

Störende Interaktionen beim Nachweis von Fremdeiweißen in Fleischerzeugnissen

H.-J. SINELL

Institut für Lebensmittelhygiene, Freie Universität Berlin, Koserstr. 20, D 1000 Berlin 33

Einleitung

In früheren Untersuchungen hatten wir die Brauchbarkeit der Elektroimmunodiffusion (EID) zum quantitativen Nachweis von Milcheiweiß in Brühwurstzeugnissen nachgewiesen und hierfür auch einen Methodenvorschlag unterbreitet (SINELL und MENTZ, 1975; 1977). Bei dem Versuch, einen entsprechenden Methodenvorschlag für die Untersuchung von Kochwürsten zu erarbeiten, stießen wir auf Schwierigkeiten. Wir beobachteten nämlich, daß bei einer Reihe von Milcheiweiß enthaltenden Würsten in der EID die Präzipitatbanden im Gel unscharf und verwaschen, z.T. nur als blasse Trübungen auftraten. Die Ablesung war dadurch erschwert, eine Ausmessung der Bandenlänge und damit Quantifizierung des Befundes unmöglich.

Über Störungen beim immunologischen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß ist auch von anderer Seite berichtet worden. BREHMER und GERDES (1980) beobachteten bei etwa 50 % der aus dem Handel stammenden Leberwurstzeugnisse in der EID weniger deutliche Präzipitatbanden, ähnlich wie auch bei sehr alten Brühwurstextrakten. Eine ernstliche Beeinträchtigung der Untersuchung sahen die Autoren allerdings nicht, möglicherweise, weil sie gegen reines α_1 -Casein gerichtete Antiseren verwendet hatten. Über die Ursache derartiger Reaktionsausfälle gibt es nur Vermutungen. So werden Schädigungen durch Hitze (BREHMER und GERDES, 1980; BELLATTI und PAROLARI, 1979) oder aber auch eine Spaltung des Phosphoprotein-Komplexes des Milcheiweißes durch Leberenzyme vermutet (BREHMER und GERDES, 1980). Die Ergebnisse des immunoelektrophoretischen Milcheiweißnachweises ließen sich verbessern durch eine Perameisensäure-Extraktion, die sich anderen Lösungsmitteln als überlegen erwies (BELLATTI und PAROLARI, 1979).

Mit dem im folgenden dargestellten Versuchen sollte der Frage nachgegangen werden, welche Ursachen für die Störungen des Milcheiweißnachweises in Leberwurstzeugnissen verantwortlich sind, und welche Möglichkeiten zur Verbesserung der Technik und zur Sicherung der Aussage bestehen. Derartige Untersuchungen schienen uns um so notwendiger, als immer wieder - selbst bei kontrollierten Ringversuchen - neben falsch positiven unerklärliche falsch negative Ergebnisse auftraten (BELJAARS und OLSMAN, 1977; auch FLEMMIG, 1979) und andererseits serologische Untersuchungsmethoden in verschiedenen Staaten zur Kodifizierung als amtliche Methodenstandards anstehen.

Material

aufgeschlossenes Milcheiweiß, handelsübliche Präparate verschiedener Hersteller⁺). α -Casein (Prof. Klostermeyer).⁺⁺) β -Casein (Dr. Reimerdes).⁺⁺) Frische und tiefgefrorene Schweineleber, 13 Leberwürste des Handels (hocherhitze Vollkonserven mit deklarierten Haltbarkeitsfristen bis zu zwei Jahren).

Methoden

Antiseren. Sämtliche verwendeten Antiseren entstammten eigener Herstellung (SINELL und MENTZ, 1975; 1977).

Anti-Milcheiweiß-Seren: Die Anti-Milcheiweiß-Seren wurden gegen verschiedene im Handel verfügbare Präparate von "aufgeschlossenem Milcheiweiß" hergestellt.

Anti- β -Casein-Seren: Bei einem Teil der Antiseren war die Dosis gegenüber der früher angegebenen um die Hälfte vermindert (2;5;5 und 5 mg Antigen am 1., 14., 15. und 16. Tag).

