

## **Entwicklung einer Methode zur direkten Bestimmung des Gehaltes an bindegewebeseiweißfreiem Fleischeiweiß in Kochschinken über actingebundenes 3-Methylhistidin**

Development of a method for the direct determination of the meat content in ham by actin bound 3-methylhistidine

Karin STEINFÜHRER, W. ARNETH und K. SPEER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Lebensmittelchemie, TU Dresden

### **Zusammenfassung**

Da die indirekte Erfassung des BEFFE-Gehaltes nach den Vorgaben der Leitsätze vor allem bei Produkten mit Fremdeiweißzusatz an ihre analytische Grenzen stößt, wurde eine Methode zur direkten Bestimmung des Muskeleiweißgehaltes entwickelt. Als Index für den Fleischgehalt kann die Menge der Aminosäure 3-Methylhistidin im Fleischerzeugnis dienen, die nur in den myofibrillären Proteinen Actin und Myosin vorkommt. Es zeigte sich jedoch, dass der Gehalt an 3-Methylhistidin im Fleischeiweiß Schwankungen unterliegt. Zurückzuführen ist dies auf die unterschiedlichen 3-Methylhistidin-Gehalte des Myosins. Actin weist dagegen einen konstanten Anteil von 1 mol 3-Methylhistidin/mol Protein auf. Auf der Basis des 3-Methylhistidin-Gehaltes im Actin sollte deshalb eine zuverlässigere Aussage über den Fleischgehalt eines Erzeugnisses möglich sein.

Die Bestimmung des actingebundenen 3-Methylhistidins ist nach elektrophoretischer Trennung von Myosin möglich. Die Ergebnisse erster Versuche mit Kochschinken zeigen, dass eine enge Beziehung zwischen dem Gehalt an Actin-3-Methylhistidin und BEFFE besteht und somit eine sicherere direkte Bestimmung des Muskeleiweißgehaltes möglich ist.

### **Summary**

The application of the indirect determination of the collagen-free muscle protein content ('BEFFE') is limited especially for products with added nonmeat protein. Therefore it was necessary to develop a method for a direct determination of the muscle protein content. The specific amino acid 3-methyl-histidine (3-MH), found both in myosin as well as in actin, proved to be an appropriate index for the meat content. It turned out, however, that the 3-methyl-histidine content in the muscle protein is varying, due to the different contents of 3-methyl-histidine in myosin. In contrast actin contains a constant amount of 1 mol 3-methyl-histidine/mol protein. Based on the 3-methylhistidine content in actin a reliable determination of the meat content in meat products should be possible.

The determination of the actin-bound 3-methylhistidine after electrophoretical separation from myosin is feasible. The first results with ham show a close correlation between the actin-3-MH content and the content of BEFFE. Therefore a direct determination of the muscle protein content is possible.

---

**Schlüsselwörter** 3-Methylhistidin – BEFFE – Muskelfleischbestimmung – Kochschinken

**Key Words** 3-methylhistidine – BEFFE – determination of muscle meat – ham

---

## Einleitung

Der Anteil an Muskelprotein, dem sogenannten bindegewebeisweißfreien Fleischprotein (BEFFE), stellt nach den Leitsätzen für Fleisch und Fleischzeugnisse den wichtigsten chemischen Qualitätsparameter für Fleischprodukte dar. Der BEFFE-Wert wird dort als Differenz aus Gesamteiweiß und der Summe von Fremdeiweiß, fremden Nichtproteinstickstoff-Verbindungen (NPN-Verbindungen) und Bindegewebeisweiß definiert. Spätestens seit der Novellierung der Fleischverordnung von 1995, die einen Zusatz auch von pflanzlichen Eiweißen in Fleischzeugnissen bei ausreichender Kenntlichmachung zulässt, stößt diese indirekte Ermittlung des BEFFE-Gehaltes jedoch an ihre analytischen Grenzen. Einerseits ist eine Quantifizierung von Fremdeiweiß insbesondere bei erhitzten Produkten bisher nicht zuverlässig möglich, andererseits fehlen für die Bewertung der Gehalte an fremden NPN-Verbindungen Grenzwerte für den natürlichen NPN-Gehalt. Diese analytischen Probleme können prinzipiell nur durch eine direkte Bestimmung des Fleischgehaltes gelöst werden.

