

H/3

DER EINFLUSS VON pH-WERT, TEMPERATUR UND SALZGEHALT AUF DIE
NITRATREDUKTASEAKTIVITÄT DES MIKROKOKKENSTAMMES M_{III}

Eero P u o l a n n e

Universität Helsinki, Institut für Fleischtechnologie
Helsinki, Finland

E i n l e i t u n g

Die Geschwindigkeit und Vollständigkeit der Reduktion von Nitrat spielt eine wichtige Rolle in der Herstellungstechnologie von Rohwurst und Rohschinken. Durch Verwendung von Starterkulturen ist es möglich, diese Prozesse in gewisser Masse zu regulieren. Viele Bakterien können Nitrat zu Nitrit reduzieren, was auf die Katalyse der Nitratreduktase zurückzuführen ist. Nitratreduktase ist ein partikelgebundenes Enzym, das sich funktionell am Ende der Atmungskette befindet. Nitrat kann ein terminaler Elektronenakzeptor sein, und darum kann Sauerstoff die Reduktion von Nitrat inhibieren. Das aktive Zentrum der Nitratreduktase ist molybdän. Ausserdem überträgt ein Flavinenzym Elektronen aus dem Substrat auf die Nitratreduktase.*

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des pH-Wertes, der Temperatur und des Salzgehaltes auf die Aktivität der Nitratreduktase untersucht. Die Methodik der Untersuchung steht der Enzymologie näher als der Mikrobiologie. Die Reaktion wurde in zwei Stunden mit Hilfe eines am Ende der Atmungskette befindlichen Substrates durchgeführt. So konnten wir uns hauptsächlich auf die Nitratreduktase konzentrieren, ohne dass die anderen Funktionen des Bakteriums störten. Völlig ist dies nicht möglich, ohne dass man ein zellfreies Nitratreduktasepräparat herstellt. Wenn man aber mit zellfreiem Präparat arbeitet, werden die natürlichen Funktionen des Enzymes in der Zelle zerstört.

M a t e r i a l u n d M e t h o d e n

Als nitratreduzierendes Agens wurde der Starterkulturstamm Micrococcus M_{III} verwendet, von dem auch die Handelspräparate "Baktoferment" und zusammen mit Lactobacillus sp. "Duploferment" (Firma Rudolf Müller & Co., Giessen, BRD) entwickelt worden sind.

M_{III} wurde in 2 l Nährbouillon (Nährlösung IV, NIINIVAARA 1955) zwei Tage bei kräftiger Mischung gezüchtet. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, dreimal gewaschen und wieder bis auf 1/10 des ursprünglichen Volumens suspendiert. Die Suspension wurde eingefroren und bei einer Temperatur von -18°C gelagert.

Für die Analyse wurde 10 ml Suspension mit 290 ml 2 %iger NaCl-Lösung verdünnt. Nach einem Tage stehenlassen war diese Suspension 5 Tage anwendbar. Die Anzahl der Bakterien war dann ungefähr 5×10^7 per ml. Die Reduktion von Nitrat wurde nach Modifizierung der Methode von EGAMI und TANIGUCHI (1970) durchgeführt. Die ursprüngliche Methode ist für Nitratbestimmung entwickelt worden, wobei eine aus dem Stamm Escherihia coli hergestellte Zellsuspension verwendet wird. Bei dieser Methode benutzt man eine spezifische partikelgebundene Formiat-Nitrat-Reduktase (FNR). Formiat ist hier ein spezifischer Wasserstoffdonator und ein Hilfsenzym, das Flavin-mononucleotid gebraucht man als Elektronenüberträger. Wenn man mit lebensfähigen Zellen arbeitet ist das Flavin-mononucleotid nicht nötig.

Lösungen:

I Phosphat-Puffer: 11.866 g/l Dinatriumhydrogenphosphat und 9.073 g/l Kaliumdihydrogenphosphat wurden nach Sörensen mit HCl oder NaOH nach dem Formiatzusatz gemischt, um den erwünschten pH-Wert zu erreichen (siehe unten).