Präzipitattmessung. In Glasröhrchen (55 mm lang, 7 mm \emptyset) wurden Antigenverdünnungen unterschiedlicher Konzentration mit unterschiedlichen Antiserumverdünnungen vermischt (0,2 ml aa). Inkubation: 30 min bei +37°C, anschließend ca. 24 h bei +6°C. Zentrifugation: 20 min bei 1500 g. Die Präzipitate wurden anschließend in End to End Capiletten (100 μ l, Fa. Labora, Mannheim) aufgenommen, diese an einem Ende abgeschmolzen und erneut 5 min bei 1500 g zentrifugiert. Messung der Präzipitathöhe mit einer Schublehre.

Geldiffusion (Ouchterlony-Test). Zweidimensionale Doppeldiffusion im Gel folgender Zusammensetzung: 1 g Agar Noble (Difco) + 25 ml Veronalpuffer, pH 8,6, I = 0,1 (0,05 m Natriumdiethylbarbiturat, 0,01 m Diethylbarbitursäure, 0,05 m Natriumacetat) + 74 ml Aqua dest. + 1 ml Merthiolat 1 : 100. Schichtdicke: ca. 1,3 mm auf mit 0,2 %iger Haftagarlösung gecoateten mikroskopischen Objektträgern. Stanzlöcher: Rosettenförmige Anordnung von sechs Antigenbassins um ein zentrales Antiserum-Bassin (Bassindurchmesser: 5 mm, Lochabstand (gemessen von Rand zu Rand) 4 mm). Die Lochstanzung erfolgte mit einer V2A-Teleskop-Stanze, die durch eine Plexiglasschablone geführt wird. Im übrigen wurde verfahren wie bei SINELL und MENTZ, 1977 angegeben.

⁺) "Aufgeschlossenes Milcheiweiß" enthält immunologisch unterscheidbar im wesentlichen α - und β -Casein. Molkenproteine sind praktisch nicht nachweisbar. Die Präparate unterschiedlicher Herkunft werden im folgenden immer als "aME" bezeichnet.

⁺⁺) Für die Überlassung der gereinigten Fraktionen danken wir den Herren Prof. Dr. Klostermeyer und Dr. Reimerdes von der Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel.

Elektroimmunodiffusion (EID). Das Verfahren ist beschrieben bei SINELL und MENTZ, 1977. Folgende Modifikationen wurden vorgenommen:

Agarose: 1,1 % Agarose reinst (SERVA Nr. 11397) in Tris-Tricin-Puffer (MONTHONY-Puffer, Fa. BIO-RAD); die 0,096 m Stammlösung wird zum Gebrauch 1 + 3 verdünnt.

Extraktansatz: statt bloßer Harnstofflösung wurde 7 m Harnstofflösung in gebrauchsverdünntem Tris-Tricin-Puffer, pH 8,6 hergestellt. Herstellung der Extraktverdünnungen ebenfalls mit dieser Lösung.

Kammerpuffer: gebrauchsverdünnter Tris-Tricin-Puffer, pH 8,6; Trennung bei 300 V über 4 h.

Entfärbelösung: 0,1 % Supranolcyanin 6 B 300 % (BAYER) in Entfärbelösung

Entfärbelösung: Eisessig : Ethanol : Aqua dest. = 10 : 45 : 45

Perameisensäure-Behandlung. Die von BELLATTI und PAROLARI (1979) beschriebene Methode wurde in folgenden Punkten modifiziert bzw. nach persönlichen Angaben von Frau Dr. Bellatti ergänzt: Perameisensäure, immer frisch zu bereiten: 9,5 Vol. Ameisensäure (99 %) mit 0,5 Vol. H₂O₂ (32%) in einer verschließbaren Flasche mischen und 2 h bei Raumtemperatur stehen lassen. Nach der Reaktion wird überschüssiges Reagenz verworfen.

