ZESZYTY PROBLEMOWE
POSTĘPÓW NAUK ROLNICZYCH
Zeszyt 53 1965

METODA BIOCHEMICZNEGO OZNACZANIA ŚWIEŻOŚCI I STANU ZEPSUCIA PRODUKTÓW SPOŻYWCZYCH. INDEKS CHOLINOWY

K. MONIKOWSKI, W. LASOTA

Zakład Nauki o Środkach Spożywczych Akademii Medycznej, Łódź

Pochodne choliny występują w tkankach produktów spożywczych pochodzenia zwierzęcego lub roślinnego w postaci glicerofosfatydów bądź sfingolipidów i innych związków organicznych. Związkom cholinowym towarzyszą liczne enzymy zdolne do hydrolizy estrów cholinowych z uwolnieniem choliny wolnej. Do tego rodzaju enzymów zaliczamy fosfolipazy A i B odszczepiające od cząsteczki lecytyny kwasy tłuszczowe w pozycji α i β. Fosfolipaza C przekształca lecytynę do dwuglicerydu i fosfocholiny nie odszczepiając choliny wolnej podobnie jak fosfolipaza A i B. Fosfolipaza D (tak zwana esteraza glicerofosfatydylocholinowa) uwalnia cholinę z połączenia glicerofosfatydylocholiny, tworząc cholinę wolną i kwas fosforowy (6).

Prace dotyczące biochemii lecytynaz i cholinoesteraz w produktach stanowią dorobek wielu badaczy jak Hanahan i Chaikoff, Acker, Hadorn i Jungkunz i innych (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10). Najwięcej prac poświęcono metodyce oznaczania choliny wolnej obok choliny związanej. Wymienić tu należy metody wagowe z reineckanem choliny (8), metody kolorymetryczne (15) i metody miareczkowe (16).

Wybór najwłaściwszej metody był przedmiotem długoletnich badań i jest obszernie omówiony w piśmiennictwie. Po sprawdzeniu, że metoda (nadjodowa) Romana (16) w zastosowaniu do małych ilości choliny, od 0,32—2,8 mg w próbie, jest najbardziej dokładna, podczas gdy metoda wagowa z reineckanem amonu spełnia te warunki przy stężeniach powyżej 10 mg. Powyższe zgodne jest ze stwierdzoną większą strącalnością choliny nadjodowej (w stężeniu 10^{-6}) niż reineckan u choliny (w stężeniu 10^{-5}) (17).

Do badań indeksu cholinowego zastosowaliśmy metodę miareczkową Romana (10, 11).

Indeks cholinowy

W oparciu o stwierdzenie, że w wyniku biochemicznych procesów zależnie od czasu i temperatury w produktach spożywczych zawartość choliny wolnej stale wzrasta, a zawartość choliny związanej zmniejsza się postanowiliśmy zbadać jak układa się stosunek choliny wolnej i związanej w procesach przechowywania produktu spożywczego w temperaturze w granicach 0°, +5°, +20°, w warunkach od pełnej świeżości, aż do jej zaniku. Ponadto zbadaliśmy te stosunki dla kilku przykładów związanych z procesami fermentacyjnymi. Pojęcie indeksu cholinowego stanowi stosunek choliny wolnej w mg do choliny związanej z tym że dla względów praktycznych i możliwości ujęcia graficznego liczb małych stosunek ten jest pomnożony przez 100.

W oparciu o wzrost choliny wolnej i wzrost indeksu cholinowego można sprawdzać stan świeżości produktu w zależności od temperatury, czasu i warunków magazynowania. Liczne prace wykonane w Zakładzie Bromatologii Akademii Medycznej w Łodzi (13, 14) potwierdzają słuszność przytoczonych założeń indeksu cholinowego i pozwalają ocenić świeżość tego produktu.

