

Sixth Meeting of Meat Research Institutes  
Utrecht: August 29th - September 3rd 1960

51

### Ein Verfahren zum Nachweis der Proteolyse im Fleisch

Von M.S. Pohja, F. Rigler und F.P. Niinivaara  
Forschungsanstalt der genossenschaftlichen Schlachthöfe,  
Hämeenlinna, Finnland.

Beim Untersuchen der proteolytischen Eigenschaften der Bakterien führt man üblicherweise die Gelatineverflüssigungs- und Kaseinhydrolyseversuche aus. Der Gelatineverflüssigungsversuch wird allgemein beim Identifizieren von Bakterien verschiedener Arten herangezogen. Die Kaseinhydrolyse, bei der als Nährboden ein Kalziumkaseinat-Peptonsubstrat dient (DEMETER: Bakteriologische Untersuchungsmethoden von Milch, Milcherzeugnissen, Molkereihilfsstoffen und Versandmaterial, S. 48, 1943; KRAUS: Archiv für Lebensmittelhygiene 11, 33, 1960), eignet sich insbesondere für Molkereibakterien. Dagegen kann man beim Studium der in Fleisch und Fleischerzeugnissen vorkommenden, das Fleisch proteolysierenden Bakterien nicht Kaseinat- und Gelatinesubstrate benutzen, weil die Zusammensetzung des Eiweisses dieser Substrate verschieden ist als die des Fleischeiweisses. Versuche mit letztgenanntem zeigen zwar an, ob der vorliegende Bakterienstamm proteolytische Eigenschaften besitzt, aber die eventuelle Feststellung, dass der Stamm Kasein hydrolysiert, ist kein Beweis dafür, dass er auch die Eiweisstoffe des Fleisches abbauen würde. Ueberdies kann man an Hand der Kaseinhydrolyse nicht feststellen, ob der untersuchte Stamm auch die schwerlöslichsten oder etwa nur die leichtlöslichen Eiweisstoffe des Fleisches angreift.

Mit Rücksicht auf die obenerwähnten Umstände haben wir einen Nährboden ausgearbeitet, dessen Anwendung eine leichte Feststellung der fleischproteolytischen Eigenschaften von Bakterien gestattet. Nach der im folgenden dargestellten Methode, die wir Hydrolysezonenverfahren genannt haben, kann man die Bakterien mit starkem proteolytischem Einfluss auf das Fleisch nachweisen, die also auch die schwerlöslichsten Eiweisstoffe desselben abbauen. Falls der

./.

Man vereinigt aseptisch 45 ml geschmolzenen Agar, 45 ml Puffer-  
untersuchte Stamm Fleisch nicht so kräftig proteolysiert, so be-  
steht die Möglichkeit, dass er immerhin imstande ist, die leicht-  
löslichen Eiweisstoffe des Fleisches abzubauen. Zum Nachweis  
dieser Eigenschaft kann man sich der sog. Ninhydrinmethode be-  
dienen.

### Züchtung

#### I Das HYDROLYSEZONEN-Verfahren

Das Verfahren basiert darauf, dass ein aus Fleisch hergestellter  
fester Nährboden, der anfangs trüb und undurchsichtig ist, in-  
folge der Wirkung der diese Eiweisstoffe abbauenden Bakterien  
durchsichtig wird. Um die Bakterienkolonie bildet sich dabei  
eine klare Zone herum. Je grösser der Durchmesser der Zone,  
umso stärker ist die fleischeiweis-abbauende Wirkung des Bak-  
terienstammes.

#### Herstellung des Nährbodens

Fleischsuspension: 20 g Fleisch, das höchstens 2-3 Tage in Kühl-  
raum gehangen hat (dem Inneren eines Fleischstücks möglichst  
steril entnommen) und 80 ml sterilisierte physiologische Koch-  
salzlösung werden homogenisiert (Bühler Homogenisator, Tübingen).  
Die homogenisierte Fleischsuspension wird 10 Minuten bei 80°C  
pasteurisiert und erneut aseptisch homogenisiert.

Agar-Substrat: 30 g Agar werden abgewogen und mit Leitungswasser  
auf 1000 ml ergänzt. Die geschmolzene Lösung wird in Gaben zu  
je 45 ml auf 100 ml-Erlenmeyerflaschen verteilt. Die Flaschen  
werden 20 Minuten bei 120°C sterilisiert.

Phosphatpuffer- und Mineralsubstrat: Es werden abgewogen: 0,3 g  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,65 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 g  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0,1 g Pyridoxin, 0,001 g  
 $\text{FeCl}_3$  und 0,05 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; die Substanzen werden in Leitungs-  
wasser zu 45 ml gelöst. Die erhaltene Lösung wird mit Hilfe  
eines Membranfilters (50 mm Durchm., Nr. 6, Membranfilter-  
gesellschaft, Göttingen) sterilisiert.

