

Afd. Vlees en Vleesprodukten 1982-10-25
VERSLAG 82.83 Pr.nr. 505.7020
Onderwerp: Oriënterend onderzoek vlees-
identificering op basis van
aminozuurpatroon.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofd (3x), direktie VKA, afd.
Vlees en Vleesprodukten (4x), afd. Normalisatie (Humme),
afd. Projektadministratie, Projektleider (Cazemier).

Projekt: Ontwikkeling en verbetering van onderzoekmethoden voor vlees en vleesprodukten

Onderwerp: Oriënterend onderzoek vleesidentificering op basis van aminozuurpatroon

Doel:




Nagaan of het aminozuurpatroon van diverse soorten vlees (onverhit en verhit) zodanig uniek is, dat het als eigenschap ter identificering en kwantificering gebruikt kan worden.

Samenvatting:

Monsters kip, varken, paard en rund werden onderzocht op aminozuur-samenstelling, vet, eiwit en vocht. De monsters waren zowel ongekookt (vers) als gekookt vlees (15 min).

Conclusie:

1. De aminozuurpatronen blijken te weinig van elkaar te verschillen om identificeringen mogelijk te maken, zowel in rauwe als gekookte toestand.
2. Rauwe kip blijkt een uitzondering te zijn, hetgeen nadere studie behoeft.

Verantwoordelijk: drs H.L. Elenbaas 
Samensteller: J.M.P. van Trijp 
Medewerkers: A. van Polanen (eiwitbepalingen)
Projectleider: G. Cazemier 

Inleiding:

In toenemende mate worden kwaliteitslaboratoria geconfronteerd met vragen die verband houden met de identiteit van een aangeboden vleesmonster.

Nu zijn er diverse methoden ontwikkeld om de verschillende soorten vlees te kunnen onderscheiden. De electroforetische en immunologische technieken zijn hiervan veelbelovend.

Problemen beginnen te ontstaan op het moment dat men geconfronteerd wordt met verhitte vleessoorten of -produkten.

Dit heeft de gedachte doen ontstaan om na te gaan in welk opzicht aminozuuranalyse hier de helpende hand kan bieden.

Geprobeerd is om te onderzoeken of de aminozuurpatronen van diverse soorten vlees (rund, paard, varken en kip) in rauwe en gekookte toestand, zodanige verschillen opleveren dat dit een hulpmiddel kan zijn bij identificering en kwantificering van deze soorten vlees.

Monstermateriaal en voorbereiding

Bij de lokale detailhandel zijn de volgende monsters gekocht:

<u>Tabel 1</u>	<u>Soort vlees</u>	<u>RIKILT-nr. 1982</u>
	kopvlees (varken)	13197
	ros van paard	13198
	varkensbil	13199
	runderezeltje	13200
	kipfilet	13201

Alle monsters waren vers en niet diepgevroren geweest.

Na binnenkomst in het laboratorium zijn de monsters direct verkleind en gehomogeniseerd met behulp van een Robot-Coupe R4. De consistentie is dan vergelijkbaar met b.v. smeerworst. Hierna direct diepgevroren bij -32°C , waarbij ook de bewaring plaatsvond.

Voor gebruik zijn de monsters ontdooit, door de plastic potjes in stromend koud water te zetten. De inhoud werd dan gehomogeniseerd in de mortier om uitgetreden dripvocht weer te mengen.

Methoden, apparatuur

Eiwit: NEN 3442 (vlees is eerst gedroogd)

Vet : NEN 3444

Vocht: NEN 3440

De aminozuren in vers vlees zijn rechtstreeks bepaald volgens intern voorschrift (in voorbereiding). Van het gehomogeniseerde verse vlees is een gedeelte 15' gekookt in gedestilleerd water, afgevoerd, gewogen en verder behandeld als het verse vlees. Van het gehydrolyseerde monster is 1 ml aangebracht op de top van de lange ionenwisselingskolom (Beckman M82 hars) van een Multichrom B aminozuuranalyser (Beckman).

