

14<sup>TH</sup>EUROPEAN MEETING  
OF MEAT RESEARCH WORKERS

BRNO, CZECHOSLOVAKIA

AUGUST 26th - 31st 1968

SECTION

A 5

J. Zlámalová

Forschungsinstitut für Fleischwirtschaft, Brno

Beurteilung und Bewertung der proteolytischen Mikroflora  
in Fleischerzeugnissen

Die Unterschiedlichkeit des Rohstoffes, dessen Transport, Behandlung und vor allem die Verarbeitung für Fleischerzeugnisse, ist für die Fleischverarbeitung von grosser Bedeutung. Gleichfalls entscheidend sind die hygienischen, durch den mikrobiologischen Befund gekennzeichneten, Bedingungen. Als grosses Problem besteht die Anwesenheit der technologisch unerwünschten Mikroflora im Fleisch. In engem Zusammenhang mit diesen Fragen steht auch die Bedeutung der technologischen Verfahren, welche gewissermassen das Wachstum und die physiologischen Erscheinungen thermoresistenter Keime beeinflussen. Es handelt sich besonders um die, bei der Herstellung von Würstwaren, Halbkonserven und Vollkonserven angewendete thermische Bearbeitung. Bei der mikrobiologischen Bestimmung der Qualität von Fleischerzeugnissen steht heutzutage, anstatt der früher so oft benutzten Keimzahl, die quantitative Bestimmung der proteolytisch aktiven Keime im Vordergrund; diese Aktivität kann sich nämlich an der Haltbarkeit der Erzeugnisse sehr nachteilig auswirken.

Mit der Forschung auf dem Gebiete des Vorkommens und der Aktivität der proteolytischen Mikroflora in Fleisch und Fleischerzeugnissen hat sich bisher nur eine geringe Zahl der Forscher befaßt. Weder die enzymatische Aktivität der im Fleisch vorkommenden Keime, noch die Umstände unter welchen dieses mikrobielle Enzym aktiv wird, wurden systematisch untersucht. Der enzymatischen Tätigkeit der Keime kann man nämlich in der Fleischindustrie überall dort, wo eine Vermehrung der Keime stattfindet, begegnen.

Durch diese Arbeit wollten wir Folgendes bestimmen: die Häufigkeit des Vorkommens der proteolytischen Mikroflora im Fleisch; die Aktivität der untersuchten Keime; die in der Fleischverarbeitung angewendeten Temperaturen, welche die proteolytische Aktivität der Keime herabsetzen; die Nährböden, welche für die Bestimmung der proteolytischen Aktivität, vom Standpunkt der Haltbarkeit und der Qualität der Fleischerzeugnisse, am besten geeignet sind. Als Ergebnis sollte ein Entwurf zur Bewertung der quantitativen Befunde proteolytischer Keime in Fleischerzeugnissen, betreffend die praktische Beurteilung der Qualität und des hygienischen Niveaus des Herstellungsverfahrens, vorgelegt werden.

#### Methodik

Die Proben zur bakteriologischen Untersuchung wurden aus einer ausgelösten Schweinekeule 24 Stunden nach der Schlachtung, von den durch eine Muskelbinde gedeckten Muskeln genommen. Vor der eigentlichen Probeentnahme im Laboratorium wurde die Oberfläche der zu anschneidenden Stelle durch einen Keuter abgebrannt. Die Proben des Muskelfleisches je 1 g wurden mit 9 ml der physiologischen Lösung homogenisiert. Für die Homogenisierung wurde eine Kolbenhomogenisiermaschine angewendet. Das Homogenat wurde je 1 ml in Petrischalen pipettiert und mit Fleischpepton-Agar mit Zusatz von 1 % Laktose übergossen. Geimpfte Petrischalen wurden 1 bis 2 Tage lang bei 37 °C bebrütet.

Alle aufgewachsenen Kolonien wurden isoliert. Bei den Kulturen wurde vorerst die Morphologie bestimmt. Bei reinen Stämmen wurde ihre proteolytische Aktivität auf folgenden Nährböden untersucht: Milch-Ager, Kalzium-Caseinat-Ager, Pohja-Nährmedium mit gekochtem Fleisch, koaguliertes Eiweiss, koaguliertes Blutserum und Nährgelatine. Stämme, bei denen man aktive Proteolyse wenigstens auf einem von den genannten Nährmedien festgestellt hatte, wurden diagnostiziert.

