

XIII. Europäisches Treffen der
Fleischforscher Rotterdam
vom 19. bis 26. August 1967

Aus dem
Institut für Fleischwirtschaft der DDR, Magdeburg
Direktor: Dr.G. Theloe

Ermittlung des effektiven Eiweissgehaltes
von Fleisch und Fleischprodukten aus dem Differenzwert
von organisch gebundenem Gesamtstickstoff und durch
starke Basen abspaltbarem Amidstickstoff

von S. Rudischer

Einleitung

Vom Verfasser durchgeführte umfangreiche Untersuchungen über die Zusammensetzung der in Fleisch und anderen natürlichen Produkten enthaltenen Proteine haben ergeben, dass am Aufbau der Eiweissmoleküle ausser den bekannten dominierenden Peptidbindungen und den Sulfid- und Wasserstoffbrücken, auch chemische Bindungen beteiligt sein müssen, die Säureamidcharakter aufweisen. Bisher sind derartige Bindungen nur für einfach molekulare Auf- und Abbauprodukte des Eiweiss-stoffwechsels angenommen worden. Hierzu gehören die Säureamide der α -Amino-dikarbonsäuren wie Glutaminsäure und Asparaginsäure. Bezüglich der hochmolekularen Eiweisskomplexe wurden jedoch säureamidartige dem Kettenaufbau dienende chemische Bindungen noch nirgends erwähnt.

Für diese, hauptsächlich die Theorie der Chemie der Eiweiss-stoffe berührende, noch nicht abgeschlossene Arbeit ist eine gesonderte Publikation vorgesehen. Die vorläufigen theoretischen Ergebnisse dieser Untersuchung gaben jedoch Veranlassung zur vorliegenden Arbeit,

mit der der Beweis erbracht werden konnte, dass den vorerwähnten Erkenntnissen über eine bisher nicht diskutierte Art der Brückenbindung in den Eiweissmolekülen auch praktische Bedeutung bei der Analyse von Fleischwaren zukommt.

Die im vorliegenden Text enthaltenen Erläuterungen über den Chemismus der als Brückenbindungen im Eiweissmolekül vorkommenden Amido- bzw. Imidogruppen wurden auf Grund der einer gesonderten Publikation vorbehaltenen Ausführungen auf ein Minimum beschränkt.

Das spezielle Ziel dieser Auswertung der angeführten Erkenntnisse war es, eine analytische Methode zur Bestimmung des Eiweissgehaltes zu schaffen, die als Direktmethode eine exakte Ermittlung des Eiweissgehaltes in Fleisch- und Wurstwaren gestattet. Ein schwerwiegender Nachteil auf dem Gebiete der Analyse von Fleisch- und Wurstwaren ist zweifellos die Tatsache, dass der als Hauptsubstanz anzusprechende wertbestimmende Bestandteil Eiweiss noch nicht auf direktem Wege mit der erforderlichen Exaktheit, d.h., dem effektiven Wert entsprechend, bestimmt werden kann. Richtige, dem tatsächlichen Eiweissgehalt gerecht werdende Eiweisswerte können nur auf indirektem Wege aus der Differenz, die sich zwischen der Summe der prozentualen Anteile aller Nichteiweissbestandteile und 100% ergibt, errechnet werden. In der Praxis wird die Genauigkeit dieses theoretisch einwandfreien Verfahrens jedoch beeinträchtigt, da

- a) in vielen Fällen die Ermittlung aller Nichteiweissbestandteile auf Schwierigkeiten stösst und zum Teil nicht möglich ist,
- b) hierzu ein unverhältnismässig grosser Arbeits- und Zeit-aufwand benötigt wird,
- c) sich die Fehler, die bei der Bestimmung der einzelnen Bestandteile gemacht werden, summieren können und dann im Differenzwert summarisch untragbar hohe Fehler ergeben.

Die Bestimmung des Eiweissgehaltes aus dem organisch gebundenen

Stickstoff durch Aufschluss der Untersuchungsprobe nach Kjeldahl ergibt, vorausgesetzt, dass das Probematerial entsprechend homogen ist, zwar untereinander gut übereinstimmende, aber allgemein zu hohe Werte.