Man vereinigt aseptisch 45 ml geschmolzenen Agar, 45 ml Puffer-Mineralldösung und 10 ml Fleischsuspension. Infolge der K- und Na-Phosphate stellt sich der pH-Wert des so bereiteten Nährbodens auf etwa pH 6,8 ein. Das Substrat wird zu einer Schicht von etwa 2 mm Stärke in Schalen vergossen.

### Züchtung

Der erstarrte Nährboden wird durch Stichimpfung mit der 24 Stunden alten Fleischbrühenkultur (Fleischextrakt 5,6 g, Hefeextrakt 3,0 g, Pepton 3,0 g, Glukose 1,0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  6 g und Leitungswasser bis 1000 ml; der pH-Wert dieser Nährlösung stellt sich infolge der K- und Na-Phosphate auf ca. pH 6,8 ein) des zu untersuchenden Stammes inokuliert. Die gleiche Schale kann mit mehreren Stämmen beschickt werden. Züchtung erfolgt bei 25°C oder 37°C. Falls der Stamm fleischeigene Eiweißstoffe abbaut, entsteht nach 2-4 Tagen um die Kolonie herum eine klare Zone, die sich deutlich von dem im übrigen trüben Nährboden abhebt (Abb. 1). Das Erscheinen einer klaren Zone ist ein Anzeichen des Abbaus selbst der schwerlöslichsten Eiweißstoffe im Fleisch.

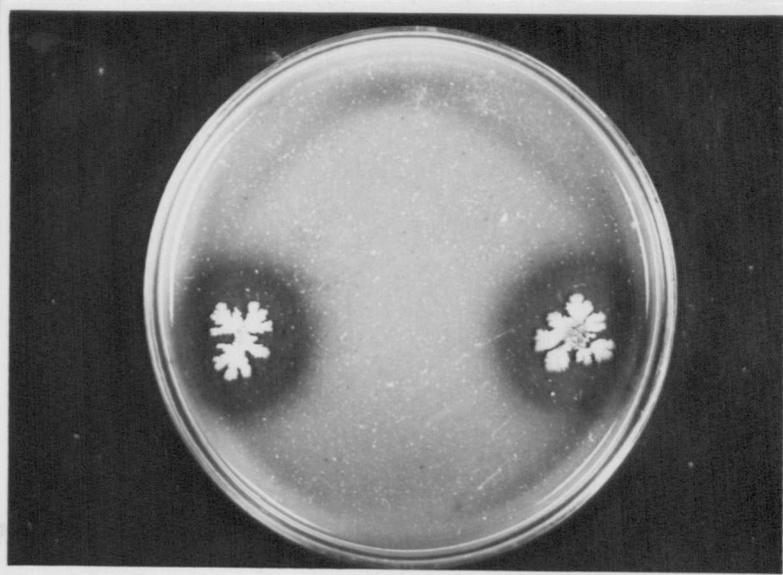


Abb. 1 Abbau der Eiweißstoffe des Fleisches unter Einwirkung eines Stammes der Gattung Bacillus. Die klare Zone um die Kolonie zeigt die erfolgte Proteolyse des Fleisches an.

## II das NINHYDRIN-Verfahren

Das Verfahren baut darauf auf, dass in einer aus Fleisch zubereiteten Nährlösung bei Anwesenheit von Bakterien, die Eiweissstoffe des Fleisches abbauen, Aminosäuren entstehen, die mit Ninhydrin eine klare Farbreaktion geben.

