

Hús és húskészítmények kötőszövet tartalmának meghatározása hidroxiprolintartalmuk alapján*

SZEREDY IDA

Országos Húsipari Kutatóintézet, Budapest

Érkezett: 1969. október 15.

Bevezetés

A húskészítmények színhúson kívül különböző mennyiségű zsírszövetet, kötőszövetet – inaszövetet, sertés bőrkét – és egyéb adalékanyagot is tartalmazhatnak. Ezek felhasználható mennyiségét szabványok írják elő. A húskészítmények minőségének ellenőrzése során eddig a víz-, zsír- és fehérjetartalom meghatározására terjedtek ki, szükség esetén meghatározták a só-, nitrit-, nitrát-, hamutartalmat, de az egyéb adalékanyagokra, vagy a fehérje minőségére nem fektettek súlyt.

Az összes fehérjetartalom ismerete természetesen nem ad felvilágosítást a színhús és a kötőszövet tartalom arányára, ami a biológiai érték szempontjából pedig fontos. A modern húsipari gépek, kutterek, kolloidmalmok használata és a polifoszfátok, emulgátorok felhasználása a húsipari technológiában lehetővé teszi nagyobb mennyiségű, nem teljes értékű nyersanyag, így több támasztószövet felhasználását. Bár az így előállított húskészítmények jó érzékszervi tulajdonságokkal bírnak szín, állomány, valamint íz tekintetében és a vevő számára is kívánatosak lehetnek, mégis kisebb biológiai értékű alapanyag bedolgozása miatt kevesebbet érnek, amit az árkalkulációnál figyelembe kell venni.

A kötőszövet biológiai értéke mint ismeretes, azért kisebb a színhúsénál, mert eszenciális aminosavakban szegényebb, így például triptofánt 0,1–0,3%-ot tartalmaz csak, ezzel szemben a színhús 1,2–1,5%-ot, a vér 1,8%-ot. A kötőszövet, mely főleg kollagén és elasztin fehérjéből áll, nagymennyiségű nem eszenciális aminosavat, hidroxiprolint tartalmaz, amit a tiszta izomszövetek egyáltalán nem tartalmaznak. Ez a kémiai eltérés képezi a fehérjék differenciálásának alapját, és ad lehetőséget arra, hogy a kötőszövet tartalomról következtethetünk a kiindulási nyersanyag minőségére.

A kollagén kvantitatív kémiai meghatározása négy jellegzetes tulajdonságán alapszik (1). Ez a négy tulajdonság a következő:

a) Kollagént nem oldó, egyéb proteint oldó oldószerrel a kötőszövet az izomszövetből külön választható. Híg lúggal az izomproteinek oldódnak, a kötőszöveti fehérjék nem. Ez a módszer azonban csak nyershús és hőkezeletlen húskészítményekre alkalmazható.

b) A kollagén és izomfehérje hőhatással szemben különbözőképpen viselkedik. A kollagén hő hatására vízoldható zselatinná alakul, melynek mennyisége megfelel az eredetileg a szövetben levő kollagéntartalomnak. A kollagén kioldási

*A szerző vizsgálataitól függetlenül, vele egyidőben a Fővárosi Vegyészeti Intézetben Ojtozy Kristófné is foglalkozott húskészítmények kötőszöveti fehérjetartalmának vizsgálatával. Dolgozatát a 43. oldalon közöljük. (Szerk.)

körülményei között oldatba ment kis mennyiségű izomfehérjét 3%-os triklórecet-savval távolítják el, azonban ez a kicsapás nem tökéletes.

c) A kollagén hidroxiprolin tartalmának meghatározása. A kollagén glicinből, prolinból és hidroxiprolinból áll, melyből hidrolízissel felszabadítható a hidroxiprolin, ez oxidálva pirrol származékká alakul és paradimetilaminóbenzaldehiddel piros színű vegyületet ad. A színes oldat abszorpciós maximuma 555 ± 2 milimikronnál van. Hibát okoz a hidroxiprolin kollagénnre való átszámítási faktorának változása az állat faja, a szövettípus és a kor szerint. Úgyszintén hibát okoz a kevesebb hidroxiprolint tartalmazó elasztin.

d) A kollagén proteolitikus enzimekkel szemben rezisztens. A tripszin és a pepszin csak az izomfehérjét támadja meg, ezáltal elkülöníthető a nem emészthető kötőszövetektől és alkalmas annak mennyiségi meghatározására. Ez az eljárás is azonban csak nyershúsra és hőkezeletlen húskészítményekre alkalmazható.

