817	1,648	1,689
3.	0,820	1,654	1,657
4.	0,800	1,614	1,671
5.	0,818	1,649	1,666
6.	0,810	1,636	1,662
7.	0,808	1,630	1,674
8.	0,821	1,655	1,667
9.	0,818	1,649	1,690
10.	0,810	1,636	1,657
11.	0,815	1,644	1,645
12.	0,813	1,640	1,654
13.	0,833	1,680	1,719
14.	0,833	1,680	1,709
15.	0,800	1,614	1,667

Az adatokból végzett matematikai számítások eredményeit az alábbiakban adjuk meg.

Korrelációs koefficiens

$$r = 0,993,$$

ami azt jelenti, hogy a két módszer között szoros kapcsolat van.

t-próba

$$t_{\text{szám}} (= 1,71) < t_{\text{tábl.}} (= 5,84),$$

ami azt jelenti, hogy nincs szignifikáns különbség a számított és mért átlagértékek között, tehát a spektrofotometriás és Kjeldahl módszerek között.

F-próba

$$F_{\text{szám}} (= 1,33) < F_{\text{tábl.}} (= 2,48),$$

ami azt jelenti, hogy nincs szignifikáns differencia a számított és mért értékek matematikai szórásai között, vagyis a két módszerrel kapott adatok szórásai között.

5. Következtetések

A fenti matematikai számítások a korábbi hasonló célú mérésekkel egybehangzóan igazolják a spektrofotometriás fehérjetartalom meghatározási módszer alkalmazhatóságát húсок és egyes húsipari termékek (vörösáruk, felvágottak, szárazáruk stb.) esetében.

A spektrofotométer kezelése igen egyszerű, nagyobb szakértelmet nem igényel. A módszer gyorsasága révén alkalmas nyersanyag, félkésztermék és késztermékvizsgálatra egyaránt. Kellő számú vizsgálati anyag érhető el, amely felhasználható pl. új termékek vagy új gyártási eljárás anyag-gazdaságossági számításainak elvégzéséhez.

I R O D A L O M

- (1) *Kiermeyer, F.*: Handbuch d. Lebensmittelchemie III/2, 989–997, Springer Verlag, Berlin–Heidelberg–New York (1968)
- (2) *Wrigley, C. W.*–*Webster, H. L.*: Spectrophotometric estimation of protein in presence of ultraviolet absorbing impurities; *J. Chromatogr.*, 33., 534 (1968)
- (3) *Gábor, E.*: Determination of the protein content of certain meat products by ultraviolet absorption spectrophotometry; *Acta Alimentaria* 8., 157–167, (1979)
- (4) *Gábor, E.*: Bestimmung des Eiweißgehaltes von Fleisch und Fleischwaren in ultravioletten Bereich; *Fleisch*, 37., 194–198, (1983)
- (5) *Toma, S. I.*–*Nakai, S.*: Ultraviolet spectrophotometric determination of protein in some food products; *J. of Food Sci.*, 36., 507 (1971)
- (6) *Gábor, E.*: Simultaneous determination of fat and protein content of some cheese by spectrophotometry; *Fat Science* (137–142), Proc. 16 th ISF Congress, Budapest (1983).

A SPEKTROFOTOMETRIÁS FEHÉRJETARTALOM-MEGHATÁROZÁS ALKALMAZÁSA ÚJ FELTÁRÁSI ELJÁRÁSSAL KÜLÖNBÖZŐ HÚSOK ÉS HÚSIPARI TERMÉKEK ESETÉBEN

Gábor E.

Húsok és egyes húsipari termékek fehérjetartalmának spektrofotometriás meghatározásához új feltáró eljárást dolgoztunk ki. A folyamat végrehajtásához speciális reakcióedényt terveztünk. A különböző oldószerek kombinált alkalmazásával spektrofotometriálásra alkalmas fehérjeoldatot állítottunk elő. Az eljárással mintegy 30 perc alatt elvégezhető egy mérés. A módszer pontosságára elvégzett matematikai számítások alapján – a Kjeldahl módszert használva összehasonlító eljárásnak – megállapítható, hogy a két módszer között igen szoros a korreláció, nincs szignifikáns különbség az átlagértékek és a szórásértékek között. A módszer gyártásközi ellenőrzésre kiválóan alkalmas.

APPLICATION OF THE SPECTROPHOTOMETRIC PROTEIN DETERMINATION WITH A NEW EXPLORING METHOD FOR MEAT AND MEAT PRODUCTS

Gábor E.

Authors worked out a new exploring method for the spectrophotometric protein determination in meat and meat products. Special reaction container for the carrying out of processes was projected. With combined use of several dissolvers produced protein solution for the spectrophotometric measurement. One measuring can be carried out in 30 minutes. On the basis of mathematic calculations to control of the accuracy of method in comparison with the Kjeldahl method can be stated that between the two methods there are a strong correlation and no significant differences between the averages and variances. The method is excellent usable for the in-process control.

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА В МЯСЕ И МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ С ПОМОЩЬЮ НОВОГО МЕТОДА МИНЕРАЛИЗАЦИИ

Е. Габор

В статье сообщается о разработанном новом методе минерализации проб для определения содержания белка в мясе и некоторых мясных продуктах. Для проведения процесса минерализации был сконструирован специальный реакционный аппарат.

Комбинированным применением различных растворителей был получен пригодный для спектрофотометрирования раствор белков.

Время одного измерения — 30 минут.

На основании математических вычислений, сделанных для определения точности метода, применяя метод Кейдала в качестве метода сравнения, можно установить, что между двумя методами имеется тесная корреляция, нет значительных отклонений между средними величинами и величинами расброса.

Метод отлично применим для контроля на различных производственных фазах.

ANWENDUNG DER SPEKTROPHOTOMETRISCHEN EIWEISSBESTIMMUNG MIT EINEM NEUEN AUFSCHLUSSVERFAHREN FÜR VERSCHIEDENE FLEISCHSORTEN UND FLEISCHPRODUKTE

Gábor E.

Zur spektrophotometrischen Bestimmung des Eiweißgehaltes von Fleischsorten und einzelnen Fleischprodukten wurde ein neues Aufschlußverfahren ausgearbeitet. Für die Durchführung des Verfahrens wurde ein spezielles Reaktionsgefäß projektiert. Mit der kombinierten Anwendung verschiedener Lösungsmittel konnten wir eine für die spektrophotometrische Bestimmung geeignete Eiweißlösung herstellen. Mit dem Verfahren kann eine Messung in etwa 31 Minuten durchgeführt werden. Auf der Grundlage der zur Überprüfung der Genauigkeit der Methode durchgeführten mathematischen Berechnungen kann im Vergleich zur Kjeldahl-Methode festgestellt werden, daß zwischen beiden Methoden eine enge Korrelation existiert und zwischen den Mittel- bzw. Streuwerten kein signifikanter Unterschied besteht. Die Methode ist für die Produktionskontrolle sehr geeignet.