Beispielsweise ergeben in Magerfleisch die analytisch bestimmten Bestandteile an

%	Wasser durch Trocknen der Probe bis Gewichtskonstanz
%	Fett (Petroläthermethode)
%	Eiweiss nach Kjeldahl
%	Asche

ganz allgemein eine Summe von 101 bis 102%. Berücksichtigt man, dass ausserdem stets noch Milchsäure und Glykogen (zusammen etwa 1%) vorhanden sind, dann vergrössert sich dieser Fehler auf über 2%. Da Wasser, Fett und Asche direkt bestimmt werden, kann dieser den Höchstwert von 100% übersteigende Betrag nur darauf zurückzuführen sein, dass der nach der Kjeldahl-Methode gefundene Eiweisswert zu hoch ist.

Andere bekannte Methoden liefern noch ungenauere und auch untereinander stark streuende Werte, so dass sie für eine kritische Betrachtung von vornherein nicht in Betracht kommen.

Allgemein sind, wie durch viele Untersuchungen festgestellt wurde, die nach der Kjeldahl-Methode bestimmten Eiweisswerte um 10%, bezogen auf den Gesamtwert, höher als die Differenz, die nach Abzug der Summe der prozentualen Anteile aller Nicht-eiweiss-stoffe von 100% verbleibt. Diese Unsicherheit führt des öfteren, insbesondere bei vertraglich festgelegten Qualitätsforderungen, die die Einhaltung eines Mindesteiweissgehaltes betreffen, zu Unstimmigkeiten, die meistens Vertragsstrafen nach sich ziehen. Dies ist besonders oft bei für den Export bestimmten Dosenwürstchen der Fall.

Die Tatsache, dass der wichtigste Bestandteil der Fleischwaren, das Eiweiss oder Protein, nicht direkt bestimmbar ist, muss als Mangel der Untersuchungsmethodik der Fleischprodukte bezeichnet

werden. Nach wie vor bleibt einzige Methode die Ermittlung des Aminosäurestickstoffes und Umrechnung des gefundenen Stickstoffwertes mit Hilfe des Faktors 6,25 auf das statistische Mittel der äquivalenten Eiweiss-substanz. Um dies zu ermöglichen, wurden die nachfolgend aufgeführten Versuche durchgeführt.

Theoretische Unterlagen

Für die nach der Kjeldahl-Aufschlussmethode stets zu hoch ausfallenden Proteinwerte ergab sich durch Auffindung der erwähnten Säureamidbrücken eine entsprechende Erklärung.

Es zeigte sich, wie aus den im experimentellen Teil zusammengefassten Ergebnissen ersichtlich ist, dass der Anteil an diesen Säureamidbrücken im Eiweissmolekül verhältnismässig hoch ist und in den verschiedensten eiweisshaltigen Produkten konstant etwa 10% des Gesamtstickstoffes beträgt.

In der Eiweissaubstanz vorhandene Säureamidbrücken wurden zunächst auf Grund des beim Erhitzen des Fleisches bzw. Fettgewebes mit starken wässrigen Basen (KOH, NaOH) auftretenden Ammoniakgeruches vermutet.

Bei dieser Behandlung zerfallen peptidartig verkettete Teile der Eiweissmoleküle durch Hydrolyse lediglich in ihre Bauelemente, die Aminosäuren. Die Aminogruppen der Aminosäuren werden nicht abgespalten. Die durch Hydrolyse gebildeten Aminosäuren werden in basischem Medium sofort zu Carbonsäuresalzen neutralisiert.

Sind jedoch Säureamidbrücken vorhanden, dann entsteht bei gleicher Behandlung neben den Aminosäuren Ammoniak, das auf übliche Art nachgewiesen bzw. bestimmt werden kann.

Da durch schwache Basen wie Baryt- oder Calciumhydroxidlauge die Aufspaltung der Amido- bzw. Imidobindung nicht möglich ist und beim Kochen von Fleisch in diesen Lösungen ebenfalls keine Ammoniakentwicklung auftritt, kann mit Sicherheit darauf geschlossen werden, dass die eingangs erwähnte Ammoniakbildung

auf dem Vorhandensein von Säureamidverbindungen beruht.

Die Struktur der auf vorbeschriebene Art aufgebauten Eiweissmoleküle lässt sich durch folgende schematische Formelbilder demonstrieren: (siehe Abb. 1)

Experimentelle Ergebnisse

In verschiedenartigen Untersuchungsmustern wurde der Gesamtproteingehalt (Eiweissgehalt)

- a) auf indirektem Wege (Differenzmethode)
 - b) aus dem organisch gebundenen Gesamtstickstoff nach Kjeldahl
 - c) aus dem Aminostickstoff
- ermittelt.