Módszerek

Nyershúsok és nyers szárazárúk (nem hőkezelt húskészítmények) kötőszövet-tartalmának meghatározására a fent a) pont alatt említett híg lúggal történő elkülönítéssel végzett vizsgálatainkat már 1957-ben ismertettük (2). Hőkezelt húskészítmények kötőszövet-tartalmát mint a c) pontban említettük legáltalánosabban hidroxiprolintartalmuk alapján határozzák meg. Minthogy nálunk is fellépett az igény a húsnak és húskészítményeknek kötőszövet-tartalmuk alapján történő minősítésére, elsősorban a hidroxiprolintartalom meghatározására kerestünk egyszerű, rutinszerűen alkalmazható vizsgálati módszert. Legegyszerűbbnek találtuk a hidrolízist *Möhler - Volley* (3, 4) szerint. A vizsgálandó anyagot kénsavval önklorid jelenlétében szárítószekrényben hidrolizáljuk.

A felszabadult hidroxiprolint *Stegemann* (5) módszerének *Hurych és Chvapil* (1) módosítása szerinti meghatározást választottuk. Oxidálószerként klóramin T-t használtunk. Az oxidálószer feleslegét perklórsavval vettük el és a paradimetilaminóbenzaldehiddel adott piros színű vegyület színerősségét mértük fotométeren. Az elmondottak alapján a következő meghatározási módszert dolgoztuk ki:

Szükséges vegyszerek

1. 6 n kénsav (30%-os)
2. Kristályos önklorid
3. 25%-os nátronlúg
4. Univerzálindikátor papír
5. Pufferoldat, melyet a következőképpen készítünk: 50 g egy kristályvizes citromsavat, 12 ml jégecetet, 34 g pa. nátronlúgot, 120 g három kristályvizes nátriumacetátot oldunk deszt. vízzel egy literre, pár csepp toluóllal konzerválva pH 6-ra állítjuk be
6. Normál propanol
7. Klóramin-T oldat, melyet a következőképpen készítünk: 0,84 g klóramin-T $3 \text{ H}_2\text{O}$ -t (paratoluol szulfon-kloramid-nátrium $3 \text{ H}_2\text{O}$) oldunk 20 ml deszt. vízben, hozzáadunk 30 ml normál propanolt és 50 ml pufferoldatot. Naponta frissen készítjük
8. Perklórsav 3 molos (30%-os)
9. 5%-os normál propanolos paradimetilaminóbenzaldehid (sötét üvegben hideg helyen 1 hétig tartható el)

Szükséges felszerelések

50 ml-es (2,8 \varnothing \times 18 cm) üveg dugós kémcső, a jel felett még 15–20 ml-es légtér legyen

10 ml-es üvegdugós kémcső
100 és 200 ml-es mérőlombikok
szűrőpapír
kémcsőkosár
szárítószekrény ($110^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ -ra beállítható)
Termosztát (60°C -ra beállítható)
Pulfrich fotométer, vagy MOM spektrofotométer

Eljárás

1. *A minta előkészítése:* 200-250 g vizsgálandó anyagot 4 mm-es tárcsás húsdarálón kétszer ledaráljuk, a késre csavarodott kötőszövetet ollóval finoman felaprítjuk és a többihez keverjük. Hűtőszekrényben porüvegben tároljuk.