Bei thermoresistenten, vom Schweinefleisch isolierten Stämmen hat man den Einfluss einiger, bei der Herstellung von Fleischwaren benutzter Temperaturen studiert. Das Verfahren war folgend: 24 Stunden alte Bouillon-Kulturen in Reagenzgläsern wurden einerseits 30 Minuten bei der Temperatur von 65 °C (entspricht der Pasteurisationstemperatur bei der Schinkenherstellung), anderseits 10 Minuten bei 70 °C (entspricht der Temperatur des Kochens von Fleischerzeugnissen), erwärmt.

Bei der Beurteilung von Ergebnissen dieser Modell-Versuche neben wir uns vor allem auf den Zusammenhang der Entstehung von Proteolyse mit unterschiedlichen Nährböden (damit wir das beste Nährmedium für bakteriologische Untersuchungen von pasteurisierten Export-Waren bestimmen können), weiter auf den Zusammenhang der Proteolyse nach der Wärmebearbeitung mit der Art der Mikroben und auf den Zusammenhang des Entstehens von Proteolyse bei wärmebearbeiteten Kulturen mit dem angewendeten Nährmedium, eingestellt.

### Ergebnisse

Von frischem Schweinefleisch haben wir insgesamt 68 Stämme mit positiver Proteolyse, auf mindestens einem von den genannten Nährmedien, isoliert. Von diesen Stämmen wurden 49 Stämme morphologisch als Mikrokokken, 15 Stämme als Sporenbildner und die übrigen 4 Stämme als Streptokokken bestimmt. Proteolytische Aktivität der Mikrokokken auf einzelnen Nährböden stellt das Diagramm Nr. 1 dar.

Die meisten positiven Reaktionen sind auf der Nährgelatine erschienen. Die übrigen Nährmedien wiesen unterschiedliche Reaktionen auf. Nach dem Orientierungseinreihen wiesen 17 Stämme der nichtpathogenen Staphylokokken proteolytische Aktivität in 42 % der durchgeführten Tests auf, 10 Stämme von Mikrokokken wiesen diese Aktivität in 38 % durchgeführter Tests auf. Der grösste Anteil positiver Tests erschien bei den Mikrokokkenstämmen, welche unterschiedliche Abweichungen in biochemischen Tests aufwiesen.

Diese Feststellung ist sehr bedeutsam, da bisher die Aufmerksamkeit der Mikrobiologen nur auf die Pathogenität der Staphylokokken, deren Bestimmung laut der Haemolyse auf Blutagar in der Fleischwarenherstellung sehr problematisch ist, gerichtet war; die Untersuchung der proteolytischen Aktivität von Mikroorganismen, welche bei ihrer Vermehrung hygienisch sehr schwerwiegend sein kann, wurde vollkommen unterlassen. Interessant ist auch die Tatsache, dass die proteolytische Aktivität in mehreren Tests gerade bei den Stämmen positiv war, auf welche bei der üblichen Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen nicht geachtet wurde. Demzufolge spielt auch das quantitative Bestimmen der saprophytischen Mikroflora vom Standpunkt der Haltbarkeit von Halbkonserven eine wichtige Rolle. Da es also mit einer beträchtlichen enzymatischen Aktivität der Mikrokokken zu rechnen ist, müssen alle Massnahmen zur Vermeidung einer wesentlichen Vermehrung dieser Mikroflora während der technologischen Verarbeitung des Fleisches eingehalten werden.

Der Nachweis von Proteolyse an den angewendeten Nährböden war sehr unterschiedlich nicht nur laut den verschiedenen Stämmen, sondern auch laut ihrer Population. Es war ganz üblich, dass bei einem Versuch ein gewisser Stamm die Proteolyse, z.B. auf zwei unterschiedlichen Nährmedien gebildet hat und bei einem anderen Versuch war derselbe Stamm proteolytisch auf drei Nährböden. Allgemein wird angegeben, dass der Milch-Agar die meisten positiven Befunde

aufweist. Unsere Ergebnisse dagegen haben die höchste Häufigkeit der Proteolyse, bewirkt durch die vom Fleisch isolierten Stämme, auf Milch-Agar nicht bewiesen. Die Häufigkeit von proteolytischen Reaktionen auf unterschiedlichen Nährböden wird durch das Diagramm Nr. 2 dargestellt.