Tabelle 1

Ermittlung des Eiweissgehaltes durch Differenzmethode

$$\% \text{ Eiweiss} = \frac{100}{\%} - \text{Summe der Nichteiweissbestandteile (\%)} \frac{\%}{\%}$$

Nr.	Art des Untersuchungsmusters	Wasser %	Fett %	Kochsalz-frei Asche %	NaCl %	Milch-säure%	Kohlen-hydrate ¹⁾ %	Summe Nicht-eiweiss %	Eiweiss (Diff. zu 100) %
1	Dosenwürstchen	63,5	23,5	0,4	2,3	0,6	0,2	90,5	9,5
2	Dosenwürstchen	64,0	22,7	0,4	2,2	0,6	0,2	90,1	9,9
3	Schweinefl., mager	74,5	2,7	1,1	-	1,2	0,3	79,8	20,2
4	Rindfl., mager	73,2	4,1	1,0	-	1,5	0,2	80,0	20,0
5	Leberwurst, fein	35,7	48,4	0,9	2,3	0,5	1,4	89,2	10,8
6	Jagdwurst	60,5	22,9	0,9	2,3	1,1	0,4	88,1	11,9
7	Bockwurst	56,3	30,3	0,8	1,8	0,6	0,4	90,2	9,8
8	Knackwurst	32,4	49,9	2,9	1,1	1,5	0,4	88,2	11,8
9	Mettwurst	40,7	44,0	0,8	2,8	0,8	0,3	89,4	10,6
10	Salami, halbausger.	27,3	46,3	1,4	4,2	1,1	0,8	81,1	18,9

- 7 - (E₁)

1) Aus Stärke, Leber, Gewürzen sowie Glykogen aus Fleisch

Alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens 2 Parallelbestimmungen - Streuung 0,1 bis 0,5 %

I
∞
I

Tabelle 2

In den in Tabelle 1 zusammengefassten Untersuchungsmustern wurde der Eiweissgehalt nach der Kjeldahlmethode bestimmt und die erhaltenen Werte mit den in Tabelle 1 angegebenen verglichen.

Probe	Art des Untersuchungsmusters	% Eiweiss		
		differenzmethode	nach Kjeldahl	Unterschied
1	Dosenwürstchen	9,5	10,9	+ 1,4
2	Dosenwürstchen	9,9	11,3	+ 1,4
3	Schweinefleisch	20,2	21,7	+ 1,5
4	Rindfleisch	20,0	22,0	+ 2,0
5	Leberwurst	10,8	12,5	+ 1,7
6	Jagdwurst	11,9	13,1	+ 1,2
7	Bockwurst	9,8	11,1	+ 1,3
8	Knackwurst	11,8	13,5	+ 1,7
9	Mettwurst	10,6	12,4	+ 1,8
10	Salami	18,9	20,6	+ 1,7

Bestimmung des durch Natronlauge aus Eiweiss abspaltbaren Ammoniaks

Apparatur: (Sehe Abb.2) Die beiden Überleitungsrohre und der zwischengeschaltete Spritzfänger⁵ sind erforderlich, um Fehler, die durch Mitreissen von Lauge-tröpfchen entstehen könnten, absolut auszuschalten.

Durchführung der Bestimmung

In den Erhitzungskolben (1) der skizzierten Apparatur wurden je Bestimmung etwa 5 g des Untersuchungsmusters eingewogen und der Kolben mit dem Aufsatz (2) verschlossen. Im Kolben (3) wurden 25 ml mit Tashiro-Indikator versetzte gesättigte Borsäurelösung vorgelegt (Messzylinder). Nach Einschalten des Kühlwassers wurden aus dem Tropftrichter (4) langsam 25 ml 10% ige Natronlauge auf die Probe gegeben. Der Kolben (1) wurde erhitzt, bis sein Inhalt siedete. Nach der Laugezugabe wurden in den Tropftrichter etwa 10 ml 10%ige Barylösung gebracht. Ein eventuelles Schäumen des Kolbeninhaltes zu Beginn des Siedens wurde durch tropfenweise Zugabe der Barylösung verhindert. Nach 10 Minuten Kochdauer (Abdestillieren des NH₃) wurde die Vorlageflüssigkeit tiefer gesetzt bis das Kühlrohrende frei war. Dann wurde noch 5 Minuten gedämpft. In der Vorlageflüssigkeit wurde das den Säureamidfragmenten entsprechende NH₃, mit 0,10 N-Salzsäure titriert (Farbumschlag grün auf violett) und als Stickstoff (N) berechnet.