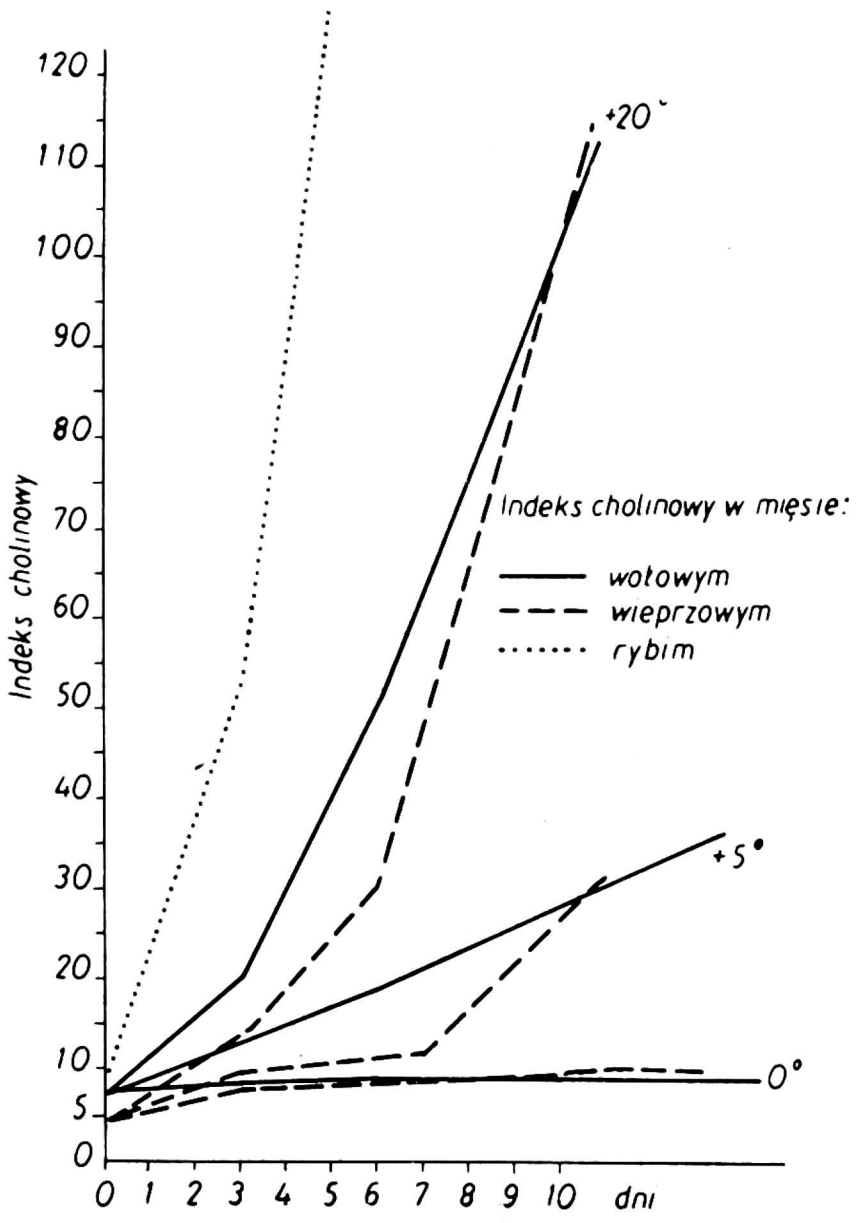
W toku tych prac przebadano mięso wołowe, wieprzowe, rybie, grzyby pieczarki, kilka jarzyn: szczaw i szpinak, groch, fasolę suchą oraz konserwowaną. Zbadano także wartość indeksu cholinowego dla procesu dojrzewania sera tylżyckiego i kapusty kiszonej.

Ogólna metoda przygotowania materiału do badań

W celu dokładnego rozdrobnienia materiału badanego uciera się tkanki z substancjami nieorganicznymi i odwadniającymi jak ziemia okrzemkowa, piasek morski, fosforan dwusodowy suchy itp. Materiał tak przygotowany jest ekstrahowany za pomocą alkoholu metylowego w aparacie Soxhleta. Ekstrakcja trwa 12—14 godzin. Po oddzieleniu alkoholu (destylacja w próżni w temperaturze 40°) pozostałość sucha zostaje rozprowadzona wodą destylowaną i podwójną ilością alkoholu izopropylowego. Całość ogrzewa się na łaźni wodnej przez 15—20 minut. Po ostudzeniu roztwór jest 3 do 4 razy wykłócany z benzenem. W tym wypadku frakcja benzenowa zawiera cholinę związaną — lecytynę. Po oddestylowaniu benzenu pozostałość hydrolizuje się 20% HNO_3 przez 2 do 3 godzin pod chłodnicą zwrotną. Roztwór zobojętnia się NaOH i zakwasza kwasem octowym lodowatym do pH 5, następnie oznacza się zawartość choliny metodą Romana.

Frakcja wodna po ekstrakcji benzenowej służy do oznaczania choliny wolnej. Roztwór ten może zawierać zanieczyszczenia utrudniające oznaczanie choliny wolnej, należy go oczyścić drogą adsorpcji na kolumnie permutytowej. Stosowaliśmy kolumny małe o wysokości 4 cm, średnicy 1 cm wypełnione permutytem G o ziarnach 0,6—0,75 mm. Szybkość przepływu 1 ml na minutę. Eluację choliny przeprowadza się za pomocą 15% HNO_3 (4) lub 15% KNO_3.