- II Phosphat-Puffer/Formiat-Lösung (0,15 M Phosphat,
0.25 M Formiat):
1.7 g HCOONa · H₂O
in 100 ml Phosphat-Puffer (I) gelöst.
- III Nitrat-Lösungen:
40, 120, 400 und 2400 mg NaNO₃ mit Wasser ad 1000 ml
verdünnt. Diese entsprechen in den Thunberg-Röhrchen
10, 30, 100 und 600 ppm.
- IV Uranylasetat-Lösung (gesättigt)
10 g UO₂ (CH₃COO)₂ · 2H₂O in 100 ml Wasser
- V Sulfanilamid
75 ml Wasser und 25 ml konz. Salzsäure gemischt,
darin 1.0 g Sulfanilamid aufgelöst.
- VI 20 mg n-(1-Naphthyl-)äthylendiammoniumdichlorid
in 100 ml Wasser gelöst.

Arbeitsweise

In Thunberg-Röhrchen wurden 2 ml Zellsuspension, 1 ml Phosphat-Formiat-Lösung und in jedes Röhrchen 1 ml Nitrat-Lösung verschiedener Konzentration pipettiert. In eines von diesen Röhrchen wurde 1 ml Wasser statt der Nitratlösung zugesetzt. Dann wurden die Röhrchen evakuiert und 2 St. inkubiert, 1 ml Uranylasetat-Lösung zugesetzt und 10 Min. bei 1000 g zentrifugiert. Vom klaren Überstand wurde 2 ml in ein Reagenzglas pipettiert. (Gewöhnlich musste man jedoch zuerst 5-10 mal verdünnen)

In 2 ml Messlösung wurden 0.5 ml Sulfanilamid-Lösung (V) und 0.5 ml Äthylendiamin-Lösung (VI) pipettiert. Die Messung wurde nach 10 Min. bei 540 nm mit Photometer durchgeführt.

Die ursprüngliche Methode ist in BERGMAYER : "Methoden der Enzymatischen Analyse" gründlich diskutiert worden.

pH-Wert

Aus den Phosphat-Puffern (I) wurden Phosphat-Formiat-Lösungen mit einem pH-Wert von 4.6, 4.9, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.5, 7.0 und 7.5 hergestellt.

Salzgehalt

In die Röhrrchen wurde 0, 60, 140, 220, 300, 380 und 460 mg NaCl eingewogen. In Reaktionslösung entsprechen diese Mengen 0.5, 2, 4, 6, 8, 10 und 12 % NaCl. (Bei den Messungen des Einflusses des Salzgehaltes enthielt die Zellsuspension 1 % Salz). Der pH-Wert der Messlösungen war 6.0.

Temperatur

Die Röhrrchen wurden bei Temperaturen von 2°, 9°, 17°, 25°, 37°, 44°, 50° und 55°C und bei dem pH-Wert 6.0 inkubiert.

* * * *

Jede Messerie umfasste also vier verschiedene Nitratkonzentrationen. Alle Messerien wurden zehnmals wiederholt. Als Messgrösse wurde Nitrit gebraucht, das in den Resultaten in Nitrat verändert worden ist.

Resultate

pH-Wert

Die Resultate über den Einfluss des pH-Wertes auf die Nitratreduktase sind in der Tabelle 1 und in der Abbildung 1 angegeben. Der Tabelle 1 und Abbildung 1 ist zu entnehmen, dass das pH-Optimum der Nitratreduktion unter diesen Verhältnissen nahe pH 6.0 ist, aber dass die Reduktion noch bei pH 4.6 geschieht. Es ist in den Vorversuchen festgestellt worden, dass bei der Anwendung dieser Methode die Reaktionszeit so kurz ist, dass keine signifikante Nitritreduktion stattfinden kann.