Detectie vond plaats met ninhydrine volgens Spackman, Stein en Moore (1956).

Piekberekening met Shimadzu CR 1-A integrator. Voor instellingen van de aminozuuranalyser wordt verwezen naar de manuals.

Bij de berekening van de gehalten aan threonine, serine, valine en isoleucine is een correctiefactor toegepast zoals voorgesteld door Slump (1969).

Resultaten en discussie

De aminozuren worden aangegeven met de bekende drie-letterige notatie, uitzondering:

CYST A : cysteïnezuur - cysteïne (1/2 cystine)

ASP A : asparaginezuur

MET S : methioninesulfon - methionine

Eiwit-, vet- en vochtgehalten worden vermeld in tabel 11.

De aminozuurgehalten zoals bepaald in ongekookt vlees staan vermeld in tabel 2. Het percentage is gerelateerd aan ingewogen hoeveelheid vers (ongekookt) vlees. De gehalten in het gekookte produkt staan vermeld in tabel 3. Het hier gebruikte percentage is gerelateerd als % van de ingewogen hoeveelheid gekookt vlees.

Het percentage is niet omgerekend naar ongekookt vlees om een vergelijking te kunnen maken met gekookte produkten, indien dit nodig mocht blijken.

Een eerste beschouwing van deze cijfers leert dat het percentage aminozuur in gekookt vlees schijnt te zijn toegenomen. Uitzonderingen hierop vormen alanine en histidine. Als verklaring hiervoor kan gegeven worden dat tijdens het koken het vlees compakter wordt door de eiwitdenaturatie, vetverlies en vochtverlies. Herleid op het vlees neemt dan het gehalte schijnbaar toe. De percentages geven zodoende geen duidelijk houvast voor een vergelijking. Een beter beeld wordt echter verkregen als de gehalten uitgedrukt worden in delen lysine (Fisher en Scougall - 1982). Zie de tabellen 4 en 5. Nu is duidelijk dat het gehalte aan aminozuren wel gedaald is, met nog steeds alanine en histidine als uitschieters.

Als van de vier soorten vlees de minimum-/maximumgrenzen, zoals af te lezen uit de tabellen 2 t/m 5, in tabel gezet worden (tabel 6), dan blijkt dat het verschil tussen minimum en maximum over het algemeen van dezelfde grootte orde is als de fout in de analyse van de diverse aminozuren (10%).

Dit geldt nog in het bijzonder voor kopvlees/varkensbil (tabel 7) waar het niet mogelijk is onderscheid te maken tussen twee vleesdelen door de kleine verschillen tussen de minimum/maximugehaltenes. Tussen kip en rund doet zich hetzelfde voor.

De minimum/maximium afwijkingen blijken het meest op de voorgrond te treden bij de aminozuren proline (PRO), glycine (GLY) en alanine (ALA) in mindere mate ook fenylalanine (PHE) (tabellen 6 t/m 10).

Het valt dan tevens op, dat bij kopvlees en runderezeltje een hoog gehalte aan proline en glycine te vinden is. Dit heeft te maken met de kwaliteit van het vlees. Deze soorten bevatten nogal wat bindweefsel, dat op zich een hoog gehalte aan proline en glycine bezit (dit geldt ook voor het niet bepaalde hydroxyproline, dat als maat voor het bindweefselgehalte dient). De kwaliteit is mede af te leiden uit tabel 11 (veel vet, laag eiwit %). De aminozuurgehaltenes hebben in dit geval niet meer opgeleverd dan kwaliteitsindices. De slotconclusie moet dan ook luiden, dat de aminozuurgehaltenes niet als basis voor identificering van ongekookt (= onverhit) en gekookt (= verhit) vlees kunnen dienen. Voor onverhit vlees zijn deze resultaten bevestigd door Vervack et al (1977). Deze onderzoekers hebben de aminozuursamenstelling onderzocht van rund, paard, schaap, varken, kalf en divers gevogelte, waarbij de verschillen in gehalte gekenmerkt werden als zijnde niet essentieel.

