

ZDZISŁAW ZAWADZKI

Badania nad właściwościami proteolitycznymi mikroflory powierzchniowej mięsa mrożonego

Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej,
Plac Grunwaldzki 9, 50-377 Wrocław

Liczni autorzy wskazują na udział ektoenzymów proteolitycznych w rozkładzie gnilnym mięsa zwierząt rzeźnych, drobiu i ryb oraz na fakt, że niebiałkowe związki azotowe i poszczególne białka mięsa są rozkładane w różnym zakresie, w określonej kolejności i ze zmienną wydajnością, zależnie od specyficzności i aktywności działania enzymów wytwarzanych przez bakterie z poszczególnych grup taksonomicznych (2, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 14, 16, 18, 19, 21, 22). Stwierdzono również, że większość bakterii psychrofilnych wytwarza bardzo aktywne enzymy proteolityczne (1, 12, 14, 23, 24). W poprzednich pracach (23, 25) wykazano, że w miarę upływu czasu przechowywania zamrażalniczego, dochodzi do postępującej dominacji bakterii psychrofilnych w mikroflorze powierzchniowej mięsa mrożonego, co powiększa zagrożenie wystąpienia jego gnicia w okresie niewłaściwie przeprowadzonego rozmrażania lub po rozmrożeniu. Zagrożenie takie istnieje m. in. dlatego, że enzymy proteolityczne są często wytwarzane przez bakterie psychrofilne w temperaturze zbliżonej do temperatur minimalnych ich wzrostu i są odporne na działanie temperatur stosowanych w zamrażalnictwie żywności, a ich aktywność jest zwykle największa w temperaturach wyższych, najczęściej powyżej temperatur optymalnych dla ich wzrostu. Przykładem może być *Pseudomonas fluorescens*, który wytwarza największą ilość enzymów proteolitycznych w temp. 0°C, które są najaktywniejsze w temp. 25°C (18).

Na tle przedstawionych faktów należy stwierdzić, że specyficzności działania ektoenzymów nie uwzględniają metody laboratoryjne, stosowane do oznaczania właściwości proteolitycznych bakterii izolowanych z produktów żywnościowych. Najczęściej stosowany jest test z kazeiną, a przede wszystkim z żelatyną, chociaż wytwarzanie żelatynazy nie jest wystarczającym wskaźnikiem, że badany szczep może hydrolizować białko. Niektórzy autorzy stosowali więc dodatkowo jeszcze jeden test, jak np. ze zhomogenizowaną zawiesiną tkanki mięśniowej (22) czy z białkiem jaja kurzego (16). Wyjątkiem w tym względzie jest praca Sikesa i Maxcy'ego (19), którzy przy badaniu właściwości proteolitycznych szczepów bakterii wyizolowanych z mięsa kurcząt zastosowali oprócz testu z żelatyną również testy z białkiem jaja kurzego, białkami sarkoplazmy oraz z kazeiną i z trzema jej frakcjami.

Celem niniejszych badań było oznaczenie i porównanie właściwości proteolitycznych szczepów bakterii wyizolowanych z powierzchni mrożonego mięsa po pierwszym oraz po siódmym miesiącu przechowywania w komorze chłodni składowej. W badaniach zastosowano metodę płytkową, a jako substratów testowych użyto różnego rodzaju białek, aby w ten sposób dokonać równocześnie różnicowania szczepów pod względem specyficzności działania wytwarzanych przez nie enzymów proteolitycznych. Uznano bowiem, że taka ocena w stosunku do mikroflory mięsa mrożonego ma istotne znaczenie, ponieważ może ona stanowić czynnik szkodliwy, utajony w niskich temperaturach składowania zamrażalniczego (23, 24).

Materiał i metody

Badaniom poddano szczepy bakterii wyizolowane metodą wysiewów odciskowych (23) na agarze odżywczym z powierzchni ćwierćtuszy mrożonego mięsa wołowego, przechowywanego w komorze chłodni składowej o temperaturze powietrza wynoszącej -18 do -21°C. Łącznie wyizolowano 400 szczepów, w tym 200 szczepów po pierwszym oraz 200 szczepów po siódmym miesiącu przechowywania mięsa. Warunki przechowywania mięsa oraz metody izolowania kolonii opisano poprzednio (25).

Właściwości proteolityczne szczepów bakterii oznaczano na następujących podłożach.

1. Podłoże z białkami sarkoplazmy. Rozpuszczalne w wodzie białko sarkoplazmy otrzymywano z mięsa wołowego metodą Hegarty'ego i wsp. (10) w modyfikacji Hasegawy i wsp. (9). W celu otrzymania podłoża, 1 g zliofilizowanego ekstraktu rozpuszczano w 80 ml wody destylowanej, wyjaławiano sączeniem przez sączkę membranową Millipore HA o porach średnicy $0,45 \pm 0,02 \mu\text{m}$, a otrzymany przesącz ogrzewano na łaźni wodnej do temperatury ok. 45°C, dokładnie mieszano ze 100 ml upłynnionego 2,7% agaru odżywczego o temp. 45–48°C i rozlewano na płytki Petriego.