Vorbereitung der Probe: 1 g Untersuchungsmaterial, 4 ml Ameisensäure, 1 ml Methanol mischen. Probe und Perameisensäure 15 min kühlen, dann 10 ml Perameisensäure zu der Probe geben und das Gemisch 2,5 h bei 0 bis +5° C stehen lassen.

Zu 1 ml Gemisch in einem Zentrifugenbecher 9 ml Aqua dest. und 1,5 ml NaOH (32%) geben, um die Proteine zu fällen. Zentrifugation 15 min bei 1400 bis 1500 g. Sediment zweimal mit Aqua dest. waschen und anschließend in 8 ml 7 m Harnstofflösung in gebrauchsverdünntem Tris-Tricin-Puffer, pH 8,6 im Kühlschrank stehen lassen. Ein danach ungelöst verbleibender Rückstand wird abzentrifugiert und der Überstand für die Immundiffusion verwandt.

Immunelektrophorese mit der Apparatur 6800 A der Fa. LKB-Producter AB (vgl. KLUGE-WILM, 1967)

Hämagglutination (HA) und Hämagglutinationshemmung (HAH) nach der Mikrotitermethode mit Formolschells und Glutaraldehyd (SINELL und MENTZ, 1973)

Hemmung der Hämagglutination mit

a) Gervita (25 mg) in PBS (40 ml), pH 7,3

b) einem Gemisch aus Leberextrakt (40 ml); (5 %ig Leber in PBS, pH 7,3, klären durch Zentrifugation und Filtration) und Gervita (25 mg)

c) 5 %ig Leber in PBS, pH 7,3, klären durch Zentrifugation und Filtration

d) Homogenat aus Leber (5 g) und Gervita (0,1 g) gemischt, extrahiert mit 160 ml PBS, pH 7,3, Zentrifugation, Filtration

Ergebnisse und Diskussion

1. Präzipitattmessung

Die Versuche zur Präzipitattmessung sollten klären, ob durch Einwirkung von Leberbestandteilen auf Milcheiweiß die Menge des durch spezifischen Antikörper noch präzipitierbaren Antigens in irgendeiner Weise beeinflusst wird. Daß dies tatsächlich der Fall ist, zeigt Tabelle 1

Tab. 1 Präzipitattmengen von leberextraktbehandeltem Milcheiweiß nach der Reaktion mit homologem Anti-Milcheiweiß-Serum. Arithmetisches Mittel aus Dreifachansätzen (+)=Sechsfachansätze) in mm

Extrakt	Leber für Milcheiweiß-behandlung	Extraktverdünnung mit	Milcheiweißkonzentration (mg/ml)					
			2	0,4	0,2	0,1	0,04	0,01
aufgeschlossenes Milcheiweiß	-	phys. NaCl	2,2	5,2	6,3	4,9	3,5	1,7
aufgeschlossenes Milcheiweiß + Leberextrakt	tiefgefroren	phys. NaCl	1,8	2,8	3,2	3,6	2,7	1,2
	tiefgefroren	Leberextrakt ++)	1,6	3,7 ⁺)	4,3	4,7 ⁺)	3,5 ⁺)	1,0
	frisch	phys. NaCl	2,0	3,0	3,7	3,6	2,6	1,3
	frisch	Leberextrakt	1,5	3,3 ⁺)	3,4	4,0 ⁺)	2,7 ⁺)	0,8
	frisch	Leberextrakt ++)	-	3,6	-	4,4	3,1	-
	tiefgefroren	Rinderserumalbumin 0,8 %ig	2,0	3,0	3,5	3,5	2,6	1,3
	tiefgefroren	Pferdeserum, 0,8 %ig	2,0	3,2	3,6	3,8	2,6	1,2

++) Extrakt zur Verdünnung aus tiefgefrorener Leber hergestellt.

