

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS DER BRÜHTEMPERATUR AUF DIE
BAKTERIENFLORA DER BRÜHWURST

von

F.P. Niinivaara

Forschungsanstalt der Genossenschaftlichen Schlachthöfe,
Hämeenlinna, Finnland

Brühwurst birgt auf Grund von Ausgangsmaterialien und Herstellungsgepflogenheiten alle Voraussetzungen zu bakteriellem Verderb bereits schon in weitgehendem Masse in sich. Nach gewerbeüblichem Brauch wird zur Herstellung der Brühwurst frisches, nicht ausgereiftes und dabei gutbindiges Fleisch unter Zusatz von Wasser bevorzugt verwendet. Es stellt wegen seines günstigen pH-Wertes und hohen Wassergehaltes, zumal in zerkleinertem Zustande, einen ausgezeichneten Nährboden für das Bakterienwachstum dar. Diese Verhältnisse werden noch durch die während der Verarbeitung herrschenden Temperaturen, die auftretende Verschiebung des pH-Wertes nach der alkalischen Seite hin, und das Absinken des Redoxpotentials begünstigt (39).

Die Bakterienflora frischgeschlachteten Fleisches besteht im wesentlichen aus Angehörigen folgender Gattungen: *Achromobacterium*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Gaffkya*, *Neisseria*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Proteus*, fäkale Streptokokken, Thermobakterien, Bazillen und Clostridien (14). Sie entstammen entweder direkt dem Darmtraktus des geschlachteten Tieres (Clostridien, coliforme Flora, fäkale Streptokokken) oder sind während der Fleischgewinnung infolge Verunreinigung durch Kontaktinfektion (Luft, Erde, Wasser) oder Tröpfcheninfektion auf das Fleisch gelangt. Diese ursprüngliche Flora erfährt durch fortgesetzte Infektion im Verlaufe der Wurstherstellung und durch die Zugabe von Wurstzutaten, wie z.B. Milchpulver, Mehl, Salz, Nitrat, Nitrit und Gewürzen, eine weitere

Vermehrung ihrer Bakterienarten (u.a. Mikrokokken, Bazillen, Clostridien, Laktobazillen). Die Art und Menge der Bakterien in der Wurst wird also von der Fleischgewinnung und dessen Weiterbehandlung abhängig sein. Mitglieder dieser Flora konnten denn auch aus Würsten der verschiedensten Art isoliert werden (40,43,48).

Die in der Fleischwirtschaft gebräuchlichen Konservierungsmittel, wie z.B. Kochsalz, Nitrat, Nitrit und Gewürze, sind in den Konzentrationen, in welchen sie in der Wurst verhanden sind, nicht in der Lage, eine Entkeimung des Substrates herbeizuführen. Sie wirken mehr bakteriostatisch als bakterizid und machen die Keime vielleicht einer leichteren Abtötung durch die Hitze zugänglich.

Man nimmt an, dass das Salz in den gebräuchlichen Konzentrationen zwar nicht bakterizid wirkt, wohl aber einen weitgehenden Schutz, vor allem gegen die fäulniserregenden Keime gewährt. Salztolerante Keime, wie die Achromobakterien, halophilen Mikrokokken bzw. Streptokokken und Laktobazillen, bleiben unbeeinflusst.

Räucherung und Räucherzeiten, wie sie bei Brühwurstherstellung üblich sind, hemmen zwar das Bakterienwachstum, sie sind aber für sich allein auch nicht imstande, eine Fäulnis des Wurstgutes zu unterbinden. Ihre Wirkung besteht dabei weniger in der Reduzierung des Feuchtigkeitsgehaltes; vielmehr muss den stark keimwidrigen Substanzen des Rauches, vor allem Formaldehyd, Diacetyl, Acetaldehyd u.a., ein gewisser keimhemmender Effekt zugeschrieben werden. Er wird sich vermutlich nur auf die Oberfläche erstrecken und erst nach längerer Einwirkung auch die tiefer gelegenen Teile der Wurst erfassen (22). Man nimmt sogar an, dass zu Beginn der Räucherung in Würsten eine gewisse Bakterienanreicherung erfolgt (10).

Vom Nitrit ist bekannt, dass es in den zulässigen Höchstkonzentrationen (0,02 %) das Wachstum verschiedener Bakterien, speziell bei pH-Werten um 6,0 herum zu verzögern vermag.

Mikrokokken werden jedoch davon kaum betroffen. Es ist auch daran zu denken, dass während des Brühens das Nitrit durch die Hitze teilweise zerstört wird.

Daneben sollen die Bakterien auch der Wirksamkeit der in Gewürzen enthaltenen Stoffe - in der Hauptsache ätherische Öle - unterliegen. Diese Ansicht wird jedoch von verschiedenen Seiten bezweifelt. Ein Teil der Forscher neigt sogar dazu, Gewürzen jegliche desinfizierende Kraft abzusprechen, und betrachtet sie, wenn sie in ungereinigtem Zustande den Würsten zugesetzt werden, sogar als Keimreservoir (42,37).

Interessant ist in diesem Zusammenhang eine englische Mitteilung, welche besagt, dass ein hoher Zusatz an kohlenhydrathaltigen Produkten zum Wurstgut das Grundsubstrat Fleisch derart verändert, dass die proteolytische, typische Fäulnisflora des Fleisches durch Laktobazillen und Hefen verdrängt werden kann (15).

