

Eine einheitliche chromatographische Schnellmethode zum Nachweis von Fremdproteinen und gewissen Zusatzstoffen in Hackfleisch.

von I.-J. JEBSEN HAAVE und BJARNE AALVIK.

Gesundheitsamt der Stadt Bergen, Abteilung für Fleisch- und Lebensmittelkontrolle,
4000 Bergen, Norwegen.

Einleitung.

Der Nachweis von Fremdproteinen in Fleischwaren ist eine sehr aktuelle Aufgabe in der Lebensmittelkontrolle. Nach norwegischen Vorschriften ist es nicht zugelassen, in reinen Fleischwaren diese Proteine zu verwenden.

Wir haben einen Schnelltest ausgearbeitet, der eine Grundlage gibt, Hackfleisch hinsichtlich seines Inhaltes an Fremdproteinen als "frei" oder als "bedenklich" einzustufen. Damit bekommt man die Möglichkeit - noch während des Warenumsatzes - eine neue Probe derselben Warenpartie zu entnehmen. Eine endgültige Gutheissung/Entkräftung des Ergebnisses muss jedoch mit der Elektrophorese oder einer anderen Methode, die ebenso sicher ist wie die Elektrophorese, vorgenommen werden.

Im Gesundheitsamt Bergen, Abteilung für Fleisch- und Lebensmittelkontrolle, ist die Methode nun routinemässig etwa $1\frac{1}{2}$ Jahre lang erprobt worden. In der Untersuchungszeit hat es sich erwiesen, dass die Chromatogramme auch andere unerlaubte Zusätze ausser Kaseinat und Soya-Protein in Hackfleischsorten aufdecken können.

Material und Methodik.

Chromatographiepapier, Schleicher & Schüll nr. 2043 b Mgl.
Chromatographiewanne (grosse Schale mit niedrigem Rand)
Glasplatte zum Zudecken der Wanne
Petrischale (ev. - deckel)
Kolben, Trichter, Faltenfilter, Reagenzgläser
Wasserbad 90 °C
Uhrglas oder kleine Glas- oder Porzellanschalen
Homogenisator (z.B. Stomacher Lab Blender 400)
AgNO₃-Lösung 2%
NaOH-Lösung 0,05%

Aus dem Chromatographiepapierbogen (58x60 cm) werden Rechtecke 14,5 x 13,5 cm (1 Bogen = 6 Stücke) ausgeschnitten. Der Rest wird zu kleinen Rechtecken (ca. 2,5 x 2,5 cm) zugeschnitten. Im folgenden werden die grossen Rechtecke "Chromatogramme", die kleinen "Dochte" genannt. In der Mitte jedes Chromatogramms wird ein Loch mit dem Durchmesser von ca. 3-4 mm ausgearbeitet, und radial von der Mitte aus werden zwei Punkte mit dem Bleistift 3,5 und 6 cm markiert, am besten in zwei Richtungen. Ein Uhrglas (kleine Schale) wird mitten in eine Petrischale gelegt. 0,8 ml der AgNO₃-Lösung wird ins Uhrglas gegeben. Das Chromatogramm wird mitten über die Schale gelegt. Ein Docht wird eng zusammengerollt und durch das Loch gesteckt bis es gegen das Uhrglas stösst, vgl. Fig. 1. Die Lösung steigt nun auf durch den Docht und breitet sich ringförmig im Papier aus. Wenn das Papier bis zur inneren Bleistiftmarke durchgefuechtet ist (nach ca. 10 Min.), wird das Chromatogramm hochgenommen, der Docht entfernt, und es wird zum Trocknen in einen dunklen, möglichst luftigen Raum gehängt. Es soll dort solange bleiben, bis es ganz trocken ist; eine Missfärbung darf aber nicht vor der nächsten Chromatographie stattfinden. Das Trocknen dauert ca. $\frac{1}{2}$ - $\frac{3}{4}$ Stunde.