Als Vergleich diente dabei das Gemisch von aME unterschiedlicher Konzentration mit dem Antiserum Anti-Rovita 75X-21. Der Äquivalenzbereich liegt bei unverdünntem Antiserum bei 200 µg aME/ml. Bei Verdünnung des Antiserums 1 : 10 war nach 24 h noch kein Präzipitat sichtbar. Deswegen wurde in den folgenden Versuchen nur unverdünntes Antiserum verwendet. Neben der Verringerung der Präzipitathöhe fiel zunächst auch auf, daß der Äquivalenzbereich bei den leberbehandelten aME-Extrakten verschoben war. So wurden im Gegensatz zu der Präzipitathöhe im reinen Antigen-Antikörper-System die höchsten Präzipitattmengen bei nur 100 µg aME/ml gemessen. Zweitens wäre die Bestimmung des Präzipitateiweißgehaltes (HEIDELBERGER et al., 1933) ein genau-

eres Verfahren gewesen, um die tatsächliche Präzipitatemenge zu ermitteln. Wir glauben aber, daß die einfache volumetrische Bestimmung des Präzipitates eine brauchbare Orientierung ermöglicht.

Auf die Verminderung der Präzipitatemenge übte es keinen Einfluß aus, ob die Leber nach Tiefgefrierlagerung oder schlachtfrisch auf das aME einwirkte. Ohne Einfluß war auch, ob die Extraktverdünnungen mit Kochsalzlösung oder mit Leberextrakt angesetzt wurden. Auch andere Eiweiße in den Extrakten (Rinderserumalbumin, Pferdeserum) beeinflussten die Präzipitathöhe nicht. Man kann schließen, daß eine Modifizierung des Milcheiweißes nur bis zu einer gewissen Konzentration von Leberinhaltsstoffen erfolgt, so daß auch bei erheblichem Leberüberschuß immer noch ein gewisser Anteil an präzipitabilem aME verbleibt. Dies bestätigte sich auch bei der Untersuchung von Leberwurstkonserven. Wurden diese mit Leberextrakt extrahiert, so waren nach der Antigen-Antikörper-Reaktion die Präzipitathöhen nicht geringer als nach üblicher Kochsalzextraktion.

Die Beeinträchtigung der immunologischen Reaktionsfähigkeit des leberbehandelten aME bestätigte sich auch in der als sehr empfindlich bekannten Hämagglutinationshemmungsreaktion (HAH).

Tab. 2 Hämagglutinierende Titer eines homologen Anti-aME-Serums nach Hemmung mit unterschiedlich behandeltem aME

ohne Hemmung	Hämagglutinationstiter			
	nach Hemmung des homologen aME-Leber-Homogenat	nach Hemmung des homologen aME-Leberextrakt	Antiserums durch aME-Lösung	Leberextrakt
			Kontrollen	
1 : 1024	1 : 1024	1 : 16	1 : 4	1 : 1024

Mit Leberextrakt behandelte aME-Lösungen ergaben erwartungsgemäß nur eine geringe Verminderung des Hemmtiters gegenüber der unbehandelten aME-Kontrolle. Wurde dagegen Milcheiweiß mit Lebergewebe direkt homogenisiert (wie es bei der gewerblichen Herstellung nicht ausgeschlossen ist), so verringerte sich der Hemmtiter auf das Niveau der milcheiweißfreien Kontrolle. Die HAH zeigte zumindest bei dieser Versuchsanordnung noch wesentlich empfindlicher die immunologischen Beeinträchtigungen an als die Geldiffusionsverfahren. In der Geldiffusion nämlich waren bei den hier verwendeten Extrakten Präzipitate noch deutlich, allerdings sehr stark abgeschwächt bis zu einem aME-Gehalt von 156 µg/ml (im Gegensatz zur Kontrolle, die noch mit 19,5 µg/ml positiv reagierte). In einem direkten HA-Versuch ließ sich nach der Fixierung des aME auf die Erythrozytenoberfläche eine Veränderung durch später einwirkendes Lebereiweiß nicht nachweisen. Die sensibilisierten Zellen wurden mit und ohne Leberbehandlung durch das Anti-aME-Serum mit dem gleichen Titer agglutiniert.