Als Index für den Fleischgehalt kann die Menge der Aminosäure 3-Methylhistidin (3-MH) dienen, die nur in den myofibrillären Proteinen Actin und Myosin vorkommt. Bereits HIBBERT und LAWRIE (1972) schlugen vor, diese Aminosäure für die Erfassung des Muskelfleischanteils zu verwenden. Es zeigte sich jedoch, dass der Gehalt an 3-MH im Fleischprotein Schwankungen unterliegt, welche die Methode für eine wirkungsvolle Lebensmittelkontrolle zu ungenau machen (STEINERT 1998, ARNETH 1999). Zurückzuführen ist dies auf die unterschiedlichen 3-MH-Gehalte des Myosins in den verschiedenen Geweben. Anders als Myosin weist Actin einen konstanten Anteil von 1 mol 3-MH/mol Protein auf. Auf der Basis des 3-MH-Gehaltes im Actin sollte deshalb eine zuverlässigere Aussage über den

Fleischgehalt eines Erzeugnisses möglich sein. Ziel war es deswegen, eine Methodik zur Bestimmung des Gehaltes an actin gebundenem 3-Methylhistidin (Actin-3-MH) zu erarbeiten.

## Material und Methoden

**Proben.** Die untersuchten Kochschinken entstammten unterschiedlichen Produktionschargen, welche im Technikum der Bundesanstalt für Fleischforschung nach definierter Rezeptur hergestellt wurden.

**Chemikalien.** Acrylamidlösung 30 % „Rotiphorese Gel A“ (Roth)  
Ammoniumperoxodisulfat (Merck)  
Bisacrylamidlösung 2 % „Rotiphorese Gel B“ (Roth)  
Bromphenolblau, research grade (Serva)  
Fluorescamin (Sigma)  
Glycin, p.a. (Merck)  
Mercaptoethanol, research grade (Serva)  
3-Methylhistidin, purum (Fluka)  
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), p.a. (Merck)  
Thioglycolsäure, 70%ige wässrige Lösung (Sigma)  
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), p.a. (Merck)

**Geräte.** Homogenisator (Retsch; Grindomix), Mixer (Bühler, H04); Laborschwingmühle (Retsch, MM 2000); Schüttelwasserbad (Julabo SW-20 C); Elektrophoreseapparatur (Rundgele: Ø 6 cm, L = 14,5 cm, Werkstatt der BAFF) (Abb. 1); Stromquelle (Biometra Power Pack P25); Parafilm M (American National Can); Rotationsverdampfer (Heidolph, VV2011)

HPLC-Anlage: Pumpe (Gynkotheke M 480), Degaser (Degasys DG 1310), Fluoreszenzdetektor (Shimadzu RF-551), Probengeber (Spark Holland, Triathlon); Säule (Waters, Symmetry RP C18; 3,9 x 150 mm; 5 µm)

Fließinjektionsanalyse (SKALAR).



Abb. 1: Elektrophorese-Apparatur aus Plexiglas für sechs Rundgele ( $\varnothing$  1,6 cm, L = 14,5 cm)

## Methoden

### Bestimmung des Actin-3-MH-Gehaltes

Die gesamte Methode ist zusammenfassend in Abbildung 2 dargestellt.

**Herstellung des Acetonpulvers.** 10 g Probe nach Homogenisieren (Grindomix 3x30 sec; 2500 U/min) in einen Bühlerkolben (100 ml) einwiegen. 3x mit je 40 ml Aceton an einem Bühlermischer (Geschw. 1500 U/min; 1 min) extrahieren und Überstände gemeinsam jeweils über eine vorgetrocknete und gewogene Glasfritte (G3) abdekantieren. Zum Schluss gesamte Probe quantitativ in Glasfritte überführen und Aceton durch Anlegen eines Vakuums abziehen. Den Rückstand auf der Fritte über Nacht bei 80 °C trocknen lassen. Rückstand auswiegen ( $\Rightarrow$  Acetontrockenmasse) und in einer Laborschwingmühle anschließend fein vermahlen (Amplitude 60; 2 min).