W wyniku oznaczeń mamy dwie frakcje, benzenową i wodną reprezentujące: 1) cholinę związaną, 2) cholinę wolną.

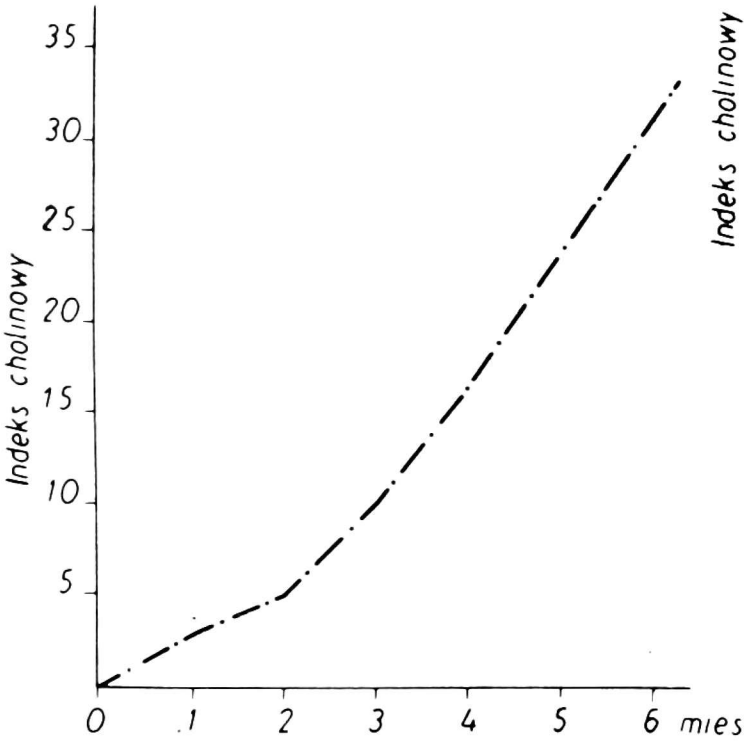


Rys. 1. Indeks cholinowy w mięsie

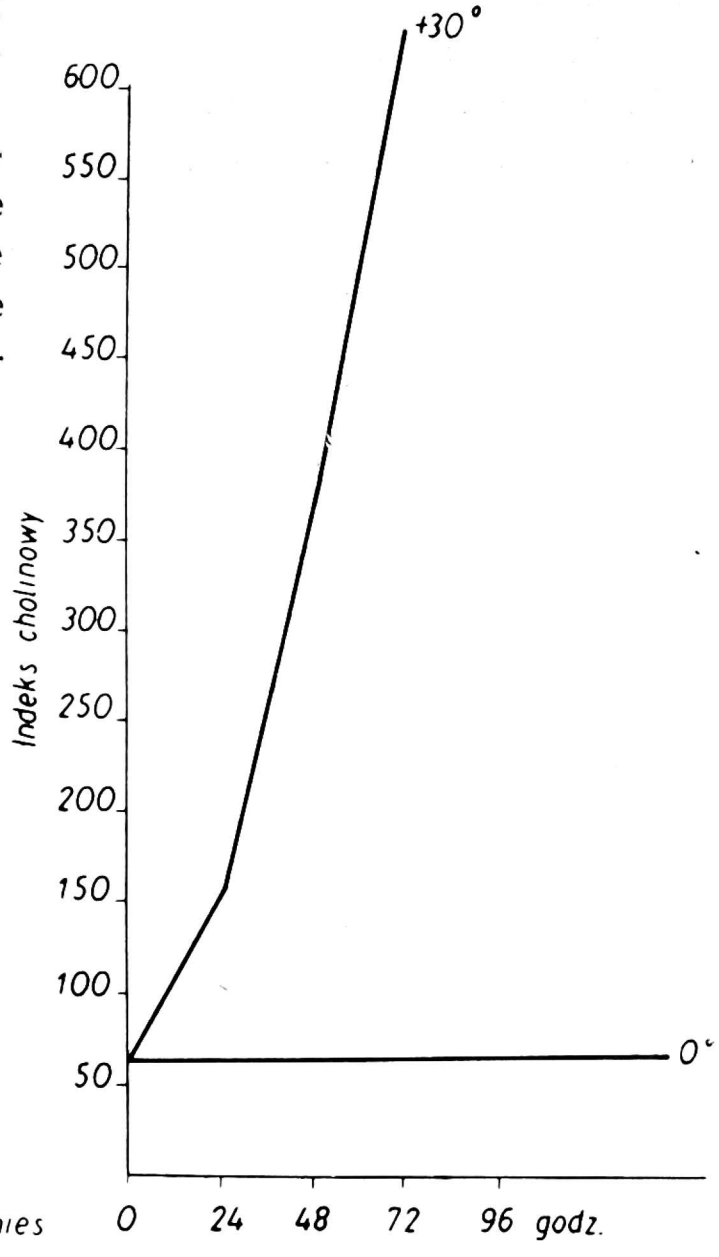
Sposób ten może być modyfikowany oznaczając cholinę ogólną po oddestylowaniu alkoholu metylowego, hydrolizuje się całość i oznacza, a w innej próbce oznacza bądź cholinę wolną, bądź też cholinę związaną. Wtedy od choliny ogólnej odejmuje się wynik choliny wolnej lub związanej i otrzymuje się szukane wartości.