Dit sluit kwantificering helemaal uit.

Er is door Lindqvist et al (1975) en Olsman et al (1979) wel succes geboekt ten aanzien van het bepalen van niet-vleeseiwitten in vlees- en melkprodukten. Hierbij werd gebruik gemaakt van een computer om de chromatogrammen nader te analyseren. Lindqvist wist hiermee een nauwkeurigheid van 4% absoluut te halen bij soya in melkeiwit. Door Olsman wordt opgemerkt dat door de grote overeenkomsten (dus kleine verschillen) tussen varkens- en rundvlees, deze twee soorten voor de computer gelijkgesteld werden bij het bepalen van plantaardige eiwitten.

Toch heeft het onderzoek aan kip nog een interessante ingang voor verder onderzoek gegeven.

Zie chromatogram 1 en chromatogram 2.

Zoals chromatogram 1 toont (pijl), heeft zich een ninhydrine-positieve verbinding genesteld tussen histidine en lysine. Een vergelijking met chromatogram 2 leert dat na 15' koken deze stof nagenoeg verdwenen is. Het zij opgemerkt dat de piek in chromatogram 1 bij 105.19' een artefact is, veroorzaakt door een bufferwisseling.

Uit de literatuur zoals die tot nu toe geraadpleegd is kon vooralsnog geen opheldering van de identiteit vastgesteld worden.

Wel kunnen enige indicaties opgesteld worden:

- de stof moet een basisch karakter hebben
- moet door hitte gedenatureerd worden.

Het ligt echter buiten de sfeer van dit oriënterend onderzoek om de identiteit vast te leggen.

Conclusies, aanbevelingen

1. Uit de cijfers blijkt dat de verschillen tussen de diverse soorten vlees, zowel ongekookt als gekookt niet zodanig zijn dat hieruit een bruikbare methode ontwikkeld kan worden ten behoeve van de vleesidentificering.
2. Het monster kip vormt hierop een uitzondering door een afwijkend patroon te tonen. Het verdient dan ook aanbeveling na te gaan of spiervlees van andere delen van de kip (poot, vleugel) eenzelfde patroon te zien geven.

Zo het voorgaande een positief resultaat oplevert dient een inventarisatie gemaakt te worden van (vlees-) produkten waar rauwe kip in verwerkt wordt. Van deze inventarisatie zal het afhangen of het nodig zal zijn de identiteit van deze stof op te helderen.

3. Aangezien blijkt dat aminozuren te kleine bouwstenen zijn van eiwitten om conclusies omtrent de identiteit van de eiwitten hieraan te ontleen, lijkt het zinvol verder te gaan op peptide-niveau. De techniek die hier in eerste instantie voor geschikt lijkt is HPLC, (Takaghi 1981).

Eventueel ondersteund door electroforese (SDS-PAGE).

Literatuur

1. Fisher C., Scougall R.K.
British Poultry Science, 23 : 233-237, 1982.
2. Lindqvist B., Ostgren J., Lindberg I.
Z. Lebensmittelunters. u. Forschung, 159 : 15, 1975.
3. Olsman W.J., Slump P., Thissen, J.Th.N.
CIVO-report R 6104, 1979.
4. Slump P.
Dissertatie;
"Karakterisering van de voedingswaarde van eiwitten in voedingsmiddelen door hun aminozuursamenstelling en de invloed van verhitting en loogbehandeling op de benutbaarheid van aminozuren"
32-34, 1969.
5. Spackman D.H., Stein W.H., Moore S.
Fed. Proc., 15 : 358, 1956.
6. Takaghi, Toshio
Journal of Chromatography, 219 : 123-127, 1981.
7. Vervack V., Vanbelle M., Foulon M.
Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires 32 : 16-20, 1977.