2. *Hidrolízis:* A homogenizált mintából 5,00 g-ot táramérlegesen celofánpapírra mérve 50 ml-es üvegdugós kémcsőbe tesszük, 50 ml 30%-os kénsavat és 0,95 g ónkloridot adunk hozzá az üvegdugóval zárva kémcsőkosárba állítva (akár 50 db mintát is egyszerre) szárítószekrényben hidrolizáljuk 110°C -on 16 órán át (egy éjszakán). A kémcsőveket a szárítóból kivéve az üvegdugókat rögtön kivesszük és a hidrolizátumot szobahőn lehűlés után 200 ml-es mérőlombikba szűrjük és kvantitativ bemossuk, jelig töltjük, összerázzuk. A szüredékből 10 ml-t 100 ml-es mérőlombikba pipettázunk, 25%-os nátronlúggal univerzál indikátorpapírral ellenőrizve pH 6-ig semlegesítjük, majd jelig töltjük. Az oldatot éjszakán át állás után szűrjük vagy rögtön centrifugáljuk és a nyert kristálytisza oldatot használjuk a hidroxiprolintartalom meghatározására. A vizsgálandó oldat 1 ml-e 1–5 mikrogramm hidroxiprolint tartalmazzon. Ha ennél töményebb vagy hígabb a törzsoldat, akkor a 200 ml-es hidrolizátumból 20, illetőleg 5 ml-t semlegesítünk.

3. *Hidroxiprolintartalom meghatározás:* Az ismertetett módon nyert tiszta oldatból 1 ml-t 10 ml-es üvegdugós kémcsőbe pipettázunk, a vakpróbánál a vizsgálandó oldat helyett 1 ml desztillált vizet veszünk 1 ml klóramin-T oldatot adunk hozzá. Többször összerázva 20'-ig állni hagyjuk, 1 ml perklorosavoldatot adunk hozzá, összerázzuk, majd 5' múlva 1 ml normál propanolos paradimetilaminobenzaldehidet adunk hozzá, jól összerázzuk, és 18'-ig 60°C -os termosztátban tartjuk. Folyóvízben hűtjük, s a kifejlődött piros színt $45'$ -en belül mérjük 555 milimikronnál a vakpróbával szemben.

A kiértékelés tiszta hidroxiprolinnal felvett kalibrációs görbe alapján történik.

Kalibrációs görbe készítése

10 mg pa. hidroxiprolint oldunk egy literre desztillált vízzel, s ebből 10, 20, .. 50 ml-t hígítunk 100 ml-re, akkor az oldatok milliliterenként 1, 2, .. 5 mikrogramm hidroxiprolint tartalmaznak.

A vizsgálandó oldat helyett 1 ml 1, 2, .. 5 mikrogramm hidroxiprolint tartalmazó oldatot véve a fent leírt módon járunk el, s mérjük az extinkciót. A hidroxiprolintartalmat az extinkció függvényében ábrázolva 1 és 5 mikrogramm hidroxiprolintartalom között orion áthaladó egyenest kapunk. Nagyobb töménységnél már nem lineáris az összefüggés. Ilyen esetben kisebb mennyiségű hidrolizátumot kell hígítani 100 ml-re. A vizsgálandó oldat hidroxiprolintartalmát a mért extinkció alapján a kalibrációs görbéről olvassuk le.

A hidroxiprolintartalom százalékos kiszámítása

$$H = 2 \times \frac{h}{M \times a}$$

h = a mért extinkciónak megfelelő hidroxiprolin μg
M = a bemért vizsgálandó anyag g-ban (5,00 g)
a = ml hidrolizátum, amit 100-ra hígítottunk (10 ml)

Eredmény és értékelés

A fent ismertetett módszerrel meghatároztuk néhány nyershúsminta, valamint két húsipari vállalat több hűskészítményének kötőszövet, illetőleg hidroxiprolintartalmát. A nyershús hidroxiprolintartalmából számított kötőszövet-tartalmat összehasonlítottuk a lúgos módszerrel nyert eredményekkel, melyeket az 1. táblázatban foglaltunk össze.

1. táblázat

Nyershús és ín kötőszövet-tartalma az összes fehérjetartalomra vonatkoztatva

	Vizsgálati anyag	Lúgos módszerrel		Hidroxiprolin
		Kollagén össz. feh.	Elasztin össz. feh.	tartalomból Hidroxiprolin \times 8 össz. fehérje
1.	Sertés rövidkaraj (kötőszöv.- tól tisztítva)	3,7 %	0,11 % = 3,81 %	3,1 %
2.	Marhalábszárhús	29,88 %	1,87 % = 31,75 %	28,72 %
3.	Marhalábszárhús	34,10 %	2,20 % = 36,3 %	33,60 %
4.	Marha lábín	93,10 %	1,5 % = 94,6 %	81,28 %
5.	Marha sorta	29,12 %	43,43 % = 72,55 %	38,64 %
6.	Marha nyakin	19,66 %	75,25 % = 94,91 %	25,36 %