Tabelle 1. Der Einfluss des pH-Wertes auf die Nitratreduktaseaktivität des Mikrokokkenstammes M_{III} nach der Methode von EGAMI und TANIGUCHI (1970). Die Zahlen zeigen die reduzierten Nitratmengen und sind Mittelwerte von 10 Messungen.

pH	NaNO ₃	10	30	100	600
	ppm				
4.6		2.52	4.49	5.60	6.46
4.9		4.39	6.89	8.62	9.31
5.2		5.12	7.96	9.60	10.11
5.4		5.34	8.31	9.76	10.26
5.6		5.30	8.36	9.74	10.22
5.8		5.59	8.65	10.10	10.44
6.0		5.62	8.70	10.18	10.57
6.5		5.50	8.73	10.10	10.48
7.0		5.12	7.91	9.60	9.92
7.5		3.68	6.10	7.50	8.05

Salzgehalt

Für den Einfluss des Salzgehaltes konnte in diesen Konzentrationen kein deutliches Optimum gefunden werden (Tabelle 2 und Abb. 2). Bei den Salzgehalten 0.5 - 4.0 sind die Unterschiede statistisch nicht signifikant, aber die Salzgehalte von 6.0 - 12.0 % NaCl weichen signifikant von den Vorgenannten ab.

Tabelle 2. Der Einfluss von Natriumchloridgehalt auf die Nitratreduktaseaktivität des Mikrokokkenstammes M_{III} nach der Methode von EGAMI und TANIGUCHI (1970). Die Zahlen zeigen die reduzierten Nitratmengen und sind Mittelwerte von 10 Messungen.

Salz- gehalt % \ NaNO ₃ ppm	10	30	100	600
0.5	5.57	9.02	10.20	10.51
2.0	5.63	9.02	10.18	10.48
4.0	5.56	9.09	10.14	10.46
6.0	5.40	8.45	9.86	10.22
8.0	5.02	8.44	9.59	10.11
10.0	4.86	8.18	8.77	9.31
12.0	4.51	7.36	7.90	8.19

Temperatur

Unter 10°C geschieht die Reduktion von Nitrat langsam, aber über 10°C nimmt die Geschwindigkeit rasch zu. Das Maximum scheint bei einer Temperatur von etwa 50°C zu liegen (Tabelle 3 und Abb. 3).

Tabelle 3. Der Einfluss von Temperatur auf die Nitratreduktaseaktivität des Mikrokokkenstammes M_{III} nach der Methode von EGAMI und TANIGUCHI (1970). Die Zahlen zeigen die reduzierten Nitratmengen und sind Mittelwerte von 10 Messungen.

Temperatur 0°C \ NaNO ₃ ppm	10	30	100	600
2	0.08	0.16	0.27	0.33
9	0.11	0.37	0.49	0.61
17	2.31	4.10	5.82	6.72
25	3.25	6.96	9.47	10.13
37	4.55	8.82	12.24	13.13
44	4.77	8.99	13.28	15.17
50	4.81	9.72	14.30	14.87
55	2.60	4.17	5.37	6.17

D i s k u s s i o n

Beim Reifungsprozess der Rohwurst sollte die Nitratreduktion im Anfangsstadium der Reifung stattfinden, weil nach Untersuchung von NIINIVAARA (1955) die Reduktion von Nitrat unter dem pH-Wert 5.6 in der Wurst und im Nährbouillon sehr verzögert wird. Dagegen hat die Senkung des pH-Wertes nur einen sehr geringen Einfluss auf die Aktivität der Nitratreduktase, wie unsere diesbezüglichen Untersuchungen zeigen. Zum Beispiel ist die Aktivität der Nitratreduktase in vitro bei einem pH-Wert von 4.9 noch 85 % der Aktivität bei pH 6.0 und einer NaNO_3 -Konzentration von 100 ppm (Tabelle 1 und Abb. 1).