**Herstellung der Gele und Vorelektrophorese.** Die Röhren der Elektrophoreseapparatur unten mit Parafilm abdichten und mit der Gellösung (5 % T; 2,67 % C: 32 ml Acrylamidlg. (30 %); 14 ml Bisacrylamidlg. (2 %); 50 ml Gelpuffer (0,75 M Tris / 0,38 % SDS / pH 6,8); 104 ml H<sub>2</sub>O dest.; 106  $\mu$ l TEMED (= N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin); 200  $\mu$ l APS-

Lsg. (= Ammoniumperoxodisulfat) (0,4 g/ml)) befüllen und mit Isopropanol überschichten (1 h polymerisieren). Isopropanol abgießen und mit H<sub>2</sub>O dest. abspülen. Ersatz des Parafilms durch Gaze. Vor Probenaufgabe Vorelektrophorese mit Thioglycolatpuffer (124 mM Tris/92 mM Thioglycolsäure). Dazu obere und untere Pufferkammer mit je ca. 0,5 l Thioglycolatpuffer befüllen und einen Strom von 20 mA anlegen (22 h).

**Herstellung der SDS-Probenlösung.** In einem Zentrifugengefäß mit Schraubverschluss exakt 10 ml Probenpuffer (10 mM Tris; 2 % SDS; 1 % Mercaptoethanol; pH 9,0) vorlegen und darauf 150 mg Acetonpulver auf 0,1 mg genau einwiegen. Anschließend 2 h in horizontaler Lage auf einem Schüttelgerät schütteln. Ungelösten Bindegewebsrückstand durch Zentrifugation bei 29.000 g abtrennen und die Lösung abdekantieren. 0,8 ml der SDS-Lösung mit 0,2 ml Farbstofflösung (Glycerin/H<sub>2</sub>O dest./Bromphenolblauslg. (0,05 g/ml) 6:5:1) versetzen.

**Elektrophorese.** Nach der Vorelektrophorese: Austausch des Thioglycolsäurepuffers gegen den Elektrodenpuffer (50 mM Tris/ 0,484 M Glycin/0,1 % SDS, pH 8,3). 0,1 ml der Probelösung auf die Geloberfläche zügig auftragen und Strom anlegen (60 mA; 4 h).

**Hydrolyse.** Nach Ende der elektrophoretischen Trennung den Elektrodenpuffer abgießen und die Gele einzeln aus den Röhren herausdrücken. Die Gelbereiche, welche die Farbstofffront enthalten (auf deren Höhe befindet sich auch das Actin), mit einem Doppelskalpell (Abstand 1,5 cm) ausschneiden und in Pyrex-Aufschlussgläser mit Schraubverschluss überführen. Gelstücke mit 10 ml 6 N HCl bei 105 °C im Trockenschrank 16 h hydrolysieren.

Das noch heiße Hydrolysat (ca. 60-80 °C) einschließlich dem viskosen Gel mit Hilfe eines Trichters in einen 50 ml Messkolben überführen, nach Abkühlen mit H<sub>2</sub>O dest. auffüllen und nach weiterem Abkühlen im Kühlschrank (1 h) abfiltrieren. 10 ml des Hydrolysats in 250 ml Rundkolben am Rotationsverdampfer (max. 40 °C) bis zur völligen Trockene eindampfen. Rückstand mit 15 ml Boratpuffer (0,4 N; pH 9) aufnehmen.

**Derivatisierung und RP-HPLC.** Derivatisierung in Reagenzgläsern mit Schraubverschluss: 2,5 ml Probenlösung mit 2,5 ml Fluorescaminlösung (2 mg/ml Acetonitril) versetzen, schütteln und 2 min warten; 2,5 ml 2N HCl zugeben, erneut schütteln und bei 80 °C im Trockenschrank 1 h erhitzen. Nach dem Abkühlen Filtration durch Minisart RC 15 (Sartorius); RP-HPLC: Einspritzvolumen: 100 µl; Säule: WATERS Symmetry C<sub>18</sub>, 5 µm, 3,9x150 mm; Fließmittel: Acetatpuffer (52 mM; pH 6,5) : Acetonitril : Methanol (70:19:11 v/v/v) (1 ml/min); Reinigung der Säule nach jedem Lauf durch Spülen mit Acetonitril; Fluoreszenzdetektion: Ex 370/Em 453.

Mit Hilfe der Aceton-trockenmasse lässt sich der Actin-3-MH-Gehalt im Acetonpulver auf die Frischmasse umrechnen.