2. Modifizierung verschiedener Caseinfraktionen durch Lebereiweiß

Bei Kontrollen, die bei der im vorigen Abschnitt beschriebenen Versuchsserie mit den Extrakten in der Geldiffusion angestellt worden waren, hatte sich nicht nur eine quantitative Abschwächung der Reaktionen des leberbehandelten aME ergeben, sondern auch eine qualitative Veränderung. Während bei dem unbehandelten System stets mehrere Präzipitationsbanden im Gel auftraten, zeigte sich bei dem lebermodifizierten Milcheiweiß nach Reaktion mit dem Anti-aME-Serum eine Verminderung der Bandenzahl. Meist handelte es sich nur um eine einzige, die zwischen Antigen- und Antikörper-Bassin sichtbar wurde. Dies legte die Vermutung nahe, daß Interaktionen zwischen Leber- und Milcheiweiß sich nur auf bestimmte Anteile des Caseins beschränken. Deshalb wurden die folgenden Versuche angestellt.

a) Identifizierung einzelner Fraktionen in der Geldiffusion. Versuche mit Extrakten aus lebermodifiziertem aME, die mit Anti-aME-Serum zur Reaktion gebracht wurden, ließen keine eindeutige Identifizierung des modifizierten Caseinanteils zu. Eine klare Zuordnung mit α - und β -Casein als Referenzantigen war nicht möglich. Einige orientierende Versuche, die wir mit dem Ouchterlony-Test in größerem Maßstab auf Lab-Tek-Schalen (Gelschichtdicke 1,4 mm, Lochdurchmesser Antigene = 7 mm, Antiserum = 14 mm und Abstand Ag/Ak-Bassin 8 mm) durchgeführt haben, legten die Vermutung nahe, daß durch das Lebereiweiß in erster Linie der β -Casein-Teil im aME verändert wird. Bei Verwendung eines nur gegen β -Casein gerichteten Antiserums blieben die Reaktionen mit den behandelten Extrakten völlig aus, obwohl der Caseingehalt der Extrakte rechnerisch 1 mg/ml betrug, unbehandeltes β -Casein aber noch in einer Konzentration von 15,6 µg/ml mit dem Antiserum sichtbar präzipitierte. Diese Beobachtungen bestätigten sich in der Immunoelektrophorese, wo ebenfalls die der β -Casein-Position zuzuordnenden Banden ausblieben bzw. nicht auftraten.

b) Elektroimmunodiffusion. Eindeutig waren die Bilder der Elektroimmunodiffusion. Während wir immer für die quantitative Auswertung die Bandenlänge der β -Caseinfraktion zugrunde legten, blieben in den Extrakten aus leberbehandeltem aME die entsprechenden Präzipitationslinien aus. Lediglich Schatten des sehr rasch anodisch wandernden α -Caseins waren sichtbar. Bei Verwendung von Anti- β -Casein im Gel zeigte sich lediglich eine unspezifische, verwaschene, anodisch wandernde Trübung, nicht aber ein scharf umrissener β -Casein/Anti- β -Casein-Peak.

3. Versuche zur Verbesserung der Extraktion

Die Hypothese, man könne den Casein-Leberkomplex durch verhältnismäßig grobe Eingriffe spalten, erwies sich als falsch: Schrittweise Verdauung mit Trypsin führte zu irreversibler Zerstörung der serologischen Aktivität. Ebensowenig brachten Erhitzung oder Verschiebung des pH-Wertes eine Verbesserung.

Als günstiger erwies sich die von uns früher empfohlene Extraktion des Materials mit 7 m Harnstofflösung. Etwas verbessert wurde das Ergebnis, wenn der Harnstoff nicht wäßrig, sondern in Tris-Tricin-Puffer gelöst wurde. Es scheint, daß durch die Fähigkeit des Harnstoffs, H-Brücken zu sprengen, die Interaktionen zwischen Milcheiweiß und dem Lebereiweiß zumindest zum Teil rückgängig gemacht werden. Eine entsprechende Wirkung hatten wir auch bei der partiellen Degradation der Aggregate von hitzedenaturierten Muskeleiweißen für wahrscheinlich gehalten (SINELL, 1968; SINELL und MENTZ, 1969). Eine weitere Verbesserung der Extraktion ermöglichte die von BELLATTI und PAROLARI (1979) beschriebene Behandlung des Materials mit Perameisensäure. Während Tris-Tricin-Puffer-Harnstoff-Lösung keine meßbaren Peaks bei lebermodifiziertem aME lieferte, waren solche in den perameisensäurebehandelten Extrakten in der Elektroimmunodiffusion deutlich sichtbar, meßbar und damit auch quantitativ auswertbar.