2. táblázat

Néhány húsipari készítmény kötőszövet-tartalma az össz. fehérjére vonatkoztatva

Húsip. Váll.	Hűskészitm. neve	Össz fehérje %	Hidroxiprolin %	Koll. feh. % (H \times 8)	Kötőszöv. % = (Koll \times 100) össz. feh.
Y	Párizsi	12,25	0,152	1,21	9,92
Y	Párizsi	12,30	0,120	0,96	7,80
Y	Párizsi	10,70	0,156	1,25	11,50
X	Párizsi	11,38	0,16	1,28	11,24
X	Virslí	12,54	0,208	1,664	13,26
X	Virslí, celofános	14,43	0,206	1,648	11,40
Y	Krinolin	13,12	0,20	1,60	12,10
Y	Krinolin	13,70	0,204	1,632	11,91
X	Krinolin	11,70	0,196	1,568	13,40
Y	Olasz	13,86	0,132	1,056	7,61
Y	Olasz	14,52	0,128	1,024	7,06
X	Olasz	16,48	0,208	1,664	10,08
Y	Veronai	15,53	0,196	1,536	9,89
X	Veronai	12,72	0,273	2,188	17,20
Y	Veronai	15,22	0,200	1,60	10,50
X	Nyári szal.	13,29	0,352	2,81	21,17
X	Kedvenc	13,29	0,232	1,856	13,96
X	Füstkolbász	16,18	0,493	3,94	23,75
X	Csemegekolb.	15,16	0,348	2,784	18,30
Y	Csemegekolb.	16,80	0,224	1,792	10,66
Y	Csemegekolb.	17,06	0,204	1,932	11,30
Y	Csabai kolb.	13,56	0,164	1,312	9,67
Y	Csabai kolb.	14,00	0,180	1,44	10,20

A vizsgálati adatokból látható, hogy a hús kötőszöveve csaknem teljesen kollagénből áll, így a lúgos módszerrel kapott és a hidroxiprolintartalomból számított kötőszövevetartalom közelítőleg egyforma mindaddig, amíg az elasztin mennyisége elhanyagolható. Ha a húskészítmény nagy elasztintartalmú anyaggal (pl. nyakinpép, marhaorrpép...) készül, a hidroxiprolintartalom alapján kevesebb kötőszövevetartalmat kapunk, mint a lúgos módszerrel. Az elasztin ugyanis 1,5–2,0% hidroxiprolint tartalmaz, s így az átlagos 8-as kollagénfaktort használva, a valódi kötőszövevetartalomnál kisebb értéket kapunk. Arra nézve is végeztünk vizsgálatokat, hogy ha a húshoz ismert mennyiségű hidroxiprolint adunk, megkapjuk-e a fent ismertetett módszerrel a hidroxiprolin többletet? Négy párhuzamos vizsgálat eredménye igazolta, hogy a számított és kapott hidroxiprolintartalom jól megegyezik. Tehát a módszer jó.

A 2. táblázatban X és Y húsipari vállalat készítményeinek kötőszövevetartalmát ismertetjük hidroxiprolintartalmuk alapján.

Az X jelű húsipari vállalat készítményeiből 6, az Y jelűekből 2 párhuzamos vizsgálatot végeztünk, melyek között a homogenizálás és a vizsgálat egyéb fázisaiban előforduló ingadozások következtében fellépő hiba ± 1 és $\pm 6\%$ között változott. Ez a megállapítás is azt igazolja, hogy a módszer jó és rutinvizsgálatra alkalmas.

A vizsgálati adatokból egyébként látható, hogy az Y jelű húsipari vállalat készítményei lényegesen és minden esetben kevesebb kötőszövevet tartalmaznak, mint az X jelű húsipari vállalat hasonló készítményei.

A húsipari termékek kötőszövevetartalmának ellenőrzésére alkalmas ez a módszer, de az egyes húskészítmények megengedhető kötőszövevetartalmának megállapítására szükséges pontosan a szabvány előírásai szerint készült húsipari készítmények hidroxiprolintartalmát meghatározni és a tőrési határt megállapítani (6, 7).