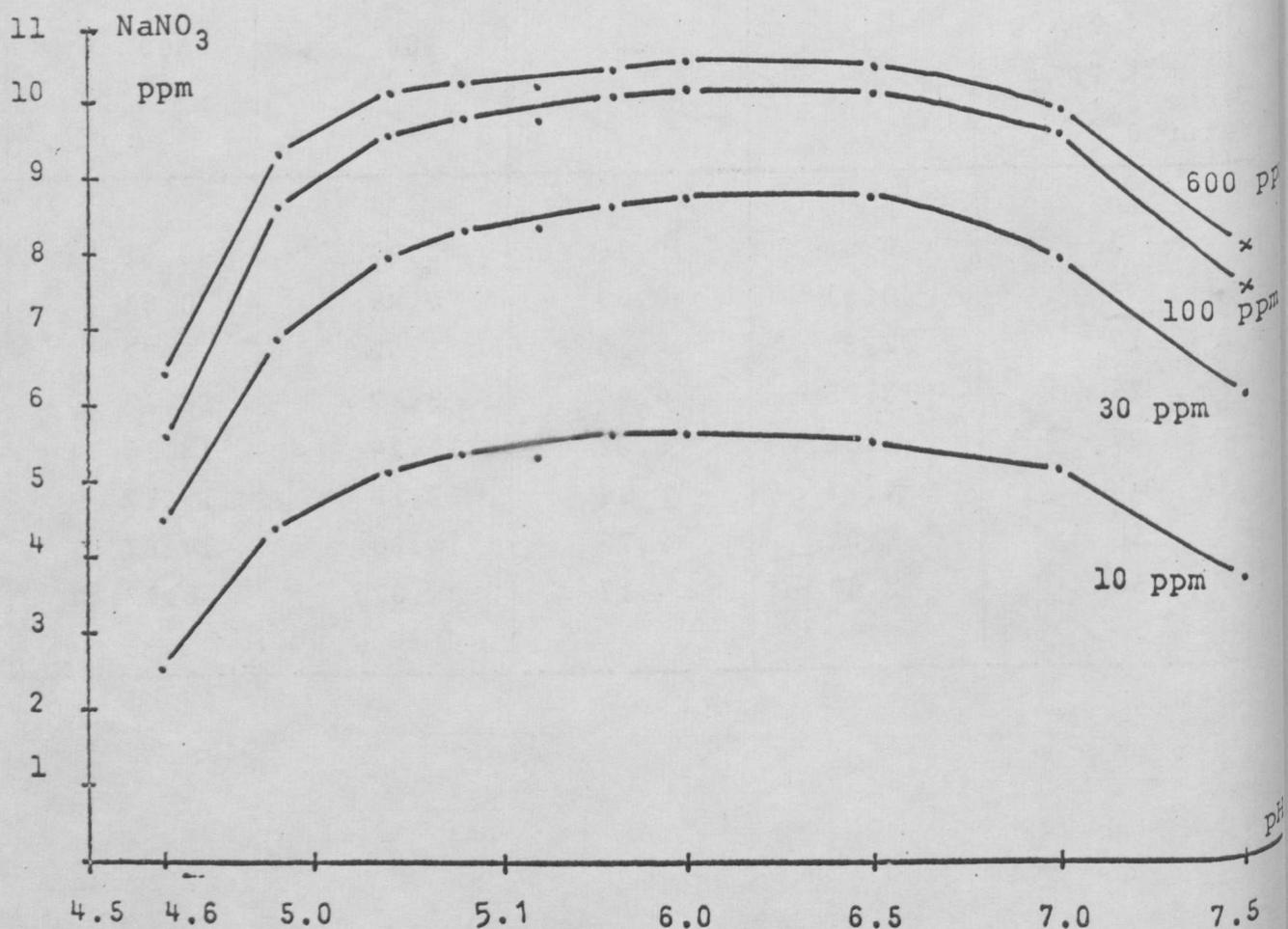


Abb.1. Der Einfluss des pH-Wertes auf die Nitratreduktaseaktivität des Mikrokokkenstammes M_{III} als reduzierte Nitratmenge gemessen.