Diese zunächst nur in Modellversuchen an Milcheiweiß-Leber-Homogenaten getroffene Feststellung überprüften wir an einer Reihe von Leberwurstkonserven des Handels. In jedem Fall blieb die serologische Reaktionsfähigkeit des aME entweder voll erhalten oder sie wurde durch diese Behandlung wiederhergestellt. Nach Perameisensäurebehandlung bildeten die Extrakte bei der EID Präzipitate aus, die sich klar ausmessen und mit Standards vergleichen ließen. Die Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß die Interaktionen zwischen Lebereiweiß und aME nicht irreversibel sind, d.h., daß auch die immunologische Reaktionsfähigkeit allenfalls maskiert, aber nicht völlig wie bei einem proteolytischen Effekt zerstört wird. - Die Perameisensäurebehandlung wird daher bei der Untersuchung gerade von Leberwürsten auf aME in all den Fällen empfohlen, in denen unklare und quantitativ nicht auswertbare Reaktionen in der Elektroimmunodiffusion auftreten.

- Literatur
- Rehmer, H. und H. Gerdes:
Quantitative Bestimmungen von aufgeschlossenem Milcheiweiß mit Hilfe eines Elektroimmunodiffusions-Verfahrens und der Thalacker-Methode in Modellwurstherzeugnissen und Wurstherzeugnissen aus dem Handel.
Fleischwirtschaft 60, 1374-1379, 1980
- Beljaars, P.R. und W.J. Olsman:
Collaborative study on the detection of caseinate and soya protein isolate in meat products.
Nutr. Alim. 31, 233-244, 1977
- Bellatti, M. und G. Parolari:
La determinazione delle proteine estranee nei prodotti carnei. I. Influenza della tecnica di estrazione sul dosaggio della caseina in conserve di carne crude.
Industria Conserve 54, 3-5, 1979
- Plemmig, R.:
Zusammensetzung und Beurteilung von Wurst- und Fleischerzeugnissen in Portionspackungen.
Fleischwirtschaft 59, 620-628, 1979
- Heidelberger, M., Kendall, F.E. und C.M. Soo Hoo:
Quantitative studies on the precipitin reaction. Antibody production in rabbits injected with an azo protein.
J. Exper. Med. 58, 137-152, 1933
- Kluge-Wilm, R.:
Serologischer Nachweis von Milcheiweiß in hochehitzen Fleischwaren.
Vet. med. Diss. FU Berlin, 1967
- Sinell, H.-J.:
Probleme bei der Spezies-Identifizierung von Proteinen in Lebensmitteln.
Arch. Lebensmittelhyg. 19, 121-125, 1968
- Sinell, H.-J. und I. Mentz:
Serologische Species-Identifizierung hitzedenaturierter Muskelproteine mittels Harnstoffextraktion.
Berliner Münchner Tierärztl. Wschr. 82, 55-58, 1969
- Sinell, H.-J. und I. Mentz:
Mikrotiter-Hämagglutinationshemmung zum Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischherzeugnissen.
Wien. tierärztl. Mschr. 60, 79-83, 1973
- Sinell, H.-J. und I. Mentz:
Zum quantitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß mittels Elektroimmunodiffusion.
Arch. Lebensmittelhyg. 26, 41-46, 1975
- Sinell, H.-J. und I. Mentz:
Use of electroimmunodiffusion for quantitative determination of non meat proteins added to meat products.
Folia Veterinaria Latina 7, 41-54, 1977