Von dem zu untersuchenden Hackfleisch werden zwei Proben, je 15 g, abgewogen. Die eine Probe wird so benutzt, wie sie ist, der anderen wird 2% (ev. 3%) NaCl zugesetzt, das gut mit der Probe vermischt wird. Jedem "Fleischkloss" wird 50 ml NaOH-Lösung zugesetzt, dann wird homogenisiert und filtriert. Vom Filtrat wird 10-15 ml in ein Reagenzglas getan, mit Watte verschlossen und 5 Min. lang mit 90°C angewärmt. Die Gläser werden abgekühlt, z.B. unter fließendem Wasser, geschüttelt und der Inhalt wird filtriert. Ca. 2,5 ml von diesem Filtrat wird in ein Uhrglas getan, das mitten in einer Petrischale liegt, und dann nimmt man die nächste Chromatographie nach der oben beschriebenen Methode vor. Diesmal benutzt man die silber-imprägnierten Chromatogramme, neue Dochte, und die Chromatographie wird in der Wanne vorgenommen, auf die die Glasplatte gelegt worden ist. Wenn der Flüssigkeitsrand nach $\frac{1}{2}$ -1 Stunde die äussere 6 cm-Marke erreicht hat, wird das Chromatogramm hochgenommen, der Docht entfernt, und es wird zum Trocknen in diffuses Tageslicht aufgehängt. Die "Entwicklung" des "Bildes" wird nun relativ schnell erfolgen: Im Laufe von 5-15 Min. wird man ein meist hinreichend deutliches "Bild" zur Bewertung erhalten. In Zweifelsfällen muss jedoch das endgültige Ablesen bis zum nächsten Tag verschoben werden.

Ergebnisse.

Ein Chromatogramm von Hackfleisch in gewöhnlich "gereiftem" Zustand ohne Zusatz von NaCl ist auf Fig. 2 A abgebildet. Von aussen nach innen zum Zentrum hin lassen sich folgenden Schichten unterscheiden:

1.) Eine Zone, gewöhnlich 3-6 mm breit, gelbbraun bis schwarz gefärbt. Sie dunkelt nach der Lagerung. Es ist anzunehmen, dass die Zone durch Reaktion von Silber mit Papier entsteht.

- 2.) Eine graue Zone ca. 10 - 14 mm breit. Die Farbe ist meist gleich grau, aber sie kann auch "meliert" sein.
- 3.) Ein ziemlich scharfbegrenzter grau-violetter Ring, ca. 3,6 cm vom Zentrum des Chromatogrammes. Dieser Ring entspricht der 1. Chromatographie. Man muss annehmen, dass er entsteht, wenn das Steigen von Silberionen auch nach Entfernung des Dochtes etwas weitergeht, sodass die Konzentrationen der Ione am grössten beim Übergang zu trockenem Papier wird.
- 4.) Eine rötliche Zone, die sich von der grauen Zone (Zone 2) nach innen zum Zentrum erstreckt. Sie kann Nuancen nach violett haben, besonders innen, und sie kann ganz bis zum Loch gehen oder es kann
- 5.) eine kleine weisse zentrale Zone sein.
- Wenn dem Hackfleisch 2-3% NaCl zugesetzt wird, verändert das Chromatogramm sich (Fig. 2B): Die graue Zone (Zone 2) wird schmaler, bei 2% NaCl wird sie ca. 1 mm breit. Es können einige Wellen entstehen. Die rötliche Zone (Zone 4) wird entsprechend grösser. Die violetten Farbnuancen treten meist etwas mehr hervor, besonders zur Mitte hin (a), und im äusseren Teil des Chromatogrammes kann eine Andeutung zu radialen Streifen in rötlich/rötlich-violetten Nuancen entstehen (b). Die Streifen werden jedoch nicht weiss, und sie begrenzen sich nur auf den äusseren Teil.

Zum Vergleich wird ein Chromatogramm von Hackfleisch unter Zusatz von Soyaprotein ("Profam") (Fig. 3) gezeigt. Hier entsteht eine radiale, weissliche Streifenbildung, die sich bis zur Mitte des Chromatogramms hin erstreckt. Gleichzeitig werden die Farbtöne über das ganze Chromatogramm hin violett. Zusatz von Kaseinat bringt das gleiche Bild hervor.