Der Unterschied zwischen den Resultaten dieser Untersuchung und der von Niinivaara beruht wahrscheinlich darauf, dass die anderen Funktionen der Bakterien bei dieser enzymatischen Methode nicht so viel die Nitratreduktion bewirken. Ausserdem wird Nitrit, das in den beiden Untersuchungen als Messgrösse gebraucht wurde, bei den niedrigeren pH-Werten in der Wurst schnell weiterreduziert.

Der Salzgehalt in der Wasserphase der Wurst ist zu Beginn 6-7 % und nimmt während der ersten Tage nur wenig zu. Darum hat der Salzgehalt nur einen geringen Einfluss auf die Reduktion von Nitrat (Tabelle 2 und Abb. 2).

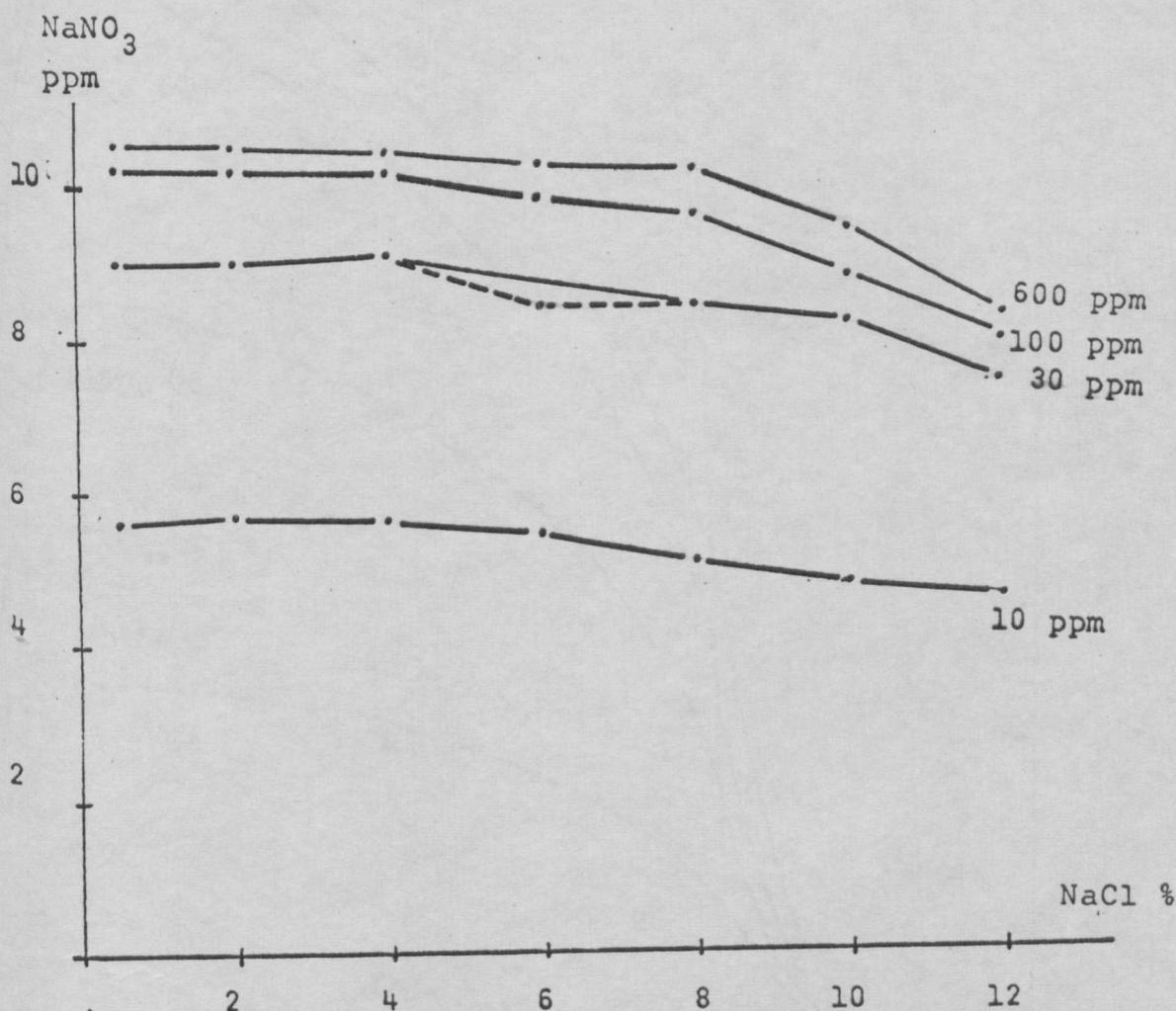


Abb. 2. Der Einfluss von Natriumchloridgehalt auf die Nitratreduktaseaktivität des Mikrokokkenstammes M_{III} als reduzierte Nitratmenge gemessen.

Weil die Temperatur in der Wurst am Anfang ca. 0°C ist und danach erst langsam steigt, ist es wichtig, dass die Bakterien auch bei niedrigeren Temperaturen Nitrat reduzieren können. Die Reduktion von Nitrat geschieht mit einer Geschwindigkeit von 4.6 % bei 2° und 8.4 % bei 9° verglichen mit der Geschwindigkeit bei 17°C bei einer NaNO_3 -Konzentration von 100 ppm. (Tabelle 3 und Abb. 3). Im Temperaturgebiet $20\text{-}22^{\circ}\text{C}$, welches gewöhnlich bei Herstellung der Rohwurst verwendet wird, ist die Temperaturwirkung sehr deutlich.