#### **Bestimmung des gesamten proteingebundenen 3-MH (AM-3-MH)**

Die Bestimmungen wurden analog der von ARNETH (1997) veröffentlichten Methode durchgeführt. Dabei wird die Probe mit Hexan/Isopropanol (3:2 v/v) entfettet, anschließend mit Ethanol und Aceton extra-

hiert und das Acetonpulver zermahlen. Darin wird nach Säurehydrolyse und Derivatisierung mit Fluorescamin das gesamte proteingebundene 3-MH mittels HPLC bestimmt.

#### **Ermittlung des BEFFE-Gehaltes**

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes erfolgte durch eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl (L 06.00-7). Der Bindegewebsgehalt wurde über eine photometrische Bestimmung des Hydroxyprolins nach salzsaurer Hydrolyse ermittelt. Die Bestimmung des Hydroxyprolins im Hydrolysat erfolgte durch Fließinjektionsanalyse in einem System von SKALAR. Aus der Differenz von Gesamtprotein- und Bindegewebsprotein-gehalt wurde der Gehalt an BEFFE errechnet.

#### **Ergebnis und Diskussion**

Zur Entwicklung einer Methode zur Bestimmung des Gehaltes an actingebundenem 3-MH galt es besonders folgende Aspekte zu berücksichtigen:

- 1) Der entscheidende Schritt war die Entwicklung eines möglichst einfachen und reproduzierbaren semi-präparativen Verfahrens zur vollständigen Trennung von Actin und Myosin.
- 2) Voraussetzung für die Trennung der Proteine war jedoch die vollständige Lösung der myofibrillären Proteine in einem Lösungsmittel, welches auch noch denaturierte Proteine in erhitzten Fleischprodukten zerstörungsfrei zu erfassen vermochte.
- 3) Weiterhin musste ein empfindliches und reproduzierbares Analysenverfahren zur Bestimmung von 3-MH im isolierten Actin gefunden werden.

Nach DE WREEDE und STEGEMANN (1982) lassen sich myofibrilläre Proteine selbst in erhitztem Zustand in einem reduzierenden, alkalischen SDS-Puffer lösen. Die Proben werden bei diesem Verfahren zunächst mittels Acetonextraktion und an-

schließender Trocknung in ein Acetonpulver übergeführt, um eine schnelle und vollständige Lösung der Proteine zu erreichen. Auf der Basis einer SDS-Elektrophorese lässt sich sodann eine vollständige und reproduzierbare Trennung von Actin und Myosin im semipräparativen Maßstab erzielen. Dazu wurde eine Elektrophoreseapparatur konstruiert, in der Polyacrylamid-Rundgele mit einem Durchmesser von 1,6 cm polymerisiert werden können (Abb. 1). Es ließ sich zeigen, dass nach Vorelektrophorese mit einem Thioglykolatpuffer nach DIRKSEN und CHRAMBACH (1972) eine gute Wiederfindung des Actins nach der Proteintrennung gewährleistet ist. Die Vorelektrophorese ist erforderlich, um restliche Bisacrylmonomere und das als Polymerisationskatalysator eingesetzte Ammoniumperoxodisulfat (APS) im Gel zu entfernen, die die Bestimmung des 3-MH stören.

Durch nachfolgende Hydrolyse der direkt aus dem Gel ausgeschnittenen Actinzone wurde nach Derivatisierung mit Fluorescamin das freigesetzte 3-MH mittels HPLC und anschließender Fluoreszenzdetektion sehr spezifisch bestimmt (JONES *et al.* 1982).

Mit dieser Methode wurden Kochschinken aus dem Technikum der Bundesanstalt untersucht. Die über die Differenz aus Gesamt- und Bindegewebeisweiß ermittelten BEFFE-Gehalte dieser Proben variierten in einem Bereich von 17,2-23,3 %. Die 3-MH-Bestimmungen in diesen Produkten ergaben einen Gehalt an actingebundenem 3-MH von  $0,39 \pm 0,02$  mg/g BEFFE.