I R O D A L O M

- (1) Reich, G.: Kollagen. Theodor Steinkopf Verlag, Dresden 1966.
- (2) Szeredy I.: ÉVKE 3, 234, 1957.
- (3) Möhler, K.: Z. U. L.: 106, 425, 1957.
- (4) Möhler, K., Volley, W.: Beurteilung von Fleischerzeugnissen durch chemische Bestimmung einzelner Aminosäuren. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, München, 1966.
- (5) Stegemann, H.: Z. Physiol. Chem. 311, 41, 1958.
- (6) Barraud, C., Volff, R.: Annales des Falsifications, 274, 1966.
- (7) Günther, H.: Die Fleischwirtschaft, 49, 505, 1969.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ МЯСА И МЯСНЫХ ИЗДЕЛИЙ НА ОСНОВЕ СОДЕРЖАНИЯ ГИДРОКСИПРОПИЛЕНА

И. Середи

Для определения содержания соединительных тканей мяса и мясных изделий служит метод разработанный для испытания содержания гидроксипропилена. Метод основывается на сернокислом гидролизе коллагенового белка и на измерении красного химического соединения образованного парадиметиламиноме залдегидом освобожденного гидроксипропилена. Если в методе пропустим содержание эластина то метод подходящий для серийного рутинного испытания продукта, сравнительно быстро — в течении полтора суток — возможно выполнить 50 испытаний, а результаты репродуцируемы в пределах 10% ошибок. Содержание соединительной ткани этим методом испытуемых однотипных мясных изделий на одном заводе являлось почти одинаковым.

BESTIMMUNG DES BINDEGEWEBEGEHALTES VON FLEISCH UND FLEISCHPRODUKTEN AUFGRUND IHRES HYDROXYPROLINGEHALTES

I. Szeredy

Die für die Prüfung des Hydroxyprolinegehaltes ausgearbeitete Methode dient zur Bestimmung des Bindegewebegehaltes von Fleisch und Fleischwaren. Das Verfahren beruht auf schwefelsaurer Hydrolyse des Kollageneiweissstoffes und Messung der Farbe der roten Verbindung, welche aus dem auf diese Weise freigesetzten Hydroxyprolin mit Paradimethylaminobenzaldehyd gebildet wird. Wenn wir den Elastingehalt vernachlässigen, eignet sich das Verfahren für routinemässige Serienuntersuchungen sehr gut, in verhältnismässig kurzer Zeit – anderthalb Tagen – können sogar etwa 50 Untersuchungen durchgeführt und die Ergebnisse mit weniger als 10% Fehler reproduziert werden. Der Bindegewebegehalt der geprüften Fleischprodukte wurde innerhalb desselben Betriebes sowie in ein und demselben Produkt für annähernd gleich befunden.

ASSAY INTO THE CONNECTIVE TISSUE CONTENT OF MEAT BASED ON ITS HYDROXY PROLINE CONTENT

I. Szeredy

The method developed for the assay of the hydroxy proline content is used for the determination of the connective tissue content of meat and meat products. The method is based on the measurement of the red compound formed with p-dimethylaminobenzaldehyde by the hydroxy proline set free from the collagen protein by acid hydrolysis. If the elastine content is neglected, the method is very suitable for routine analysis, a relatively short time – one and a half day – being sufficient for carrying out as much as 50 analyses and the error in reproducing the results is within 10%. Within the same plant and the same product the connective tissue content of the meat products tested was found to be nearly uniform.

DOSAGE DE LA TENEUR EN TISSU CONJONCTIF DES VIANDES ET DES PRODUITS RŒCAS SUR LA BASE DE LEUR TENEUR EN HYDROXYPROLINE

I. Szeredy

Le procédé développé pour le dosage de la teneur en hydroxyproline sert à doser la teneur en tissu conjonctif des viandes et des produits carnés. La méthode se fonde sur l'hydrolyse à l'acide sulfurique de la protéine de collagène suivie du mesurage de la couleur rouge du composé formé par l'hydroxyproline libérée et l'aldéhyde p-diméthylaminobenzoïque. En négligeant la teneur en élastine on obtient un procédé qui se prête aux analyses de routine. Une période relativement brève d'un jour et demi suffit à effectuer même 50 analyses et les résultats sont reproductibles avec une erreur de 10% au maximum. On a établi que la teneur en tissu conjonctif du même produit était – dans la même usine – à peu près uniforme.