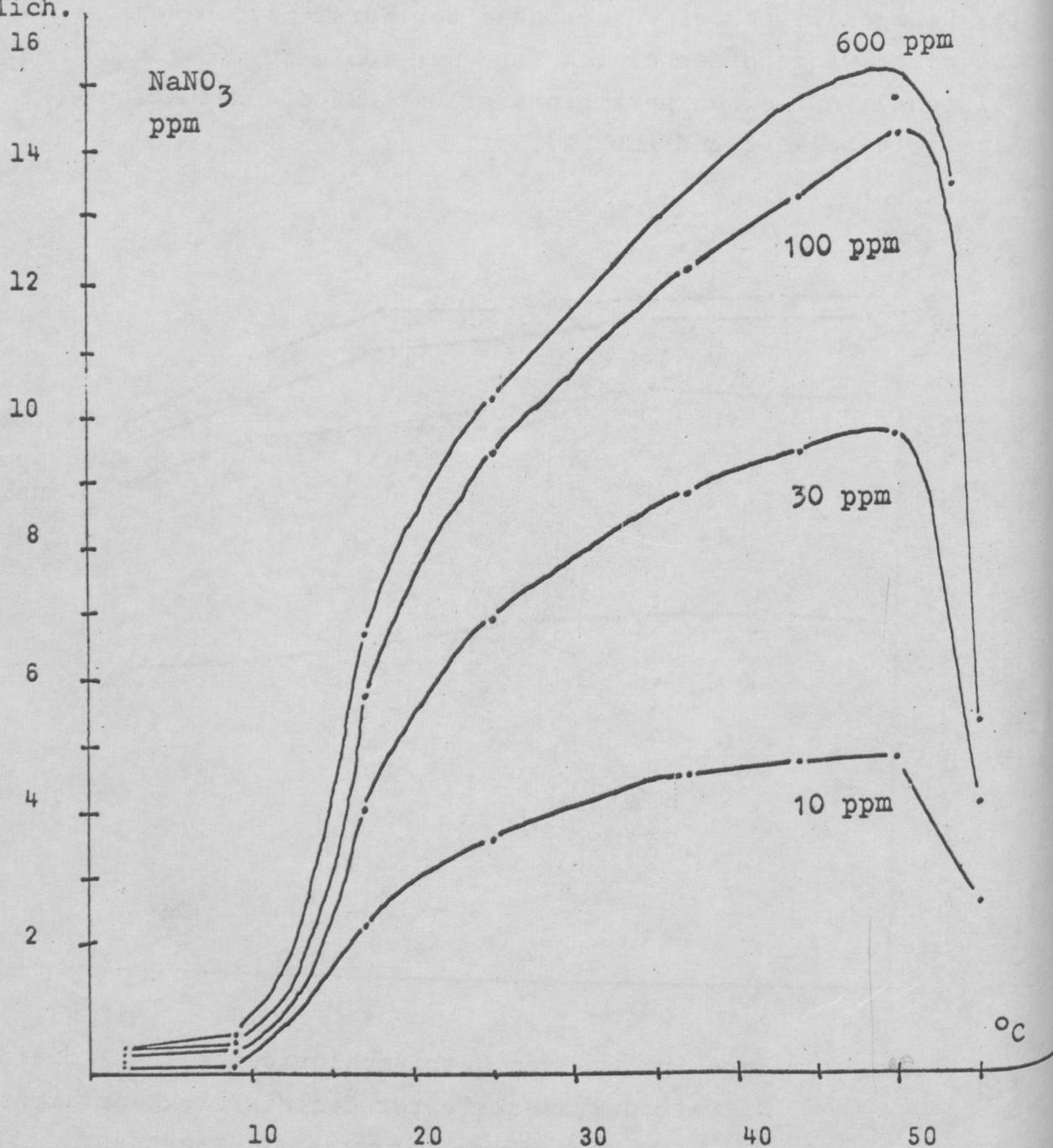


Abb. 3. Der Einfluss von Temperatur auf die Nitratreduktaseaktivität des Mikrokokkenstammes M_{III} als reduzierte Nitratmenge gemessen.

Die Konzentration von Nitrat in der Wurst ist gesundheitlich wichtig. Die übliche Anfangskonzentration der Rohwurst ist 600 ppm in der Wasserphase. Die Tabellen und Abbildungen 1-3 zeigen, dass bei der Konzentration von 100 ppm praktisch dieselbe Nitratkonzentration wie bei der von 600 ppm reduziert wurde. Bei einer Temperatur von 17°C wurde bei der Nitratkonzentration von 100 ppm ca. 6 % des Nitrats reduziert und bei 600 ppm nur ca. 1 %. Weitere Untersuchungen wären nötig, um den Einfluss der kleineren Nitratkonzentrationen auf die Haltbarkeit der Wurst und die Stabilität der Farbe zu ermitteln.