TABEL 2
VLEES

% AMINOZUUR IN ONGEKOOKT VLEES

OBS	KOPVLEES 13197	ROS/PAARD 13198	VARKENSBIL 13199	RUNDEREZELTJE 13200	KIPFILET 13201
CYST A	0.29	0.42	0.46	0.41	0.35
ASF A	1.90	2.08	1.96	1.76	1.88
MET S	0.50	0.74	0.78	0.64	0.73
THR	0.84	1.05	0.98	0.85	1.00
SER	0.85	0.92	0.85	0.79	0.98
GLU	3.02	3.81	3.28	3.20	3.49
PRO	0.97	0.60	0.66	1.22	0.85
GLY	2.09	1.54	0.91	1.34	0.83
ALA	1.40	2.03	1.17	1.27	1.19
VAL	0.92	1.68	1.08	0.97	1.01
ILE	0.79	1.20	1.04	0.86	1.00
LEU	1.37	1.84	1.66	1.38	1.61
TYR	0.61	0.77	0.74	0.54	0.63
PHE	0.69	0.88	0.78	0.68	0.74
HIS	0.63	0.87	0.74	0.56	0.50
LYS	1.50	1.94	1.86	1.59	1.82
ARG	1.36	1.37	1.33	1.04	1.08

TABEL 3
VLEES

% AMINOZUUR IN 15' GEKOOKT VLEES

OBS	KOPVLEES 13197	ROS/PAARD 13198	VARKENSBIL 13199	RUNDEREZELTJE 13200	KIPFILET 13201
CYST A	0.38	0.53	0.49	0.50	0.43
ASP A	1.98	3.19	2.52	2.55	2.34
MET S	0.58	0.98	0.91	0.89	0.80
THR	0.99	1.59	1.30	1.30	1.17
SER	0.96	1.42	1.17	1.16	1.06
GLU	3.39	5.00	4.39	4.53	3.96
PRO	1.09	0.87	1.05	1.48	1.03
GLY	1.44	1.61	1.09	1.07	0.93
ALA	1.31	1.86	1.51	1.18	1.08
VAL	1.11	1.87	1.44	1.29	1.20
ILE	1.07	1.80	1.43	1.36	1.29
LEU	1.79	2.82	2.30	2.18	2.10
TYR	0.71	1.19	0.95	0.94	0.88
PHE	0.83	1.30	1.04	0.67	0.64
HIS	0.30	0.44	0.35	0.36	0.37
LYS	1.87	2.99	2.47	2.50	2.29
ARG	1.54	2.23	1.82	1.85	1.66

TABEL 4
VLEES

AMINOZUURPATROON, GERELATEERD AAN LYSINE, IN ONGEKOOKT VLEES

OBS	KOPVLEES 13197	ROS/PAARD 13198	VARKENSBIL 13199	RUNDEREZELTJE 13200	KIPFILET 13201
CYST A	19	22	25	26	19
ASP A	127	107	105	111	103
MET S	33	38	42	40	40
THR	56	54	53	53	55
SER	57	47	46	50	54
GLU	201	196	176	201	192
PRO	65	31	35	77	47
GLY	139	79	49	84	46
ALA	93	105	63	80	65
VAL	61	87	58	61	55
ILE	53	62	56	54	55
LEU	91	95	89	87	88
TYR	41	40	40	34	35
PHE	46	45	42	43	41
HIS	42	45	40	35	27
LYS	100	100	100	100	100
ARG	91	71	72	65	59

TABEL 5
VLEES

AMINOZUURPATROON, GERELATEERD AAN LYSINE, IN 15' GEKOOKT VLEES

OBS	KOPVLEES 13197	ROS/PAARD 13198	VARKENSBIL 13199	RUNDEREZELTJE 13200	KIPFILET 13201
CYST A	20	18	20	20	19
ASP A	106	107	102	102	102
MET S	31	33	37	36	35
THR	53	53	53	52	51
SER	51	47	47	46	46
GLU	181	167	178	181	173
PRO	58	29	43	59	45
GLY	77	54	44	43	41
ALA	70	62	61	47	47
VAL	59	63	58	52	52
ILE	57	60	58	54	56
LEU	96	94	93	87	92
TYR	38	40	38	38	38
PHE	44	43	42	27	28
HIS	16	15	14	14	16
LYS	100	100	100	100	100
ARG	82	75	74	74	72