Diskussion:

Es zeigt sich, dass viele verschiedene Verhältnisse auf das Bild, das entstehen soll, einwirken. Die einzelnen Verhältnisse können hiernur erwähnt werden:

1. Konzentration mit AgNO_3
2. Konzentration mit NaOH
3. Papiertyp
4. Wärmebehandlung
5. Konzentrationen mit Fleisch/NaOH
6. pH
7. Zusatz von NaCl
8. Menge und Art des Fremdproteins
9. Der Fleischzustand

Ad 6. Der pH-Wert ist beim ersten Filtrat gemessen worden, also vor der Erwärmung. Bei einem Auszug von "reifem" Hackfleisch mit 0,05% NaOH wird der pH-Wert gewöhnlich um 6,6 - 6,7 liegen, mit Abweichungen nach unten bis ca. 6,4 und nach oben bis ca. 6,9 - 7.

Ad 7. Die salzlöslichen Proteine, die in das Filtrat kommen, variieren offenbar stark entsprechend der Menge des NaCl-Zusatzes. Bei Fleisch, das "überreif" wird - sich dem Verderben nähert - kann eine Streifenbildung auch bei etwas höherem Salzgehalt auftreten - z.B. 2-3% NaCl. Aber wenn das Fleisch frisch und im rechten Reifezustand ist, verschwindet die Streifenbildung bei Zusatz von 1,5 - 2% NaCl zum Hackfleisch. Die innere Zone (Zone 4) bekommt dann eine gleichmässige rötliche Farbe, eventuell tritt eine kleine, ungleichmässig geformte violette Partie zentral auf.

Ad 8. Wenn dem Hackfleisch Fremdprotein in steigender Menge zugesetzt wird, steigen die Streifenbildungen: Die Streifen werden weisser und häufiger, Fig. 3.

Ad 9. Wenn schlachtfrisches Fleisch zerhackt und nach der beschriebenen Methode untersucht wird, bekommt man ein Chromatogramm mit Streifenbildung, das zum Verwechseln der Streifenbildung von Fremdproteinen gleicht. Auch der Farbton bleibt der gleiche (violett) (Fig. 4 A). Nachdem das Fleisch "gereift" ist, z.B. durch Lagerung bei Zimmertemperatur über 1-2 mal 24 Stunden, nimmt die Streifenbildung ab und verschwindet (Fig. 4 B). Auf dieser "Stufe" hält sich das Hackfleisch einige Zeit, bis es "überreif" wird und nach und nach verdirbt. Dann tritt die Streifenbildung und der violette Farbton wieder auf (Fig. 4 C).

Andere Zusätze, die das Chromatogramm verändern:

I Natriumcitrat ("Permit")

Die äussere Zone mit den gleichmässigen Spitzen, Zone 2, ist mittelbraun, und die ganze innere Partie zeigt eine Streifenbildung, die nicht weiss enthält, sondern "weiche" Übergänge in violette/violettrote Farbtöne, Fig. 5.

II Ascorbinsäure

Hackfleisch mit Zusatz von 0,5% Ascorbinsäure ergibt das Chromatogramm in Fig. 6 A. Ausserdem wurde noch 2% NaCl zugesetzt, Fig. 6 B. Das Auffälligste sind die Farbtöne. Grau und gelb beherrschen das Bild, gelb in der Mitte. Der Zusatz an Ascorbinsäure gab sich schon im Laufe der Chromatographie zu erkennen: Während der Hackfleischextrakt durch den Docht hochstieg und sich ringförmig auf das mit AgNO_3 imprägnierte Chromatographiepapier ausbreitete, wurde das Papier augenblicklich gelb

und schwarz gefärbt. Die Farben wurden mit der fortschreitenden Flüssigkeitsfront allmählich etwas schwächer bis das Chromatogramm seine endgültige Größe bekam und "entwickelt" wurde.