Aus diesem Diagramm ist ersichtlich, dass man die meisten positiven Befunde auf Nährgelatine und weiter auf Kalzium-Caseinat-Agar festgestellt hat. Milch-Agar war erst an dritter Stelle.

Die zweite Gruppe thermoresistenter, vom Fleisch isolierter Mikroben, bilden die aeroben Sporenbildner. Proteolytische Aktivität der Stämme stellen die Diagramme Nr. 3 und 4 dar.

Die meisten positiven Reaktionen wurden wieder auf Nährgelatine gefunden, andere Nährböden wiesen unterschiedliche Reaktionen auf. Koaguliertes Eiweiss war immer negativ. 15 Stämme der Sporenbildner wiesen in 45 % der durchgeführten Tests eine proteolytische Aktivität auf.

Die dritte Gruppe bildeten Streptokokken. Von frischem Fleisch gelang es nur 4 Stämme zu isolieren. Alle waren proteolytisch, aber keines von ihnen attackierte koaguliertes Eiweiss. Drei Stämme wiesen auf allen anderen Nährböden Proteolyse auf, ein Stamm verflüssigte nur koaguliertes Serum und Gelatine. Die Stämme wurden als *Str. faecalis*, *Var. liquefaciens* diagnostiziert. Wenn auch alle Enterokokkenstämme nicht die Verflüssigungsfähigkeit für Gelatine besitzen, sind sie doch, wegen ihrer proteolytischen Aktivität gegenüber anderen in der Fleischverarbeitung vorkommenden Proteinsubstraten, sehr bedeutsam. Infolge einer hohen proteolytischen Aktivität der Enterokokken wird man bei bakteriologischen Untersuchungen von Exporterzeugnissen auch ihre Quantität bestimmen müssen.

Die vom frischen Fleisch isolierten Mikroben, bei denen eine proteolytische Aktivität festgestellt wurde, weisen eine

beträchtliche Hitzeresistenz auf. Es ist ganz selbstverständlich, dass bei ihrer Devitalisation das Alter der Kultur, die Menge der Zellen, das flüssige oder feste, auf Nährstoffe reiche oder arme Medium, massgebend ist. Für die Modell-Versuche haben wir für die Mikroben die optimalen Wachstums- und Lebensbedingungen gewählt.

Bei den Versuchen wurde eindeutig bewiesen, dass durch Erhitzen bei 65 °C während 30 Minuten die Mikrokokken zwar nicht zuverlässig vernichtet werden, aber ihre proteolytische Aktivität auf Milch- und Casinat-Agar wesentlich beeinflusst wird. Es ist interessant, dass die proteolytische Aktivität auf Pohja-Agar bei der Erhitzung der Kultur unverändert blieb.

Die Temperatur von 70 °C hat zwar die Mikrokokken auch nicht ganz vernichtet, aber ihre proteolytische Aktivität wurde an allen benutzten Nährböden gänzlich eingeschränkt. Dieser Versuch ist ein weiterer Beweis für die Tatsache, dass es durch Wärmebearbeitung zu Änderungen der biochemischen Eigenschaften der Mikrokokken kommt.

Eindeutig wurde bewiesen, dass durch die Temperatur von 65 °C, bei einer Dauer von 30 Minuten, die proteolytische Aktivität der Sporenbildner nicht beeinflusst wird. Zum Beeinflussen der Aktivität kam es erst nach einer Erhitzung der Kulturen auf 70 °C während 10 Minuten. Am meisten eingeschränkt wurde die Bildung der proteolytischen Zone auf Pohja-Agar, weiter in demselben Ausmass auf Milch- und Kalzium-Caseinat-Agar, am wenigsten auf koaguliertem Eiweiss und Serum. Gelatine wurde auch nach Erhitzung der Stämme immer verflüssigt.

Die proteolytische Aktivität der Enterokokken wurde weder bei 65 °C, noch bei 70 °C vermindert. Feste der proteolytischen Aktivität auf unterschiedlichen Nährböden blieben in Übereinstimmung mit den Testen der nichterhitzten Bouillon-Kulturen.

Den Einfluss des Erhitzens auf die proteolytische Aktivität der aus Fleisch isolierten Stämme im Zusammenhang mit der Reaktion auf benutzten Nährböden stellt das Diagramm Nr. dar.