Die Gehalte an Actin-3-MH zeigten, bezogen auf den BEFFE-Gehalt, trotz der recht aufwändigen Analytik eine geringere

Schwankung als die des gesamten proteingebundenen 3-Methylhistidin (Abb. 3). Die größeren Schwankungen lassen sich wie bereits beschrieben auf die stark variierenden Gehalte an 3-MH im Myosin zurückführen. Dagegen werden aufgrund des stabileren 3-MH-Gehaltes des Actin mit der hier beschriebenen Methode deutlich zuverlässigere Werte für eine Berechnung des BEFFE erreicht. Abbildung 4 zeigt, dass eine enge Beziehung zwischen den gefundenen Actin-3-MH- und den auf herkömmliche Weise bestimmten BEFFE-Werten besteht ( $R=0,9161$ ).

In Versuchen an Modellproben mit unterschiedlichen Zusätzen an Erbsenprotein konnte bereits eine Zugabe von 3,2 % bezogen auf das Gesamteiweiß - das entspricht einem Zusatz von 0,7 % Erbseneiweiß zum Produkt - mit signifikanter Sicherheit erkannt werden.

Wie die Ergebnisse dieser ersten Versuche belegen, bietet die hier beschriebene Methode die Chance, den Fleischgehalt von Kochschinken über dessen 3-MH-Gehalt im Actin unabhängig von möglichen Zusätzen stickstoffhaltiger Substanzen relativ genau zu erfassen. Somit erscheint die direkte Bestimmung des Fleischgehaltes mit dieser Methode möglich. Allerdings werden noch weitere Proben zu untersuchen sein, um zuverlässigere Aussagen über den Actin-3-MH-Gehalt im Kochschinken machen zu können.

### Danksagung

Die Untersuchungen wurden durch die H. Wilhelm Schaumann Stiftung gefördert. Dafür sei vielmals gedankt.