2. Podłoże ze zhomogenizowaną zawiesiną tkanki mięśniowej wg Pohji i wsp. (cyt. 22).

3. Podłoże Frazier'a i Rupp'a z kazeiną (7).

4. Podłoże plate count agar „Oxoid” z dodatkiem sproszkowanego mleka odtłuszczonego wg Martley'a i wsp. (15).

5. Agar odżywczy z 0,4% Bacto-Gelatine „Difco” do oznaczania żelatyny metodą Frazier'a w modyfikacji Smitha (wg 20).

Sposób wykonywania testów. Badane szczepy bakterii posiewano pasmowo na powierzchni wymienio-nych podłoży, inkubowano je w 18–22°C przez 48–96 h, a następnie dobrze wyrosłą hodowlę zalewano 8–10 ml odczynnika Frazier'a (cyt. 5). Odczynnik Frazier'a można zastąpić 30% roztworem kwasu trójchlorooctowego (17), nasyconym roztworem wodnym siarczanu amonowego (20), a także stosowane są inne odczynniki.

Wyniki testów odczytywano w następujący sposób:

a) proteoliza zupełna (++) = strefa przejrzystego podłoża wokół kolonii, tym szersza im enzym działa energiczniej,

b) proteoliza częściowa (+) = strefa niezupełnie przejrzystego podłoża wokół kolonii, jako wynik wybiórczej hydrolizy pewnych frakcji testowanego białka,

c) szczep nie posiada właściwości proteolitycznych (-) = brak zmian podłoża opisanych w punktach a i b.

Wyniki i omówienie

Liczby szczepów dających z poszczególnymi białkami i żelatyną wyróżniane wyniki testów zestawiono w tab. 1. Wyniki badań wskazują na większą aktywność proteolityczną mikroflory wyizolowanej po siedmiu miesiącach przechowywania mięsa, przy czym wzrost aktywności szczepów wyrażał się odmiennie w stosunku do poszczególnych białek. Dla białek sarkoplazmy wykazano prawie dwukrotny wzrost liczby szczepów wywołujących ich proteolizę zupełną, przy prawie takim samym zmniejszeniu się liczby szczepów wywołujących proteolizę częściową i w ten sposób suma szczepów obu grup wzrosła nieznacznie, bo z 68% do 75%. Natomiast zarówno proteolizę zupełną, jak i częściową białek tkanki mięśniowej wywoływało więcej szczepów, a suma szczepów dających oba rodzaje proteolizy wzrosła wyraźniej, bo z 50,5% do 68,5% ogółu szczepów. Obserwowano również pewien wzrost aktywności proteolitycznej w stosunku do kazeiny i mleka, przy czym dla kazeiny wyrażał się on większą liczbą szczepów wywołujących jej proteolizę zupełną przy równoczesnym zmniejszeniu się liczby szczepów wywołujących jej proteolizę częściową, a dla mleka nieznacznie zwiększyły się liczby szczepów obu grup. W konsekwencji, suma szczepów obu

grup wzrosła dla kazeiny z 67% do 71,5%, a nieco wyraźniej dla mleka, bo z 63% do 77,5%. W wyniku tych zmian liczby szczepów nieproteolitycznych były zbliżone w stosunku do wszystkich białek i wynosiły od 22,5% do 31,5%.

Wyniki oznaczeń właściwości proteolitycznych poszczególnych szczepów w stosunku do wszystkich testowanych białek i żelatyny, pozwoliły natomiast na dokonanie podziału szczepów na cztery grupy (tab. 2). Grupę I utworzono ze szczepów wywołujących zupełną proteolizę wszystkich testowanych związków. Do grupy II zaliczono szczepy wywołujące zupełną lub częściową proteolizę wszystkich białek, niezależnie od wyników testów z żelatyną. Grupę III utworzono ze szczepów o wyraźnie zróżnicowanych właściwościach proteolitycznych w stosunku do poszczególnych białek i żelatyny, z którymi dawały one dodatnie względnie ujemne wyniki testów. Można wnioskować, że szczepy z tej grupy wytwarzają enzymy o większej substratowej specyficzności niż szczepy z obu grup poprzednich. Do grupy IV zaliczono szczepy dające ujemne wyniki testów z wszystkimi związkami. Należy dodać, że grupy II i III nie były grupami jednorodnymi, ponieważ w ich obrębie można było wyróżnić podgrupy szczepów różniących się pomiędzy sobą wynikami testów z poszczególnymi związkami. Uzyskane wyniki badań wskazują więc na wyraźne zróżnicowanie spektrum działania enzymów proteolitycznych, wytwarzanych przez szczepy tworzące mikroflorę powierzchniową mięsa mrożonego. Natomiast o większej aktywności proteolitycznej szczepów wyizolowanych po siedmiu miesiącach przechowywania mięsa świadczą większe ilości szczepów zarówno grupy I, jak i II (tab. 2).