### Schlussfolgerungen

Vom frischen Schweinefleisch wurden Mikrokokken meistens mit proteolytischer Aktivität isoliert. Es wurde ein Zusammenhang zwischen der Proteolyse der Stämme und deren biochemischen Eigenschaften gefunden. Bei Vergleichsversuchen mit der Bestimmung proteolytischer vom Fleisch isolierter Keime auf mehreren Nährböden wurde festgestellt, dass die proteolytische Aktivität der Mikrokokken sich am häufigsten auf Kalzium-Caseinat-Agar, am seltensten auf Pohja Nährmedium erwies. Dagegen Mikrokokken, die einige Abweichungen in biochemischen Testen aufwiesen, wurden immer aktiv auf allen Nährböden, mit Ausnahme von koaguliertem Eiweiss, wo die Reaktionen unterschiedlich waren. Keine vom Fleisch isolierten Sporenbildner attackierten Eiweiss, aber alle Stämme verflüssigten Gelatine. Auf anderen Nährböden waren die Reaktionen verschieden.

Die Enterokokken haben immer koaguliertes Serum verflüssigt, aber koaguliertes Eiweiss haben sie nicht attackiert. Auf anderen Nährböden war die Aktivität nicht eindeutig.

Aus betreffenden Versuchen ergibt sich die Tatsache, dass die proteolytische Aktivität der vom Fleisch isolierten Keime laut Population und Nährmedium geändert wird. Durch die bei der Pasteurisation von Halbkonserven angewendete Wärmebearbeitung und durch das Kochen von Fleischerzeugnissen kam es bei den untersuchten Keimen nicht zu Devitalisation. Die Bildung von proteolytischem Enzym wurde durch Pasteurisationstemperaturen nicht unterdrückt, aber teilweise wurde sie durch die beim Kochen von Fleischerzeugnissen angewendete Temperatur beeinflusst. Bei den die Wärmebearbeitung überlebenden Mikrokokken wurde fest-

Gestellt, dass die Pasteurisationstemperatur die proteolytische Aktivität auf Milch- und Kalzium-Casein-Agar unterdrückte, aber gewöhnlich kam diese zur Geltung auf koaguliertem Serum und Gelatine.

Aus durchgeführten Versuchen ergab sich die Tatsache, dass die Untersuchung der proteolytischen Aktivität in der Fleischverarbeitung eine grosse technologische Bedeutung hat, die in indirektem Zusammenhang mit der hygienischen Bedeutung, betreffend das Einhalten technologischer Verfahren bei der Wärmebearbeitung, ist.