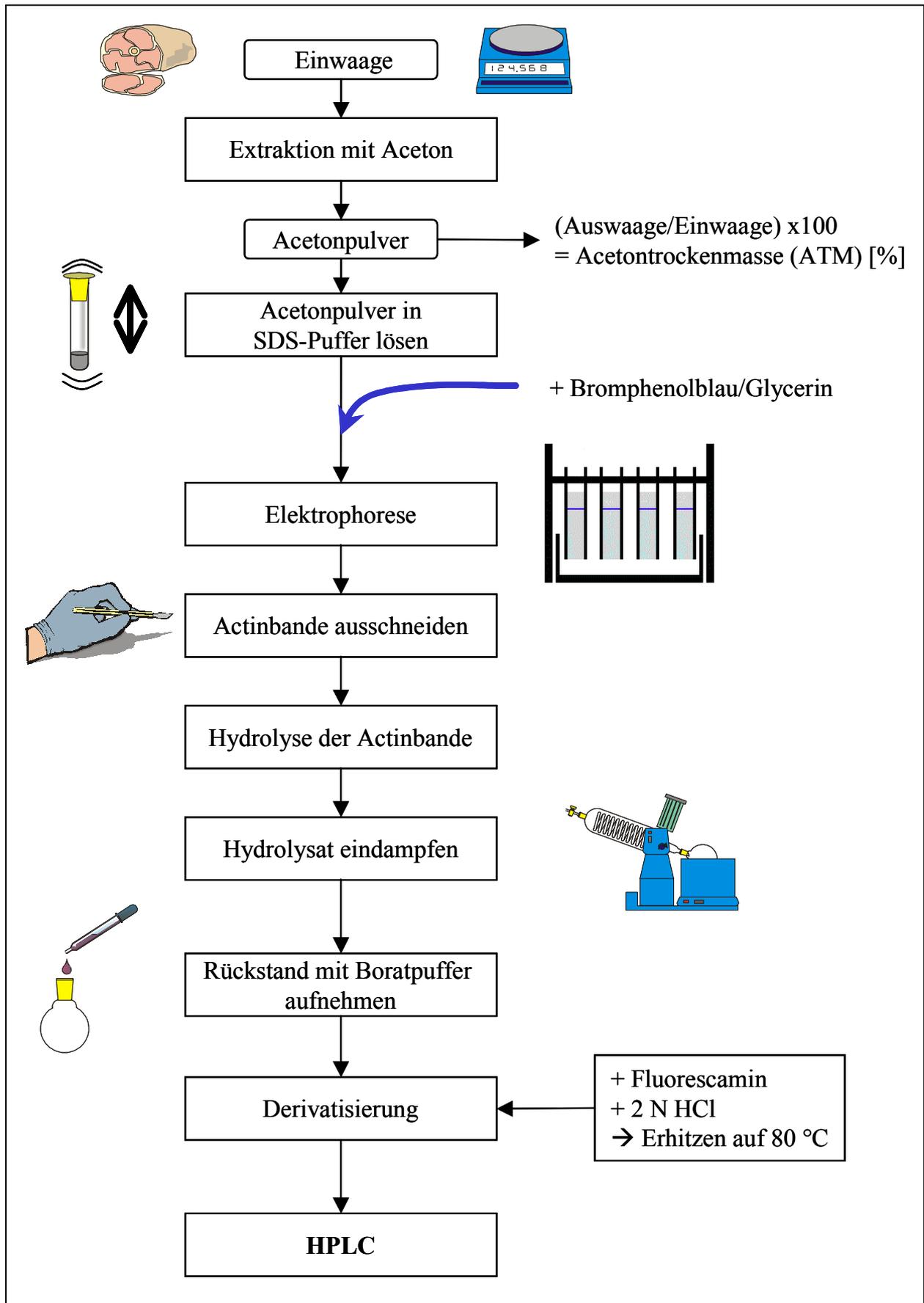


Abb. 2: Schematische Darstellung der Methode zur Bestimmung des Actin-3-MH

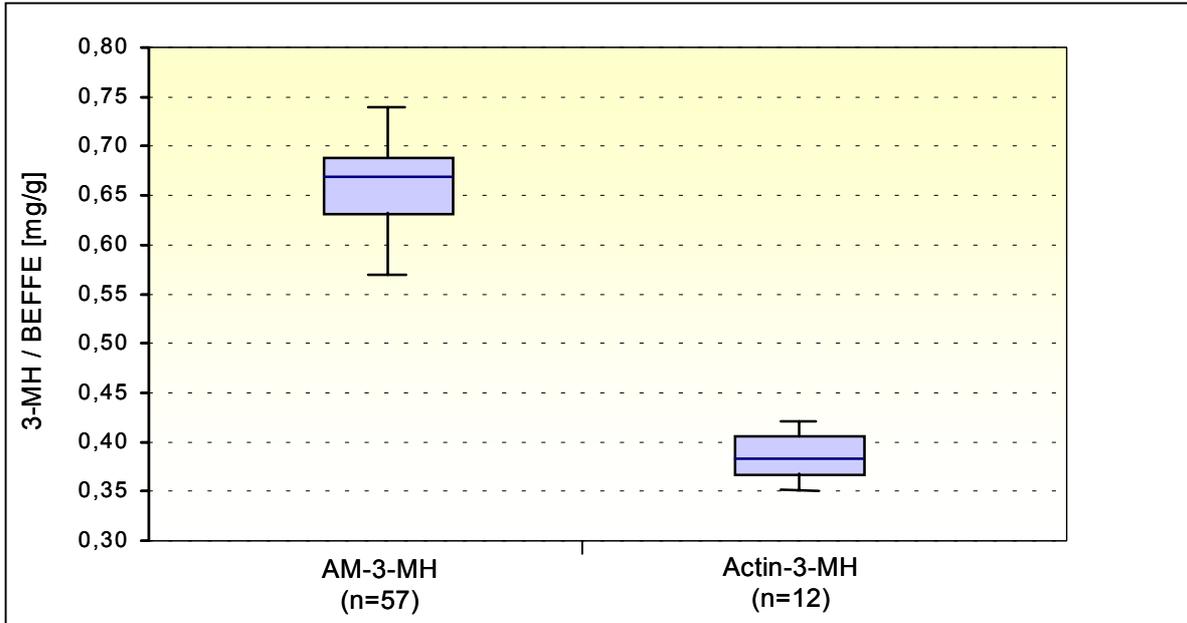


Abb. 3: Vergleich der Verteilungen der ermittelten Werte an 3-MH bezogen auf den BEFFE-Gehalt von n Kochschinken für das gesamte proteingebundene 3-MH (AM-3-MH) (ARNETH unveröff.) und Actin-3-MH in BOX-WHISKER-Plot-Darstellung.: Kasten = Interquartildistanz = mittleren 50 % der Verteilung, Mittlere Querlinie = Median, Obere und untere Querlinie = Spannweite