Wyniki badań wskazują również, że zastosowanie testu tylko z jednym białkiem może pociągnąć za sobą ryzyko nieprawidłowej oceny proteolitycznych właściwości poszczególnych szczepów, a tym samym całej badanej mikroflory. Dopiero odpowiedni dobór białek i ustalenie niezbędnej ich liczby zmniejszającą możliwość pominięcia szczepów proteolitycznych. Można uznać, że warunek ten spełniono w niniejszych badaniach.

Piśmiennictwo

1. Arpai J., Lifkova Z.: Chem. zvesti 15, 218, 1961.
2. Borton R. J., Bratzler L. J., Price J. F.: J. Fd Sci. 35, 779, 1970.
3. Borton R. J., Bratzler L. J., Price J. F.: J. Fd Sci. 35, 783, 1970.
4. Borton R. J., Webb N. B., Bratzler L. J.: Fd Technol. 22, 94, 1968.
5. Cowan S. T., Steel K. J.: Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press, 1975.
6. Dainty R. H., Shaw B. G., DeBoer K. A., Scheps E. S. J.: J. appl. Bact. 39, 73, 1976.
7. Frazier W. C., Rupp P.: J. Bact. 16, 57, 1928.
8. Gibbs P. A., Patterson J. T., Harper D. B.: J. Sci. Fd Agric. 30, 1109, 1979.
9. Hasegawa T., Pearson A. M., Price J. F., Rampton J. H., Lechowich R. V.: J. Fd Sci. 35, 720, 1970.
10. Hegarty G. R., Bratzler L. J., Pearson A. M.: J. Fd Sci. 28, 525, 1963.
11. Jau J. M.: Appl. Microbiol. 15, 943, 1967.
12. Jau J. M.: J. Milk Fd Technol. 35, 467, 1972.
13. Jay J. M., Konton K. S.: Appl. Microbiol. 15, 759, 1967.
14. Jay J. M., Shelef L. A.: J. agric. Fd Chem. 24, 1113, 1976.

Tab. 1. Wyniki testów z poszczególnymi białkami i żelatyną

Przechowywanie po	Wynik testu	Białka				Żelatyna
		sarkoplazmy	ciężko mięśniowej	kazeiny	mleka	
1 miesiąc	proteoliza zupełna	50	32	62	43	98
	proteoliza częściowa	86	69	72	93	0
	brak proteolizy	64	99	66	64	102
7 miesięcy	proteoliza zupełna	104	53	91	54	122
	proteoliza częściowa	46	84	52	101	0
	brak proteolizy	50	63	57	45	78

Objaśnienie: w rubrykach podano liczby szczepów dających określone wyniki testów.

Tab. 2. Właściwości proteolityczne szczepów bakterii wyizolowanych z powierzchni mięsa mrożonego

Przechowywanie po	Grupy szczepów (właściwości proteolityczne)			
	I (B ++; Z ++)	II (B ++; +; Z ++; -)	III (B ++; +; -; Z ++; -)	IV (B -; Z -)
1 miesiąc	31	65	52	52
7 miesięcy	46	74	41	39

Objaśnienia: B = białka, Z = żelatyna, ++ = proteoliza zupełna, + = proteoliza częściowa, - = brak proteolizy. W rubrykach podano liczby szczepów zaliczonych do poszczególnych grup.

15. Martley F. G., Jayashankar S. R., Lawrence R. C.: J. appl. Bact. 33, 363, 1970.
16. Maxcy R. B., Froning G. W., Hartung T. E.: Poult. Sci. 52, 486, 1973.
17. Pitt T. L., Dey D.: J. appl. Bact. 33, 687, 1970.
18. Prost E.: Higiena mięsa. PWRiL, 1975.
19. Sikes A., Macey R. B.: J. Fd Sci. 44, 1228, 1979.
20. Society of American Bacteriologists: Manual of Microbiological Methods. McGraw-Hill Book Co., New York, 1957.
21. Tarrant P. J. V., Jenkins N., Pearson A. M., Dutton T. R.: Appl. Microbiol. 25, 996, 1973.
22. Wellhäuser R.: Untersuchungen über einige mikrobielle Vorgänge bei der Rohwurstherstellung. Praca dokt. München, 1963.
23. Zawadzki Z.: Weterynaria, Wrocław 22, 117, 1967.
24. Zawadzki Z.: Medycyna Wet. 28, 682, 1973.
25. Zawadzki Z.: Medycyna Wet. 29, 171, 1973.