TABEL 6

R U N D / V A R K E N / P A A R D / K I P

	ongekookt		gekookt	
	min ---	max ---	min ---	max ---
CYST A	0.29 [19]	0.46 [26]	0.38 [18]	0.53 [20]
ASP A	1.76 [103]	2.08 [127]	1.98 [102]	3.19 [107]
MET S	0.50 [33]	0.78 [42]	0.58 [31]	0.98 [37]
THR	0.84 [53]	1.05 [56]	0.99 [51]	1.59 [53]
SER	0.79 [46]	0.98 [57]	0.96 [46]	1.42 [51]
GLU	3.02 [176]	3.81 [201]	3.39 [167]	5.00 [181]
PRO	0.60 [31]	1.22 [77]	0.87 [29]	1.48 [58]
GLY	0.83 [49]	2.09 [139]	0.93 [41]	1.61 [77]
ALA	1.17 [63]	2.03 [105]	1.08 [47]	1.86 [70]
VAL	0.92 [55]	1.68 [87]	1.11 [52]	1.87 [63]
ILE	0.79 [53]	1.20 [62]	1.07 [54]	1.80 [60]
LEU	1.37 [87]	1.84 [95]	1.79 [87]	2.82 [96]
TYR	0.54 [34]	0.77 [41]	0.71 [38]	1.19 [40]
PHE	0.69 [41]	0.88 [46]	0.64 [27]	1.30 [44]
HIS	0.50 [27]	0.87 [45]	0.30 [14]	0.44 [16]
LYS	1.50 [100]	1.94 [100]	1.87 [100]	2.99 [100]
ARG	1.04 [59]	1.37 [91]	1.54 [72]	2.23 [82]

TABEL 7

K O P V L E E S / V A R K E N S B I L

	ongekookt		gekookt	
	min ---	max ---	min ---	max ---
CYST A	0.29 [19]	0.46 [25]	0.38 [20]	0.49 [20]
ASP A	1.90 [105]	1.96 [127]	1.98 [102]	2.52 [106]
MET S	0.50 [33]	0.78 [42]	0.58 [31]	0.91 [37]
THR	0.84 [53]	0.98 [56]	0.99 [53]	1.30 [53]
SER	0.85 [46]	0.85 [57]	0.96 [47]	1.17 [51]
GLU	3.02 [176]	3.28 [201]	3.39 [178]	4.39 [181]
PRO	0.66 [35]	0.97 [65]	1.05 [43]	1.09 [58]
GLY	0.91 [49]	2.09 [139]	1.09 [44]	1.44 [77]
ALA	1.17 [63]	1.40 [93]	1.31 [61]	1.51 [70]
VAL	0.92 [58]	1.08 [61]	1.11 [58]	1.44 [59]
ILE	0.79 [53]	1.04 [56]	1.07 [57]	1.43 [58]
LEU	1.37 [89]	1.66 [91]	1.79 [93]	2.30 [96]
TYR	0.61 [40]	0.74 [41]	0.71 [38]	0.95 [38]
PHE	0.69 [42]	0.78 [46]	0.83 [42]	1.04 [44]
HIS	0.63 [40]	0.74 [42]	0.30 [14]	0.35 [16]
LYS	1.50 [100]	1.86 [100]	1.87 [100]	2.47 [100]
ARG	1.33 [72]	1.36 [91]	1.54 [74]	1.82 [82]