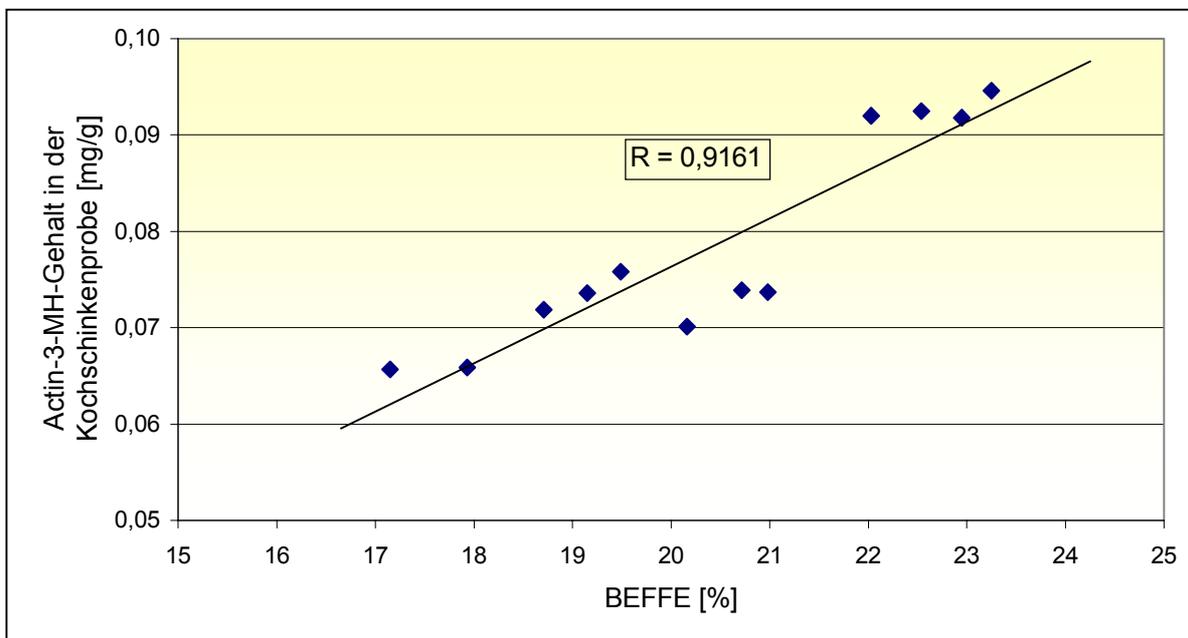


Abb. 4: Beziehung zwischen den Actin-3-MH-Werten in Kochschinken und deren BEFFE-Gehalten

## Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Band 1/2, Beuth-Verlag, Berlin

ARNETH, W. (1997): Untersuchungen zur Bestimmung des BEFFE-Gehaltes über eine 3-Methylhistidinanalyse. Deutsche Veterinärmed. Gesellschaft; Arbeitstagung des Arbeitsgebiets „Lebensmittelhygiene“ in Garmisch-Partenkirchen, S. 178-185

ARNETH, W. (1999): Über Untersuchungen zur Eignung des 3-Methylhistidin-gehaltes als Index für die Bestimmung des Muskelfleischanteils von Fleischerzeugnissen. *Lebensmittelchemie* 53, 111

DE WREEDE I., H. STEGEMANN und H.H. HEINERT (1982): Proteine in Brühwurst. Löslichkeit und elektrophoretische Bewertung. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 174, 366-373

DIRKSEN, M. L. und A. CHRAMBACH (1972): Studies on the redox state in polyacrylamide gels. *Separation Science* 7, 747-772

HIBBERT, I. and R.A. LAWRIE (1972): Technical note: The identification of meat in food products. *Journal of Food Technology* 7, 333-335

JONES, D., D. SHORLEY and C. HITCHCOCK (1982): The fluorimetric determination of 3-methylhistidine in meat and meat products. *Journal of Science of Food and Agriculture* 33, 667-685

STEINERT, Karin (1998): 3-Methylhistidinbestimmung in Fleisch und Fleischerzeugnissen - Untersuchungen zur direkten Erfassung des Muskelfleischanteils. Diplomarbeit an der Technischen Universität Dresden