

14THEUROPEAN MEETING
OF MEAT RESEARCH WORKERS

BRNO, CZECHOSLOVAKIA

AUGUST 26th - 31st 1968

SECTION

C 11

G. Reuter und H.J. Langner

Institut für Lebensmittelhygiene der Freien Universität
Berlin

(Direktor: Prof. Dr. H. J. Sinell)

Anreicherung freier Aminosäuren in Fleischsuspensionen
durch Mikroorganismen

In früheren Untersuchungen (REUTER, LANGNER, SINELL, 1967/68) war ermittelt worden, dass im Verlauf der Rohwurstreifung zwischen der Anreicherung freier Aminosäuren und der Entwicklung der Mikroflora Zusammenhänge zu bestehen scheinen. Nach den weiteren Feststellungen, dass Reinkulturen von Mikroorganismen in flüssigem Kulturmedium aus Caseinabbau-stufen Aminosäuren freisetzen können, je nach Gruppe und Art der Mikroorganismen unterschiedliche Spektren und Mengen, war es angezeigt, das Verhalten derartiger Mikroorganismen auch im natürlichen Substrat Fleisch zu verfolgen.

Die besonderen Schwierigkeiten bestanden darin, dass es kaum möglich schien, ein keimfreies natives Fleischsubstrat her-zustellen, das für die Überprüfung des biochemischen Verhal- tens von Reinkulturen vorausgesetzt werden muss. Es war er- forderlich, das Fleisch weitgehend zu zerkleinern und zu einer möglichst homogenen Suspension zu verarbeiten. Dabei wurde jedoch die meist vorhandene latente Fleischeigenflora

ebenso gründlich verteilt. Auch Kontaminationen während der Herstellung dieser Suspensionen waren nicht ganz auszuschliessen. Trotz massiver Beimpfung mit Reinkulturen konnten sich bei einer Inkubierung der Fleischhomogenisate Anteile der latenten Fleischeigenflora, insbesondere Fäulniskeime, entwickeln und die Versuchsdurchführung stören. Nach etlichen Vor- und Wachstumsversuchen von Mikroorganismen in Fleischsuspensionen liessen sich jedoch brauchbare Wege beschreiten.

Material und Methodik

Analog zu der Zusammensetzung des Fleischenteiles in der früher untersuchten Rohwurst wurde als Untersuchungsmaterial Rind- und Schweinefleisch im Verhältnis 5 : 1 gemischt, nachdem es vorher unter sterilen Kautelen aus dem Inneren von grossen zusammenhängenden Fleischstücken entnommen und in der Ika-Mühle mit Kohlensäureeis zerkleinert worden war. Zu dieser Fleischmischung wurde im Verhältnis 1 : 1 sterile phys. NaCl-Lösung zugegeben. Das Ganze wurde daraufhin noch einmal mit dem Ultra-Turrex durchmischt und für die einzelnen Fragestellungen verschieden weiterbehandelt. Unbebrütete und zu bebrütende Kontrollen wurden direkt abgenommen. Ein Teil der Fleischsuspension wurde nach Abzentrifugation der groben Bestandteile steril filtriert, nachdem sie vorher zum Zwecke des Extrahierens etwa 4 Stunden bei 2 °C aufbewahrt worden war. Das Filtrat wurde in sterile Gefässe abgefüllt und beimpft. Einem anderen Teil der Suspension wurde Sorbinsäure zugesetzt und der pH-Wert durch Zusatz von Milchsäure erniedrigt, um die sorbinsäureempfindliche Fleischeigenflora zu hemmen und die zu prüfenden Laktobezillenstämme ungehindert zur Entwicklung kommen zu lassen. Dabei wurden folgende Kombinationen ausprobiert: Sorbinsäure 0,04; 0,05; 0,06 % Endkonzentration, pH-Werte entsprechend 5,0; 5,2; 5,5. Der Ausgangs-pH-Wert der Fleischsuspension lag um 5,6.