TABEL 8

P A A R D / R U N D

	ongekookt		gekookt	
	min ---	max ---	min ---	max ---
CYST A	0.41 [22]	0.42 [26]	0.50 [18]	0.53 [20]
ASP A	1.76 [107]	2.08 [111]	2.55 [102]	3.19 [107]
MET S	0.64 [38]	0.74 [40]	0.89 [33]	0.98 [36]
THR	0.85 [53]	1.05 [54]	1.30 [52]	1.59 [53]
SER	0.79 [47]	0.92 [50]	1.16 [46]	1.42 [47]
GLU	3.20 [196]	3.81 [201]	4.53 [167]	5.00 [181]
PRO	0.60 [31]	1.22 [77]	0.87 [29]	1.48 [59]
GLY	1.34 [79]	1.54 [84]	1.07 [43]	1.61 [54]
ALA	1.27 [80]	2.03 [105]	1.18 [47]	1.86 [62]
VAL	0.97 [61]	1.68 [87]	1.29 [52]	1.87 [63]
ILE	0.86 [54]	1.20 [62]	1.36 [54]	1.80 [60]
LEU	1.38 [87]	1.84 [95]	2.18 [87]	2.82 [94]
TYR	0.54 [34]	0.77 [40]	0.94 [38]	1.19 [40]
PHE	0.68 [43]	0.88 [45]	0.67 [27]	1.30 [43]
HIS	0.56 [35]	0.87 [45]	0.36 [14]	0.44 [15]
LYS	1.59 [100]	1.94 [100]	2.50 [100]	2.99 [100]
ARG	1.04 [65]	1.37 [71]	1.85 [74]	2.23 [75]

TABEL 9

V A R K E N / R U N D

	ongekookt		gekookt	
	min ---	max ---	min ---	max ---
CYST A	0.41 [19]	0.46 [26]	0.38 [20]	0.50 [20]
ASP A	1.76 [111]	1.96 [127]	1.98 [102]	2.55 [106]
MET S	0.64 [33]	0.78 [40]	0.58 [31]	0.89 [36]
THR	0.85 [53]	0.98 [56]	0.99 [52]	1.30 [53]
SER	0.79 [50]	0.85 [57]	0.96 [46]	1.16 [51]
GLU	3.20 [176]	3.28 [201]	3.39 [178]	4.53 [181]
PRO	0.66 [35]	1.22 [77]	1.05 [43]	1.48 [59]
GLY	0.91 [84]	1.34 [139]	1.07 [43]	1.44 [77]
ALA	1.27 [63]	1.40 [80]	1.18 [47]	1.51 [70]
VAL	0.97 [58]	1.08 [61]	1.11 [52]	1.29 [59]
ILE	0.86 [54]	1.04 [56]	1.07 [54]	1.36 [58]
LEU	1.37 [87]	1.38 [91]	1.79 [87]	2.18 [96]
TYR	0.54 [34]	0.74 [41]	0.71 [38]	0.94 [38]
PHE	0.68 [43]	0.78 [46]	0.67 [27]	1.04 [44]
HIS	0.56 [35]	0.74 [42]	0.30 [14]	0.36 [16]
LYS	1.59 [100]	1.86 [100]	1.87 [100]	2.50 [100]
ARG	1.04 [65]	1.36 [91]	1.54 [74]	1.85 [82]