$$\% N = \frac{a}{E} \cdot 0,14$$

a = ml 0,1 N Salzsäure

E = Einwaage $\left[\frac{g}{g} \right]$

N = Stickstoff

Die Fettbestimmung wurde nach der refraktometrischen Methode in Übereinstimmung mit der Konventionmethode (Petrolätherextraktion) durchgeführt. Die Milchsäure wurde aus dem Gesamtsäuregrad bestimmt, von dem die den freien Fettsäuren und den freien Aminosäuren entsprechenden Säureäquivalente in Abzug gebracht wurden. Für die Bestimmung der übrigen Bestandteile wurden die gültigen Konventionmethoden angewandt.

Tabelle 3

In den in den Tabellen 1 und 3 angegebenen Untersuchungsmustern wurden folgende Werte an Gesamtstickstoff und als NH₃ abspaltbarem festgestellt.

Probe Nr.	Art des Untersuchungsmusters	a) Gesamtstickstoff nach Kjeldahl %N	b) Säureamidstickstoff % N	Aminosäurestickstoff (Differenz a - b) %N	daraus berechneter Eiweisswert %
1	Dosenwürstchen	1,74	0,17	1,57	9,8
2	Dosenwürstchen	1,80	0,17	1,63	10,2
3	Schweinefleisch	3,47	0,31	3,16	19,8
4	Rindfleisch	3,52	0,33	3,19	19,9
5	Leberwurst	2,00	0,19	1,81	11,3
6	Jagdwurst	2,09	0,20	1,89	11,8
7	Bockwurst	1,77	0,16	1,61	10,1
8	Mettwurst	1,99	0,18	1,81	11,3
9	Knackwurst	2,16	0,21	1,95	12,2
10	Salami	3,30	0,32	2,98	18,6
11	Sojabohnenmehl	6,10	0,73	5,37	33,6

Zum Beweis, dass das abgespaltene Ammoniak nicht aus Aminosäuren stammt, wurden analysenreine Aminosäuren der gleichen Behandlung unterworfen wie die vorgenannten Untersuchungsmuster.

Hierzu wurden herangezogen

- DL - Alanin p.A.
- DL - Valin p.A.
- DL - Isoleucin p.A.
- Glykokoll p.A.

Aus keiner der angegebenen Aminosäuren wurde Ammoniak abgespalten. Die Vorlageflüssigkeit zeigte in jedem Fall bereits bei Zugabe des ersten Tropfens 0,1 N Salzsäure Farbumschlag.

Aus diesen Untersuchungsergebnissen geht eindeutig hervor, dass durch Abzug des aus Säureamidbrücken-stammenden Stickstoffes vom organisch gebundenen Gesamtstickstoff der Wirklichkeit sehr nahe Eiweisswerte erhalten werden.

Zusammenfassung

Zur Bestimmung des Eiweissgehaltes in Fleischprodukten werden hauptsächlich die Aufschlussmethode nach Kjeldahl und die sogenannte Differenzmethode benutzt. Die letztere beruht auf der Ermittlung des Eiweissgehaltes aus der Differenz, die nach Abzug der prozentualen Anteile aller Nicht-eiweissbestandteile von 100 resultiert. Die Kjeldahl-Methode gibt um 10% zu hohe Werte. Die Differenzmethode ist dagegen langwierig und die bei den einzelnen Bestimmungen gemachten Fehler übertragen sich summarisch auf den Eiweisswert. Durch Auffindung von Säureamidbrücken, die etwa 10% des Gesamtstickstoffwertes betragen, ergab sich eine Erklärung für die zu hohen Kjeldahlwerte. Durch Bestimmung der Stickstoffmenge, die diesen Brücken äquivalent ist, und nach Abzug dieses Betrages vom organischen Gesamtstickstoff können der Realität besser entsprechende Eiweisswerte erhalten werden.

Summary

Both, the "Decomposing method according Kjeldahl" and so called "Difference method" are mainly used to determine the percentage of protein in meat products. The difference method is based on determining all of nonprotein constituents in meat and subtraction of these constituents (calculated in percentage) from hundred. The results, given by method of Kjeldahl, are generally about 10% too high. On the other hand the difference method is very lengthy and mistakes made in several determinations of nonprotein components may be carried over in protein value. By finding out in protein molecules chemical bonds of kind of acidamide compounds the reason is given for the high protein values according Kjeldahl. The value of acidamidonitrogen amount approximately 10% of total nitrogen content. Effective amounts of protein content may be received by determination of acidamidonitrogen in meat and subtraction this amount from value of total nitrogen.