Es wurden zwei getrennte Versuche durchgeführt. Beim ersten wurden 5 Stämme 3 Tage bei 30 °C jeweils in Fleischsuspension und in Fleischfiltrat bebrütet. Beim zweiten Versuch wurden 15 Stämme in Fleischsuspension 5 Tage bei 30 °C bebrütet. Beimpfung wurde mit Reinkulturen, die in flüssigem Kulturmedium angezüchtet und einmal mit phys. NaCl-Lösung gewaschen worden waren. Die Dichte der Keimaufschwemmung wurde mit einem BaSO₄-Standard eingestellt. Die Keimkonzentration betrug nach der Beimpfung zwischen 10⁸ und 10⁹ Bakterien/g Untersuchungsmaterial. Dies entspricht den Keimkonzentrationen bei der Rohwurstreifung nach 2 bis 3 Tagen.

Folgende Stämme wurden geprüft; die alle entweder aus Rohwurst isoliert worden waren oder für die Verärberung in Rohwürsten vorgesehen sind:

Versuch 1: 3 St. atypische Streptobakterien verschiedener Typen (homofermentative mesophile Laktobazillen, die in reifender Rohwurst dominieren); 1 Stamm *L. brevis* (heterofermentativer *Lactobacillus*, der am Ende der Rohwurstreifung zahlenmässig ins Gewicht fällt); 1 St. *Pediococcus cerevisiae* (Keim der amerikanischen Starterkultur Accel).

Versuch 2: 1 St. *L. plantarum*, 2 St. *L. nov. spec.* aus Rohwurst. Beide Arten gehören zum Subgenus *Streptobacterium* und treten neben *L. brevis* während der Rohwurstreifung zwar nicht in dominierenden, doch in Mengen von 10⁵⁻⁶/g auf; 5 St. atypischer Streptobakterien verschiedener weiterer Typen; 3 St. heterofermentative Laktobazillen (Subgenus *Betabacterium*, *L. brevis* und *L. viridescens*); 1 St. *Leuconostoc mesenteroides*; 1 St. *Pediococcus*; 1 St. *Streptococcus faecalis*; 2 St. Mikrokokken; 1 St. *St. aureus* (Diese Stämme wurden alle aus Rohwurst isoliert, mit Ausnahme von *Mc. "Bactofermente"*, der als Starterkultur in Deutschland vertrieben wird). *Enterobacteriaceen* waren ursprünglich nicht vorgesehen. Sie ent-

wickelten sich in der Kontrolle mit Streptomycin und Actidione als Monokultur, des weiteren in der Originalkontrolle als dominierender Flora-Anteil.

Die Vorbehandlung der Proben für die Aminosäureanalysen wurde bei Versuch 1 durch Ausfällung der höhermolekularen Eiweissbestandteile mit absolutem Alkohol, bei Versuch 2 durch Dialyse der niedermolekularen N_2 -Bestandteile des zentrifugierten Überstandes der mit A. dest 1 : 10 verdünnten Suspensionen durchgeführt. Bei Versuch 1 wurde das durch Alkohol gefällte Eiweiss abfiltriert, das Filtrat nach Verdünnung mit Saccharose-Lösung (Endkonzentration 12,5 %) auf den Technicon-Aminosäureanalyser gegeben. Bei Versuch 2 wurde das Aussendialysat im Rotationsverdampfer auf Sirupkonsistenz eingedampft, ebenfalls verdünnt und aufgegeben.

Die Bestimmung der Aminosäuren geschah nach der Methode von MOORE und STEIN im Technicon-Auto-Analyser. Die Auswertung erfolgte nach dem von Technicon angegebenen Verfahren mit Norleucin als innerem Standard. Die ermittelten Werte wurden in mg/% umgerechnet. Als Bezugswert für Zu- oder Abnahme der freien Aminosäuren während der Bebrütung wurden die unbebrüteten Kontrollen benutzt. Als Bebrütungskontrollen wurden nicht beimpfte Proben mitgeführt.

Ergebnisse:

Von den Kontrollen blieben nur die Filtrate während der Bebrütung steril und konnten deshalb zu Aussagen über das Vorhandensein von fleischeigenen Enzymen herangezogen werden. Die Aminosäurenkonzentrationen änderten sich während einer 5-tägigen Bebrütung dabei überhaupt nicht. Bei den Kontrollen mit Sorbinsäure und pH-Wert-Erniedrigung konnten zwar die meisten Keimarten unterdrückt werden, jedoch nicht die latent vorhandenen Laktobazillen. Auch Streptomycin (Endkonzentration 100 mg/%) und Actidione (Endkonzentration 4 mg/%) vermochten nicht, die Probe steril zu halten.