TABEL 10

K I P / R U N D

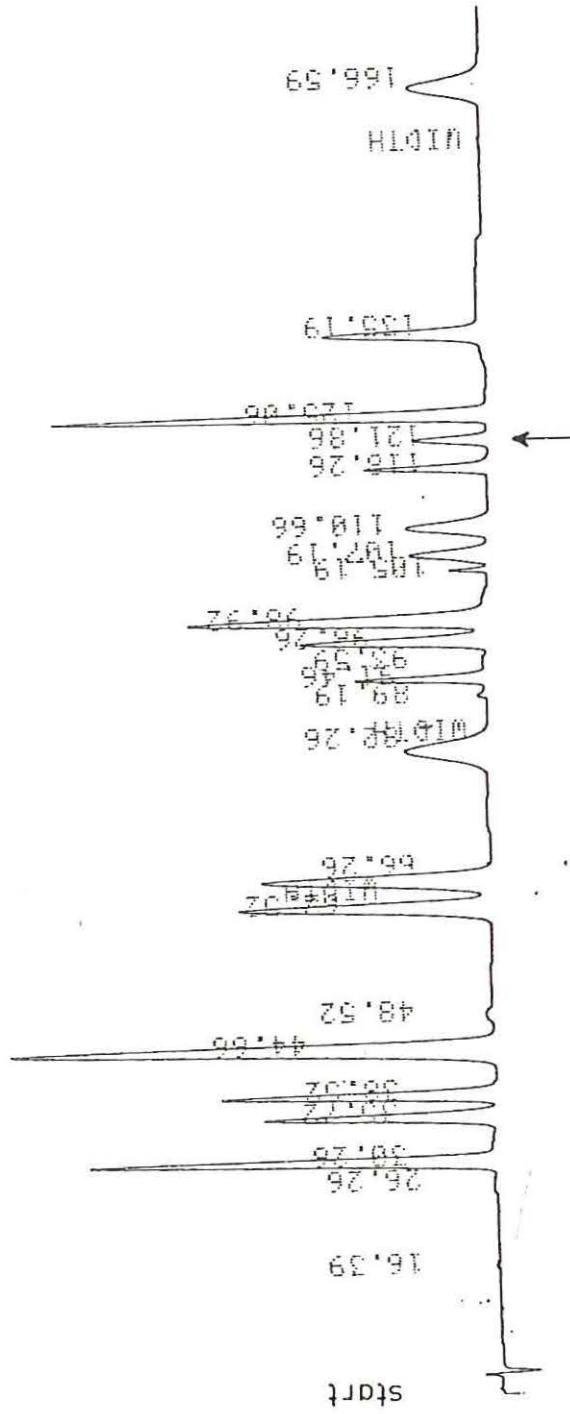
	ongekookt		gekookt	
	min ---	max ---	min ---	max ---
CYST A	0.35 [19]	0.41 [26]	0.43 [19]	0.50 [20]
ASP A	1.76 [103]	1.88 [111]	2.34 [102]	2.55 [102]
MET S	0.64 [40]	0.73 [40]	0.80 [35]	0.89 [36]
THR	0.85 [53]	1.00 [55]	1.17 [51]	1.30 [52]
SER	0.79 [50]	0.98 [54]	1.06 [46]	1.16 [46]
GLU	3.20 [192]	3.49 [201]	3.96 [173]	4.53 [181]
PRO	0.85 [47]	1.22 [77]	1.03 [45]	1.48 [59]
GLY	0.83 [46]	1.34 [84]	0.93 [41]	1.07 [43]
ALA	1.19 [65]	1.27 [80]	1.08 [47]	1.18 [47]
VAL	0.97 [55]	1.01 [61]	1.20 [52]	1.29 [52]
ILE	0.86 [54]	1.00 [55]	1.29 [54]	1.36 [56]
LEU	1.38 [87]	1.61 [88]	2.10 [87]	2.18 [92]
TYR	0.54 [34]	0.63 [35]	0.88 [38]	0.94 [38]
PHE	0.68 [41]	0.74 [43]	0.64 [27]	0.67 [28]
HIS	0.50 [27]	0.56 [35]	0.36 [14]	0.37 [16]
LYS	1.59 [100]	1.82 [100]	2.29 [100]	2.50 [100]
ARG	1.04 [59]	1.08 [65]	1.66 [72]	1.85 [74]

TABEL 11

RIKILT-nr -----	eiwit % -----	vet % -----	vocht % -----
13197	22.4	17.0	55.2
13198	24.6	0.61	70.2
13199	22.6	3.80	69.4
13200	20.6	8.56	71.2
13201	25.9	2.66	67.9

kip, vers

chromatogram 1



kip, 15' gekookt

chromatogram 2