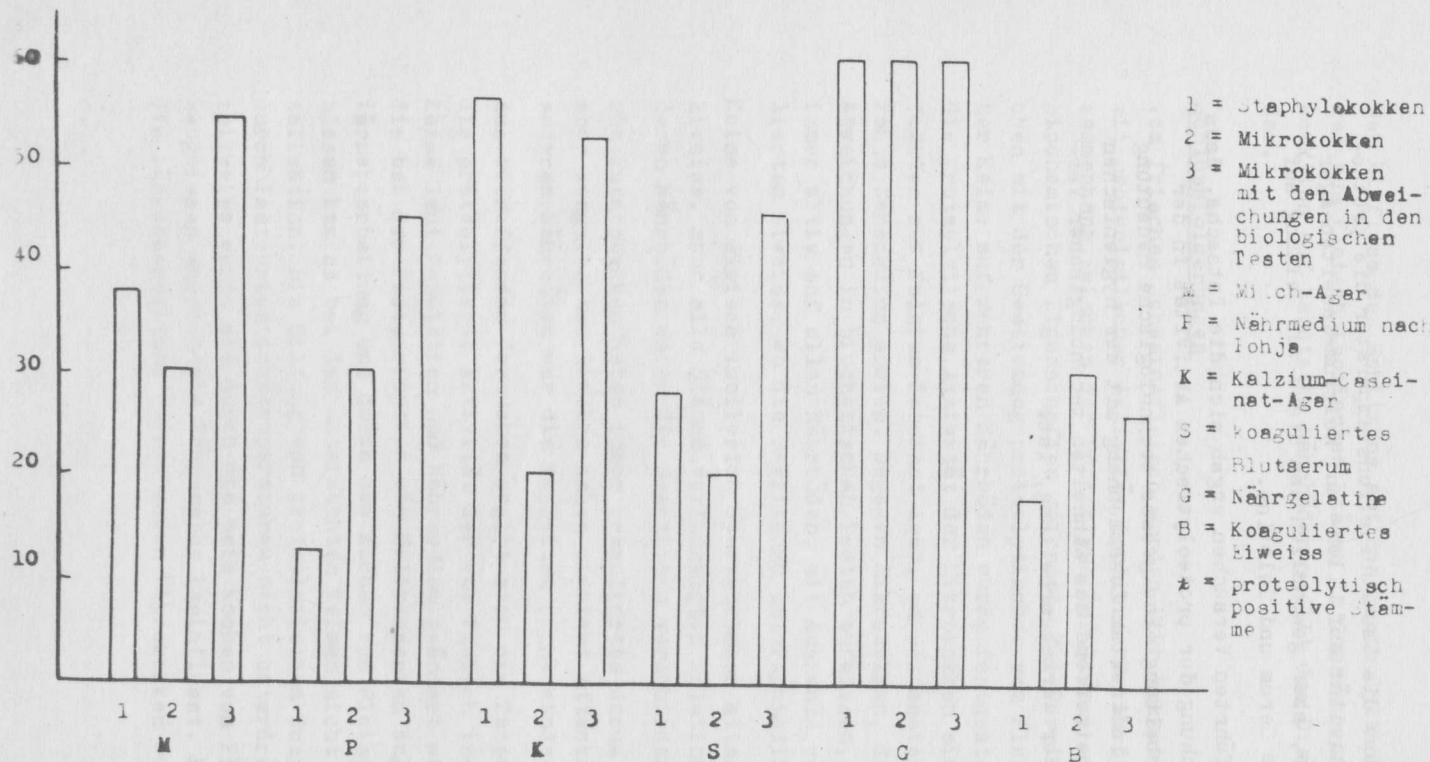


Diagramm Nr. 1

Proteolytische Aktivität der Mikrokokken auf einzelnen Nährböden

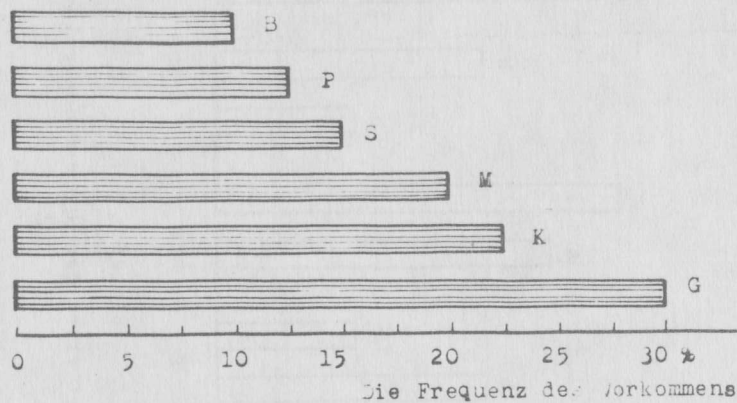


Diagramm Nr. 2

Die Frequenz der proteolytischen Reaktionen auf verschiedenen Nährböden

B, P, S, M, K, G = s. Diagramm Nr. 1

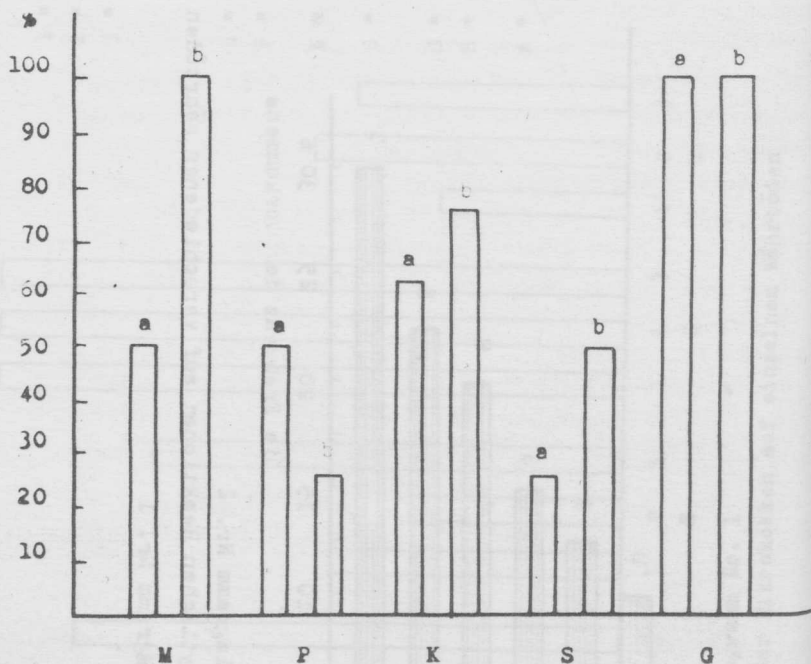


Diagramm Nr. 3

Proteolytische Aktivität der Sporenbildner in verschiedenen Nährmedien

% = Prozent der proteolytisch positiven Reaktionen

M, P, K, S, G - s. Diagramm Nr. 1

a = *Bac. brevis*

b = *Bac. polymyxa*

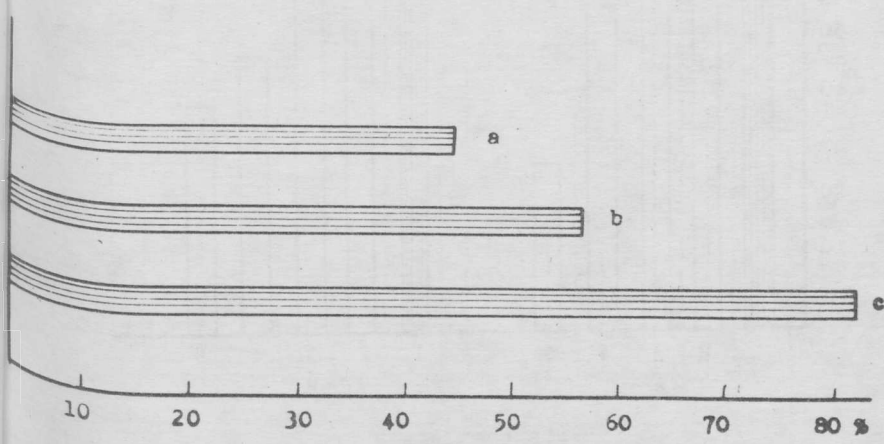