III Trockenmilch

Fig 7 A und B zeigen die gewöhnliche Bilder von Fleisch mit Zusatz von Fremdproteinen. Um nicht mit einem "unreifen" Bild zu verwechseln, wurde das Fleisch 24 Stunde im Labor gelagert, wonach der pH-Wert von 6,6 auf 6,0 gesunken war (leicht gärbare Lactose). Die Streifung war fortwährend da, Fig. 6 C. Der Zusatz von 0,8% Trockenmilch entspricht ca. 0,3% Fremdprotein, d.h. ein sehr niedriger Zusatz, der doch im Chromatogramm sich nachweisen lässt.

Litteratur.

1. Jebsen Haave, I.-J. und Bj. Aalvik (1980):
Eine chromatographische Schnellmethode zum Nachweis von Fremdproteinen in Hackfleisch.
Archiv für Lebensmittelhygiene, H. 1, 16-22.
2. Jebsen Haave, I.-J. und Bj. Aalvik
Zum Nachweis von Natriumcitrat, Trockenmilch und Ascorbinsäure in Hackfleisch mit einer einheitlichen chromatographischen Schnellmethode.
Archiv für Lebensmittelhygiene (Im Druck)

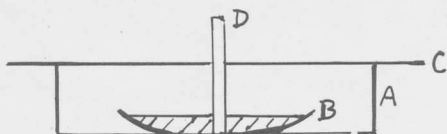
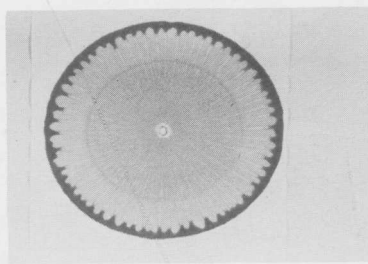
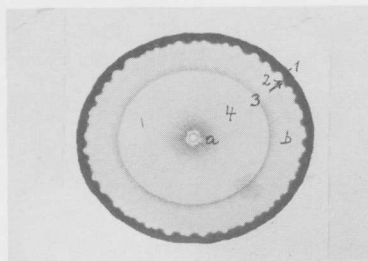
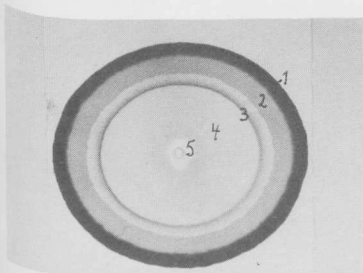


Fig. 1: Skizze (Querschnitt). A. Petrischale. B. Uhrglas mit AgNO_3 -Lösung. C. Chromatogramm.



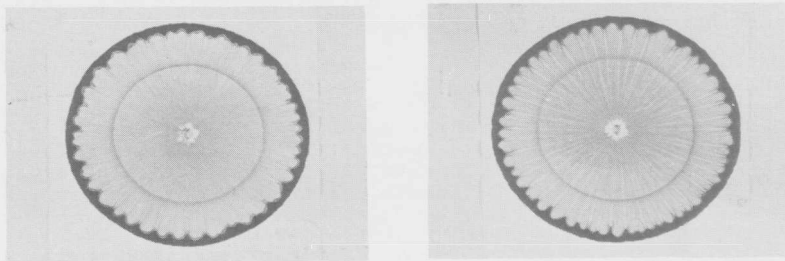
A

B

C

Fig. 2: "Gereiftes" Hackfleisch. Die Zonen. A. Ohne Zusatz von NaCl . B. Mit Zusatz von 2% NaCl .
a. Violett. b. Rötlich/rötlich-violett mit Andeutungen zu Streifenbildung.

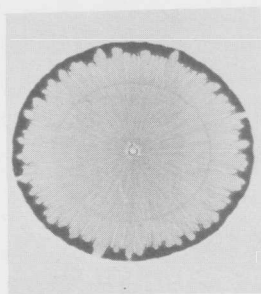
Fig. 3: Hackfleisch mit Zusatz von 2% NaCl und 1% Soyaprotein ("Profam").