Oznaczanie choliny metodą Romana polega na wytrąceniu kompleksu jodo-cholinowego za pomocą roztworu J w KJ. Kryształy jodo-choliny oddziela się drogą wirowania następnie przemywa wodą z lodu. Osad rozpuszcza się w chloroformie i miareczkuje 0,01 n tiosiarczanem sodowym w obecności skrobi. 1 ml tiosiarczanu sodowego odpowiada 0,1515 mg choliny. Wyniki oznaczeń przedstawione zostały na wykresach.

Indeks cholinowy w mięsie wołowym, wieprzowym i rybim ilustruje wykres 1. Jaja kurze przechowywane w temperaturze pokojowej w okresie 6 miesięcy wykazują indeks cholinowy od 2,83 do 30,85 (rys. 2).



Rys. 2. Indeks cholinowy w czasie przechowywania jaj w okresie 6 miesięcy



Rys. 3. Indeks cholinowy w pieczarce

Grzyby pieczarki przechowywane w temperaturze 0° przez 96 godzin mają indeks cholinowy niezmieniony, a w temperaturze 30° kształtuje się od 0,65 do 1845 (rys. 3). Dla jarzyn indeks cholinowy wynosi od 0,57—60. O ile świeże liście jarzyn są pasteryzowane w temperaturze 75° przez 15 minut zachowują swój indeks cholinowy 0.

PIŚMIENNICTWO

1. Acker L., Diemair H., Jäger: Bioch. Zt. **322**, 47 (1952).
2. Acker L., Ernst G.: Anal. Chem. **142**, 512 (1954).
3. Acker L., Luck E.: Z. L. U. *107*, 150 (1958).
4. Acker L., Jäger R.: Z. L. U. **99**, 13 (1954).
5. Acker L. Kaiser H.: Z. L. U. **110**, 349, (1959).
6. Barbieri: Fermente-Hormone-Vitamine III Aufl. 175 Stuttgard (1959).
7. Cielens E. A.: Biochimia **18**, 566 (1953).
8. Hadorn H., Jungkunz R.: Mitt. **44**, 333 (1955).
9. Hanahan, Chaikoff: J. Biol. Chem. **172**, 191 (1948) Baltimore.
10. Lasota W., Monikowski K.: Acta Pol. Pharm. **18**, 4, 325 (1961).
11. Lasota W.: Praca doktorska pt. „Układ cholina wolna cholina związana w czasie przechowywania niektórych produktów żywnościowych" wykonana w Akad. Med. w Łodzi (1961).
12. Lasota W.: Przemysł Spożywczy XVII, 9, 52 (1962).
13. Margaś M.: Praca magisterska wykonana w Akad. Med. w Łodzi (1962).
14. Nagórska M.: Praca magisterska wykonana w Akademii Medycznej w Łodzi (1962).
15. Nottbohn i Mayer Z.: L. U. **66**, 12 (1933).
16. Roman V.: Bioch. Ztsch. **219**, 218 (1933).
17. Thorpes Dictionary of Applied Chemistry t. III str. 93.