Diagramm Nr. 4

Proteolytische Gesamtaktivität der Sporenbildner

- a = *Bac. brevis*
- b = *Bac. pelymyxa*
- c = andere Sporenbildner
- % = positive Befunde auf den Nährböden

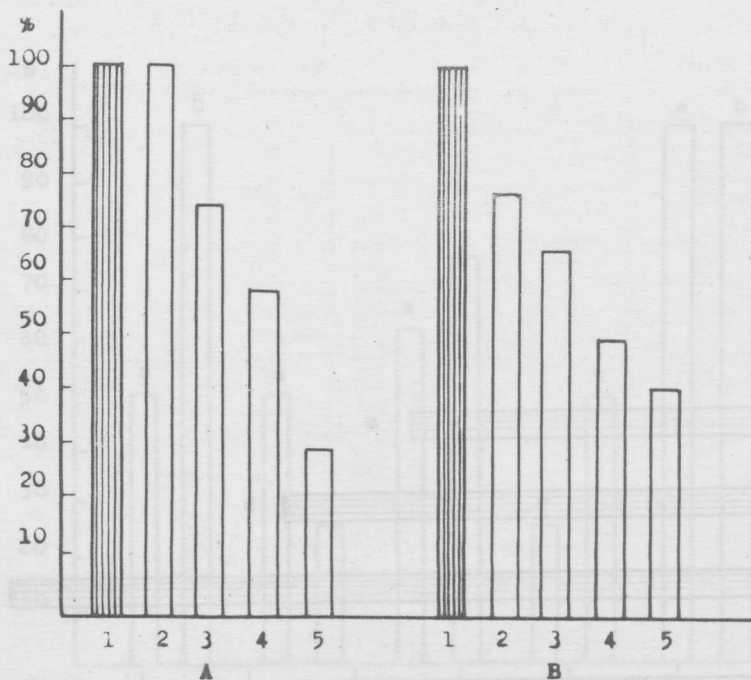


Diagramm Nr. 5

Hemmung der proteolytischen Aktivität durch die Erhitzung der von Fleisch isolierten Stämme, auf den benützten Nährböden

A = Sporebildner; B = Mikrokokken

1 = unerhitzte Bouillon-Kultur (proteolytische Aktivität = 100)

2 = Aktivität nach der Erhitzung 65°/15 Min.

3 = " " " 65°/30 Min.

4 = " " " 70°/ 5 Min.

5 = " " " 70°/10 Min.