Freie Aminosäuren in den Ausgangsmaterialien:

Über die Art und die Menge der in den Ausgangsmaterialien vorliegenden freien Aminosäuren gibt die erste Tabelle Auskunft. Dort ist zu ersehen, dass zwischen den beiden Versuchen und den Modifikationen (Suspension oder Filtrat) weitgehende Übereinstimmung bestand. Auch im Vergleich zum Rohwurstbrät zeigen sich auffallend gute Korrelationen.

Veränderungen durch Mikroorganismen:

Während bei den steril gebliebenen Kontrollen (Filtrate) keine Veränderungen zu erkennen war, lagen bei allen Proben, in denen entweder durch Beimpfung oder durch Entwicklung der Fleischeigenflora ein mikrobielles Wachstum zu verzeichnen war, starke Umschichtungen vor. Es handelte sich überwiegend um erhebliche Zunahmen. Eine Reihe von Aminosäuren wurde von allen geprüften Keimgruppen, das waren homo- und heterofermentative Laktobazillen, Streptokokken, Mikrokokken und Enterobacteriaceen in nahezu gleich starker Masse freigesetzt. Dazu gehörten, in der entsprechenden Rangfolge aufgeführt, Leucin, Alanin, Glutaminsäure, Phenylelanin, Lysin, Valin und Iso-Leucin. Glutaminsäure wurde dabei etwas stärker von den Laktobazillen, Lysin von den Mikrokokken und Enterobacteriaceen angereichert. Als weitere Besonderheit zeigte sich, dass Glycin nur von den Mikrokokken besonders stark angereichert wurde und Tyrosin von den Enterobacteriaceen. Weitere auffallende Unterschiede zwischen den Keimgruppen bestehen darin, dass nur von den Mikrokokken und Enterobacteriaceen nennenswerte Mengen von α -NH₂-Buttersäure gebildet, dagegen Tryptophan gering und Carnosin sehr stark abgebaut werden (Tab. 2).

Ganz so einheitlich wie es in dieser Tabelle erscheinen mag, sind die Befunde innerhalb der Keimgruppen jedoch nicht. Einige Aminosäuren differieren von Stamm zu Stamm, d.h., es scheinen stammspezifische Unterschiede zu bestehen. Das ist der Fall besonders bei α - und μ -NH₂-Buttersäure, Ornithin und Arginin.

Vergleich zu Veränderungen in reifender Rohwurst:

Ein Vergleich der Befunde an Fleischsuspensionen mit denen bei der Reifung von 4 Rohwurst-Versuchs-Chargen, die aus gleichem Brät mit Kontrolle und mit 3 verschiedenen Laktobazillen-Kulturen angesetzt wurden, zeigt, dass weitgehende Übereinstimmungen zwischen den Aktivitäten der Laktobazillenstämme und den Vorgängen in der Rohwurst bestehen (Tab. 3). Die drei Rohwurst-Chargen zeigten daher keine nennenswerten Unterschiede zur mitgeführten Kontroll-Charge, in der Laktobazillen aus der Fleischeigenflora dominierten.

Abhängigkeit vom Ausgangssubstrat:

Die Freisetzung von Aminosäuren durch Mikroorganismen ist weitgehend vom Ausgangssubstrat abhängig. Das ergibt sich beim Vergleich der Spektren, die gleiche Stämme in verschiedenem Milieu aufweisen. Laktobazillen, Streptokokken und Mikrokokken waren in früheren Untersuchungen in flüssigem Kulturmedium geprüft worden. Dieses Medium enthielt Caseinabbaustufen, die durch tryptische Verdeutung gewonnen worden waren. Über einen Teil der Untersuchungen war bereits berichtet worden (REUTER, LANGNER und SINELL, 1957/58). Die Aminosäuren wurden dort in geringeren Mengen freigesetzt als in den Fleischsuspensionen, dadurch bedingt, dass das Angebot an abbaufähigen N_2 -Verbindungen bedeutend geringer war. Es ist jedoch zu erkennen, dass die Veränderungen im Spektrum der freien Aminosäuren zum Teil ganz andere sind als in den Fleischsuspensionen. Das zeigt sich am deutlichsten bei einer Gegenüberstellung der Befunde von Laktobazillen, von denen eine grössere Anzahl von Stämmen geprüft worden war. Die wichtigsten Befunde sind in Tabelle 4 gegenübergestellt.