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Der Einfluss des pH-Wertes, der Temperatur und des Salzgehaltes auf die Nitratreduktaseaktivität des Rohwurststarterkulturstammes Micrococcus M_{III} in lebenden Zellen wurde untersucht. Die Reaktion wurde mittels Formiat als Wasserstoffquelle innerhalb von zwei Stunden durchgeführt. Die Resultate sind nicht direkt auf den Verhältnisse in der Rohwurst zurückzuführen. Der Einfluss des pH-Wertes zwischen 5.2 - 7.0 ist sehr gering. Bei Temperaturen unter 10°C ist die Reduktionsgeschwindigkeit nur etwa 10 % der Geschwindigkeit bei 17°C. Ein Salzgehalt von 8 % verzögert die Reduktion 6 % verglichen mit einem Salzgehalt von 0.5 %.

L i t e r a t u r

EGAMI, F. und TANIGUCHI, S. (1970). Nitrat. in BERGMAYER, H.U. (1970). Methoden der Enzymatischen Analyse. Band II, 2179-2184. Verlag Chemie, Weinheim.

NIINIVAARA, F.P. (1955). "Über den Einfluss von Bakterienreinkulturen auf die Reifung und Umrötung der Rohwurst. Acta Agr. Fenn. 84, Helsinki 1955.