Adres autora: doc. dr hab. Zdzisław Zawadzki, ul. Damrota 35 m. 1, 50-306 Wrocław.

Завадский З. — Исследования протеолитических свойств поверхностной флоры замораживаемого мяса

Цель исследований состояла в определении и сравнении протеолитической активности 400 штаммов бактерий, изолированных с поверхности четвертин замораживаемой говядины через 1 и 7 месяцев ее хранения в темп. -21 до -18°C . Протеолитические свойства штаммов определялись плеточным методом с 4 белками (растворяемыми в воде белками саркоплазмы, суспензией мышечной

ткани, казеином и обезжиренным молоком) и с желатином. Отметилось, что изолированные штаммы образовали протеолитические эктоэнзимы с отчетливо дифференцированным спектром действия на тестируемые соединения. На этой основе штаммы были разделены на 4 основные группы. Показана также большая протеолитическая активность микрофлоры, изолированной через 7 месяцев хранения мяса, причем рост активности выражался по-разному относительно отдельных белков.

Zawadzki Z. — Proteolytic characteristics of surface microflora of frozen meat

The purpose of the work was to determine and compare the proteolytic activity of 400 bacterial strains isolated from the surface of frozen beef after 1 and 7 months of its storage between -21° to -18°C . Proteolytic properties were designated by using plate technique with four proteins (sarcolemmal protein solved in water, suspension of muscular tissue, casein, and skim milk) and gelatine. It was found the strains produced proteolytic ectoenzymes acting in different way on the compounds examined. On the basis of the findings, the strains were divided in four basic groups. Besides, a higher proteolytic activity of the microflora was noticed after 7 months of meat storage, but an increased activity was different in relation to individual proteins.

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

MARIAN TISCHNER

Przeszczepianie zarodków u koni^{*)}

Institut Stosowanej Fizjologii Zwierząt AR, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

W ostatnich latach zarysowały się nowe możliwości zwiększenia plenności zwierząt na drodze przeszczepiania zarodków od wybranych osobników samicom o mniejszej wartości hodowlanej. Metoda ta znalazła już praktyczne zastosowanie w hodowli bydła, natomiast u koni pozostaje nadal w stadium początkowym. Budzi ona duże zainteresowanie hodowców ze względu na otwierające się możliwości zarówno jakościowego i ilościowego wykorzystania elitarnego materiału koni.

Przeszczepianie zarodków u koni posiada stosunkowo krótką historię. Pierwsze próby przeprowadzono niemal równocześnie w Anglii i Japonii w 1972 r. Allen i Rowson (2) przeszczepili metodą krwawą 19 zarodków hybrydów uzyskanych z kojarzeń koni z osłami, w wyniku czego otrzymali jedną ciążę muła u osłicy oraz dwie ciążę osłomuła u klaczy. W tym samym czasie Oguri i Tsutsumi (8) wypłukali z jednego rogu macicy w sposób bezkrwawo 23 (45%) zarodków na 60 zabiegów, z których 11 przeszczepili również bezkrwawo do 11 klaczy biorczyń, jednak żadna z tych klaczy nie została żrebna.

^{*)} Praca wykonana w ramach problemu MR II 10.1.A-4.

Następnie Oguri (7) oraz Oguri i Tsutsumi (9) zmodyfikowali sposób pozyskiwania zarodków poprzez płukanie całej macicy. Uzyskali tą drogą od 20 klaczy 18 (90%) zarodków, z których 15 przeszczepili częściowo w sposób krwawy aparatem Sugie (11) poprzez pochwę z ominięciem szyjki macicznej, bezpośrednio do rogu macicy odpowiadającemu jajnikowi, na którym wcześniej stwierdzono owulację. Sześć klaczy (40%) zostało żrebnych: 2 z nich następnie poroniły, a 4 urodziły zdrowe żrebięta. Kolejno Allen i Rowson (3) przeprowadzili kilka udanych prób przeszczepiania zarodków metodą krwawą i bezkrwawą.

Następnym udanym eksperymentem przeszczepiania zarodków była międzynarodowa wymiana zarodków pomiędzy Anglią a Polską w 1975 r. (4). Od klaczy w Cambridge pozyskano metodą krwawą zarodki, które przewieziono do Krakowa w podwiązanych jajowodach królików. Po 48 godzinach przebywania zarodków w królikach przeszczepiono je 4 klaczom. Trzy klacze zostały żrebne, a następnie 2 z nich urodziły zdrowe żrebięta, w tym klacz „Mrożonka” (pierwszy koń urodzony w Polsce w wyniku użycia do inseminacji nasienia mro-