Tabelle 1

Freie Aminosäuren in den Ausgangsmaterialien in mg/g

Durchschnitt aus Mehrfachbestimmungen

(Versuch I und II = Fleischsuspension aus Rind und Schwein

5 : 1, verdünnt mit phys. NaCl 1 : 1)

(Rohwurst = Ausgangsbrät bei Versuchsherstellung einer Salami)

	<u>Versuch I</u>		<u>Versuch II</u>		<u>Rohwurst</u>
	Suspens.	Filtrat	Filtrat	Suspens. ⁺	
Asp.				0,61	
Thr.	3,39	6,68	3,57	3,41	2,47
Ser.	4,20	8,33	3,12	3,77	2,00
Glut.	4,97	14,00	3,91	3,14	2,31
Glyc.	3,52	7,65	3,51	4,31	3,81
Al.	11,14	23,59	14,43	13,22	20,29
Val.	4,63	7,62	4,52	3,22	3,89
Meth.	2,95	3,33	2,22	0,94	
I. Leuc.	3,71	4,70	3,04	1,67	2,62
Leuc.	7,17	9,83	6,82	2,96	5,34
Tyr.	3,85	6,02	3,03	1,94	
Ph.Al.	4,55	6,76	4,65	2,35	2,96
$\frac{1}{2}$ NH ₂ - Butters.				6,31	
Orn.	5,54	6,75	1,86	1,98	
Lys.	3,85	5,18	4,59	4,75	2,24
Trypt.	13,50	15,94		13,71	
Hist.	3,26	3,19	8,53	14,04	
Carn.	81,10	152,73	146,73	215,66	22,30
Arg.	2,99		4,25	3,56	1,71
NH ₃	5,12	11,95	8,16	3,27	

⁺ Dialysat, sonst Alkoholfällung

Tabelle 2

Veränderungen der Aminosäurewerte durch Fermentaktivität von Mikroorganismen in Fleischsuspensionen

(Zu- oder Abnahme zum Ausgangswert in mg%)

Keim- Gruppen	Laktobazillen			Strep- tok.	Mikrok.	Enter- bact.
	Strep- tobakt.	Atyp. Strep- tob.	Beta- bakt.			
Gepr. Stämme	3	8	4	4	2	2
Asp.	(+)	(+)	(+)	(+)		+/**
Thr.	(+)/+	(+)/+	+	+	+	(+)
Ser.	(+)	0/(+)	+			(+)
Glut.	+/+++	++	++	+/++	++	++
Glyc.	+	+	+	+	++++	+
Al.	+++	+++	++	+/+++	++	+++
α -NH ₂ Butters.	0/+		0/(+)		++	++
Val.	++	+/++	+/++	++	+++	++
Meth.	+	+	+	+	+	(+)
I.Leuc.	+/++	+/++	+/++	+	++	++
Leuc.	+++	+++	+++	+/+++	+++	+/+++
Tyr.	+	+	+	(+)/+	+	+/+++
Ph.Al.	++	++	++	++	++	+++
β -NH ₂ - Butters.	(-)	(-)	(-)	0/+	(-)	+
Orn.	0/+	0/+	0/+	+	+	+
Lys.	++	+/++	++	+/++	+++	+++
Trypt.				(-)	-	-
Hist.				(+)		+
Carn.	++	0/+	+/+++	(+)/++	≡	≡
Arg.	(-)/+	(-)/+	0/+	(-)		0/+

Zunahme

Abnahme

<u>Schlüssel</u> (mg%):	(+)	= 3	- 9,9	= (-)
	+	= 10	- 24,9	= -
	++	= 25	- 49,9	= =
	+++	= 50	- 74,9	= =
	++++	= 75	- 99,9	= =
	+++++	= > 100		= =