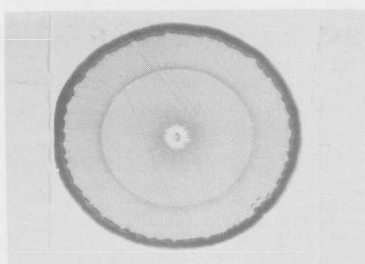
A

B

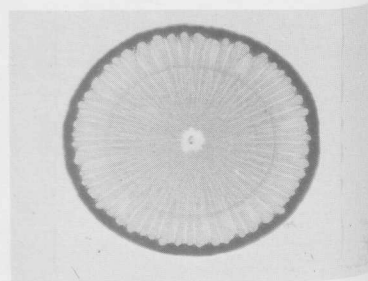
Fig. 3: Hackfleisch mit Zusatz von Kaseinat ("Rovita"). Beide sind 2% NaCl zugesetzt. A. $\frac{1}{2}$ % Kaseinat. B. 1% Kaseinat.



A

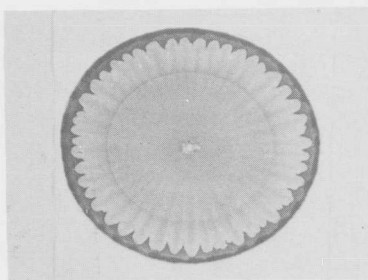


B

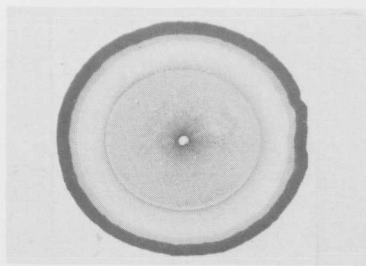


C

Fig. 4: A. Ungereiftes Fleisch. B. Dasselbe fleisch wie B, ca. 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. C. Verdorbenes Fleisch. - Alle Proben sind 2% NaCl zugesetzt.



A



B

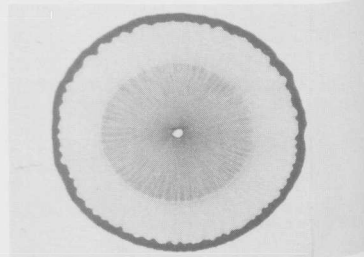
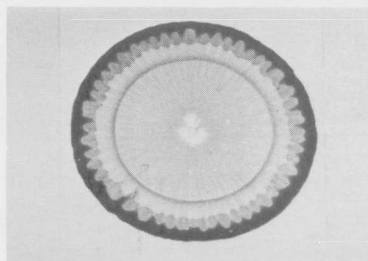
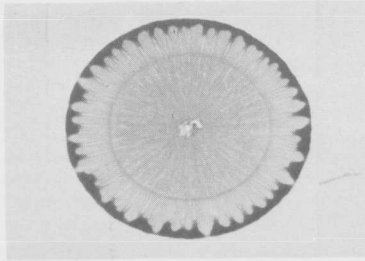


Fig. 5: Hackfleisch mit Zusatz von "Permit" (Natriumcitrat) und NaCl.

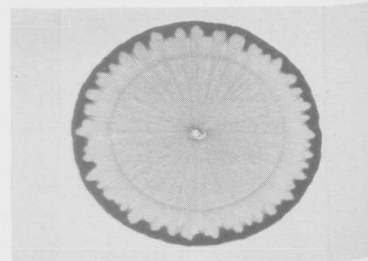
Fig. 6: Hackfleisch mit Zusatz von 0,5% Ascorbinsäure. A. Ohne Zusatz von NaCl. B. Mit Zusatz von 2% NaCl.



A.



B.



C.

Fig. 7: Hackfleisch mit Zusatz von Trockenmilch. A. Mit Zusatz von von ca. 0,5% NaCl. B. Mit Zusatz von ca. 2,5% NaCl. C. Ca. 24 Stunden bei Zimmertemperatur gelagert. Mit Zusatz von ca. 2,5% NaCl.