DYSKUSJA

Doc. dr Z. Charłampowicz, WSR, Poznań

Bardzo zainteresowała mnie ta piękna i ciekawa praca. Może ona mieć szczególne znaczenie dla praktyki, jeżeli indeks cholinowy jako wskaźnik zepsucia można uogólnić i przenieść na wszystkie materiały roślinne. Interesuje mnie, czy metoda ta jest wystarczająco czuła żeby można ją stosować do materiałów roślinnych, zawierających mało choliny. Byłoby to rewelacją, gdyż przemysłowi brakuje takich właśnie kontrolnych testów, które pozwoliłyby stwierdzić czy surowiec użyty do produkcji był właściwy i czy produkt był prawidłowo utrwalony. Te dane mogłyby mieć również znaczenie w procesach sądowych.

Prof. dr K. Monikowski, AM, Łódź

Sądzę, że proponowany indeks cholinowy wnosi rzeczywiście pewną nowość. Ustalenie choliny ogólnej w produktach spożywczych przeprowadzone w sposób mniej lub więcej prawidłowy, nie prowadzi do interpretacji jakościowych względem badanego produktu. Jeżeli chodzi o cholinę „wolną", czyli nie związaną z fosfolipidami, to stwierdziliśmy, że udział jej w bilansie cholinowym jest znamienny i zależny od czasu magazynowania produktu. Dotyczy to i grzybów i wszystkich produktów przechowywanych przez dłuższy okres. W literaturze dotyczącej biochemii żywności nie stwierdziliśmy zainteresowania tym zagadnieniem i powiązania efektu starzenia się, dojrzewania i psucia się produktu z narastaniem ilości choliny „wolnej". Niniejsza praca była zainicjowana i wykonana pod tym kątem widzenia.

Na Sympozjum Biochemicznym Królewskiego Towarzystwa Lekarskiego w roku 1959 („Proizwodstwo i primenenje fermentnych preparatow w piszczewoj promyszlennosti" Piszczepromizdat 1963) Hutchison zwraca uwagę na konieczność opracowania metody biochemicznej umożliwiającej ocenę procesów starzenia się i zepsucia produktów zbożowych w oparciu o enzymy lipazowe, powodujące wzrost ilości kwasów tłuszczowych. Do tego wniosku skłania go fakt, udowodniony przez wielu autorów (Houston D. F., Stark R. P., Hunter J. R., Roberts R. L., Kester E. B. i inni) korelacji między kiełkowaniem zbóż, a wzrostem kwasowości tłuszczowej w zbożach i mąkach. Sądzę, że indeks cholinowy może to zadanie lepiej spełnić, gdyż stopniowy wzrost indeksu cholinowego jest odpowiednikiem zmian biochemicznych w procesach starzenia się i dojrzewania wszelkich produktów.

W praktycznym ujęciu ilustruje to następujący przykład: jeżeli do puszki konserw mięsnych wprowadzimy mięso o określonym indeksie cholinowym i poddamy całość sterylizacji to wszystkie enzymy fosfolipidowe zostaną przez temperaturę unieruchomione i stan indeksu cholinowego pozostanie bez zmian. Jeżeli po dowolnie długim czasie konserwa zostanie otworzona, to na podstawie indeksu cholinowego można będzie stwierdzić w jakim stanie świeżości znajdowało się mięso w chwili wprowadzenia do puszki, pod warunkiem, że konserwa nie była zbombażowana lub nie uległa zepsuciu pod wpływem drobnoustrojów. Sądzę, że temat wart jest dalszego opracowywania.

Dr W. Lasota, AM, Łódź

W produktach roślinnych zawartość choliny jest bardzo niewielka i wynosi od 7 do 20 mg%. Np. w kapuście zawartość choliny ogólnej wynosi 22 mg%. Muszę przyznać, że metoda, którą stosowałam nie jest tak bardzo nowoczesna jak inne metody, np. polarograficzne, chromatograficzne itd. Jest to metoda miareczkowa, bardzo dokładna dla małych ilości choliny. Oznaczałam błąd metody w granicach od 0,16 do 1 mg w próbie i uzyskiwałam wyniki bardzo dobre i powtarzalne. Metoda Reineckanowa — kolorymetryczna spełnia te warunki przy wyższych stężeniach w granicach od 2 do 4 mg w próbie. Praktycznie tą metodą mogłam oznaczyć niewielkie ilości choliny znajdujące się w roślinach. Ciekawą obserwację zanotowano przy badaniu fasoli. Oznaczaliśmy zawartość choliny wolnej i związanej w fasoli zielonej przeznaczonej do produkcji konserw i stwierdziliśmy, że zawartość choliny zmienia się w czasie wegetacji. Zupełnia inaczej przedstawiała się zawartość choliny wolnej i związanej w dojrzałej fasoli tj. suchej. Te same zmiany zaobserwowano przy badaniu grochu.