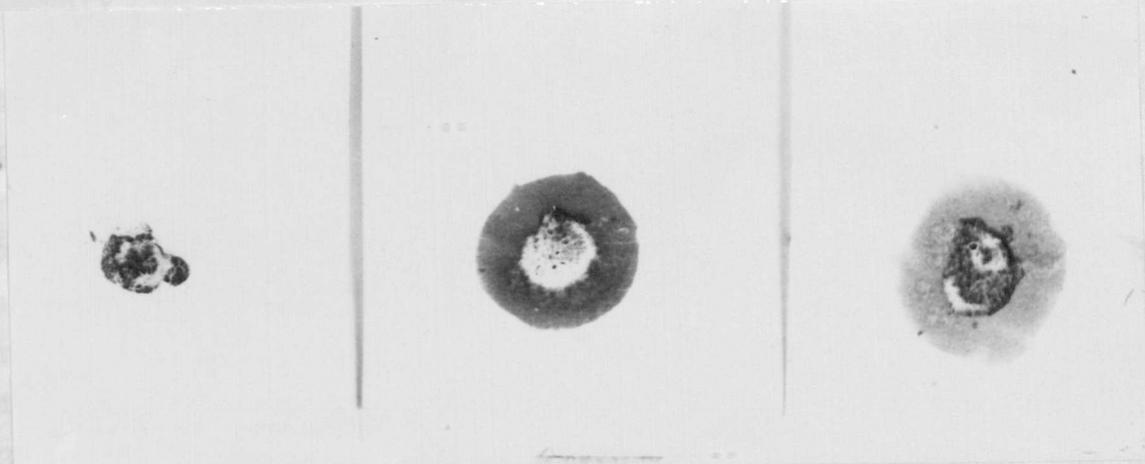
### Herstellung der Nährlösung

10 g Fleisch und 90 ml der vorerwähnten Puffer-Minerallösung mit Wasser im Verhältnis 1:1 verdünnt werden homogenisiert und wie vorbeschrieben pasteurisiert. Die Lösung wird aseptisch in Gaben von je 10 ml auf sterilisierte Reagenzröhrchen verteilt. Der pH-Wert der so erzielten Nährlösung stellt sich infolge des Phosphatpuffers auf etwa pH 6,8 ein.

### Züchtung

Der obengenannten Nährlösung wird die mit der Platinschleife erfasste Menge einer 48 Stunden alten Schrägflächenkultur (mit gleicher Zusammensetzung des Nährbodens wie in Abschnitt I, ausser das Agar in der Menge 20 g je 1000 ml zugesetzt wird) des zu untersuchenden Stammes hinzugefügt. Die Züchtung erfolgt bei 25°C bzw. 37°C. Nach 2, 4 bzw. 6 Züchtungstagen wird jeweils 1 ml der Kultur mit destilliertem Wasser auf 10 ml verdünnt. Aus der unter gleichen Umständen aufbewahrten, nicht inokulierten Nährlösung wird ebenfalls eine Verdünnung im Verhältnis 1:10 hergestellt. Die verdünnten Kulturen und die nicht inokulierte Nährlösung (Kontrolle) werden in Mengen von 50 µl auf Filtrierpapier für Chromatographie pipettiert. Nach der Trocknung der Flecke wird das Papier mit Ninhydrinlösung angefeuchtet und 10 Minuten bei 105°C getrocknet. Falls der untersuchte Stamm fleischeigene Eiweisstoffe abbaut, ist der betreffende Ninhydrinfleck viel intensiver gefärbt als der Kontrollfleck (Abb. 2).

Da die Nährlösungen im Verhältnis 1:10 verdünnt wurden, ergibt die Kontrolllösung einen äusserst schwachen Ninhydrinfleck. Die Fleischsuspension in der Reagenzröhre ist nach erfolgter Züchtung umso feinteiliger und durchsichtiger je stärker die Proteolyse war.



Kontrolle

A

B

Abb. 2 Abbau der Eiweisstoffe des Fleisches unter Einwirkung einiger Stämme der Gattung Bacillus. Die Ninhydrinflecke weisen bei den Stämmen A und B bedeutend höhere Farbtintensität als bei der Kontrolle (nicht inokuliert) auf. Dies ist als positive Reaktion zu bezeichnen.

Zusammenfassung

Das Vermögen eines Bakterienstammes Gelatine und Kasein abzubauen ist kein Beweis dafür, dass er auch die Eiweisstoffe des Fleisches abbauen würde, weil die Zusammensetzung des Eiweisses dieser Substrate verschieden ist als die des Fleischeiweisses. Aus diesem Grunde haben wir einen Nährboden ausgearbeitet, dessen Anwendung eine leichte Feststellung der fleischproteolytischen Eigenschaften von Bakterien gestattet. Nach dem Hydrolysezonen-Verfahren kann man die Bakterien mit starkem proteolytischem Einfluss auf das Fleisch nachweisen, die also auch die schwerlöslichen Eiweisstoffe desselben abbauen. Falls der untersuchte Stamm Fleisch nicht so kräftig proteolysiert, so besteht die Möglichkeit, dass er immerhin imstande ist, die leichtlöslichen Eiweisstoffe des Fleisches abzubauen. Zum Nachweis dieser Eigenschaft kann man sich der sog. Ninhydrin-Methode bedienen.

Summary

The ability of a bacteria strain to decompose gelatine and casein does not prove the fact that it should proteolyse meat too, because the protein composition of these substrata is different from that of meat. For this reason we have worked out a culture medium which makes it possible to prove the meat proteolytic properties of bacteria. According to the hydrolysis-zone-method it is possible to detect the bacteria having a strong proteolytic influence on meat and decomposing and dissolving also the non-soluble proteins of meat. If the studied strain does not proteolyse meat so strongly, it may be possible that it is still able to decompose the soluble meat proteins. For proving these properties we have developed a method where the formed amino acids can be indicated by means of ninhydrine.