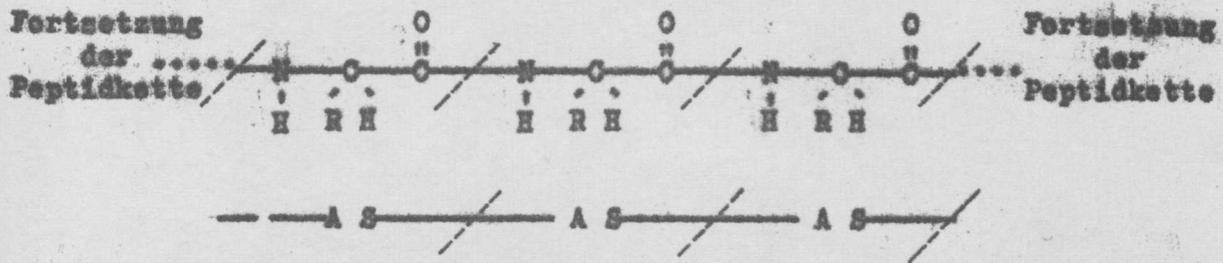
Résumé

Pour détermination des protéines dans les produits de viande il y a la méthode de développement d'après "Kjeldahl" comme méthode essentielle et une autre méthode de différence selon laquelle le contenu protéine se détermine par le pourcentage des contenants non protéine.

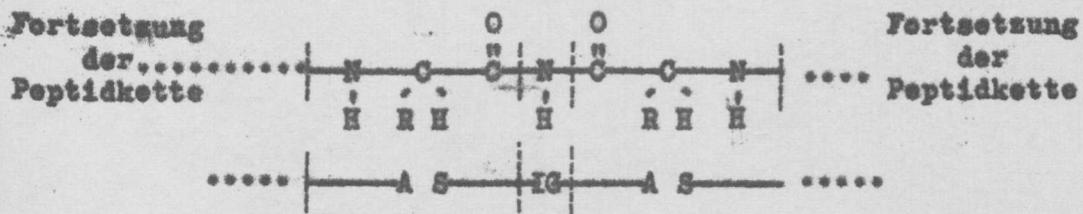
La méthode Kjeldahl va donner de résultats 10% plus haut que celle de la méthode de différence, d'autre part cette dernière méthode laborieuse est fautive, les fautes possible en somme falsifierais les résultats.

On découvre des combinaisons amide qui font 10% du contenant d'azote, ça éclaircie les valeurs de Kjeldahl trop haute, la détermination du contenant d'azote équivalent aux amide et après les diminuer seront les résultats de la détermination des protéine plus juste.

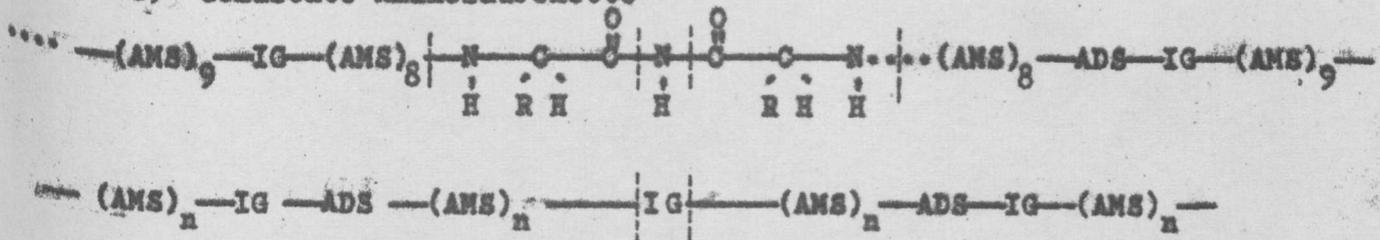
a) Homogene Peptidkette



b) Säureamidbrücke



c) Gemischte Aminosäurekette



AS = Aminosäurerest

IG = Imidgruppe (---NH---)

AMS = Aminomonokarbonsäurerest

ADS = Amino-dikarbonsäurerest

Kolbeninhalt
250 ml

Sandbad