In Brühwürsten wird immer eine Mischflora vorhanden sein. Sie unterliegt in ihrer Zusammensetzung nicht nur der selektiven Wirkung ihres potenziellen Substrates, sondern beeinflusst sich aller Wahrscheinlichkeit nach auch gegenseitig. So werden die fäkalen Streptokokken als Wegbereiter für die Clostridien angesehen, weil sie das Redoxpotential des Nährbodens soweit reduzieren, dass dann auch die strikten Anaerobier rasch zu wachsen vermögen (15). Ähnliches wird von den Bazillen des Subtilis-Mesentericus Gruppe angenommen. Sie sollen ebenfalls für das Wachstum der Fäulniskeime günstige Bedingungen schaffen (44).

Ausserdem produzieren gewisse Keime antibiotische Stoffe, mit deren Hilfe sie andere Keime weitgehend in ihrem Wachstum schädigend beeinflussen können (B. subtilis, Pseudomonas fluorescens u.a.). Von gewissen, halophilen Mikrokokken weiss man, dass sie über antagonistische Eigenschaften gegenüber Fäulniskeimen verfügen sollen. So berichten u.a. NIINIVAARA und POHJA (38) über die antagonistische Wirkung eines Mikro-

kokkenstammes (M53). In Kulturversuchen verhinderte er das Wachstum von 9 Mikrokokkenarten, 2 Sarzinen, 5 Achromobakterienarten und verschlechterte das Wachstum von Bazillen. Lakto-bazillen blieben unbeeinflusst.

Die Bakterienflora der Brühwurst darf deshalb nicht als etwas konstantes angesehen werden, sondern muss als variabler Begriff aufgefasst werden. Der anzustrebende Idealzustand wäre natürlich ein keimfreies Produkt. Wie schon erwähnt, reichen aber weder Salzgehalt, Nitrit, Vortrocknung und Räucherung aus, auch wenn man eine synergistische Steigerung ihrer Wirksamkeit zu Betracht zieht, um Fäulniserscheinungen vollständig zu unterdrücken.

Von ausschlaggebender Bedeutung für die Haltbarkeit des fertigen Produktes muss deshalb das Brühen sein. Wenn sich auch hiermit keine vollständige Keimfreiheit erzielen lässt, so werden doch bei richtiger Handhabung die meisten, vor allem pathogenen, Wurstfehler und Verderbnis erzeugenden Bakterienarten ausgeschaltet.

Für die Höhe der Brühwursttemperatur und die Dauer ihrer Einwirkung können jedoch nicht allein Überlegungen hygienischer Art bestimmend sein. Es müssen dabei auch fabrikationstechnische Gesichtspunkte berücksichtigt werden. Zu hohe und zu lange Brühzeiten sind unangebracht, weil sie ein Einlaufen, Schrumpfen und Schrumpfeligwerden und das Platzen des Darmes zur Folge haben können. Daneben bewirken sie ein zäheres Produkt. Sie durften unter Umständen sogar einen stimulierenden Einfluss auf die bakterielle Vitalität ausüben. Ausserdem leiden bei derartigen Praktiken Konsistenz, Schnittfestigkeit und Farbhaltung (34). Aus diesen und ähnlichen Überlegungen heraus haben sich in der Praxis allgemein Brühtemperaturen zwischen 65-82° eingebürgert.

Die Dauer des Brühens richtet sich dabei in erster Linie nach dem Kaliber der Wursthülle und nach den Anforderungen, welche an die Wurst im Bezug auf Geschmack und Haltbarkeit gestellt

werden. So glaubt man, dass eine Temperatur von 72° oder höher für die Dauer von mindestens 10 Minuten, ein weitgehendes Mass an Sicherheit gegen das Schleimigwerden von Frankfurter Würstchen darstellt. Danach sollen auch Brühzeiten bis zu 2 Stunden ausgedehnt, keinen nennenswerten Vorteil gegenüber solchen von 10 Min. Dauer einbringen (27). NORTON und RODERICK (33) stellten fest, dass schon eine Temperatur von $73,9^{\circ}$ allerdings für 15-20 Min. aufrecht erhalten, eine ziemliche Gewähr gegen das Auftreten von Kokken nach dem Brühen liefert. Für Bolognawürste werden Brühtemperaturen als ausreichend erachtet, welche Innentemperaturen von $57,2-65,6^{\circ}$ bzw. 58°C garantieren. NIVEN hält auf Grund seiner Versuche Temperatur von $65,5^{\circ}\text{C}$ im Wurstinneren für notwendig, wenn dem Vergrünen vorgebeugt werden soll (29). Nach anderen Mitteilungen waren im Fleischkäse Temperaturen bis 71° erforderlich, um Salmonella und Streptokokken abzutöten. Kokken überlebten, wurden jedoch in ihrer Menge erheblich reduziert (28,47).

RASCHKE (31) fordert für Brühwürste, ganz gleich welche Art und welchen Kalibers, Kerntemperaturen von 75°C , um Fäulniserscheinungen und Wurstfehler weitgehendst zu unterdrücken.

So kann es auch nicht überraschen, wenn im Schrifttum über Bakterienfunde in fertigen Brühwürsten berichtet wird. U.a. isolierten ZANCHUCCI (50) und Mitarbeiter aus Bolognawurst 2 Keime der Subtilis-Mesentericus Gruppe und einen Angehörigen der Enterococcen, NIVEN (30) wiederholt Laktobazillen als Zufallsbefund in Bolognawurst eine Bakterienart, welche er zur Enterococcus-Gruppe gehörig betrachtete. Von BENZE (4) wurden sowohl in aus Freibankfleisch wie auch in solchen aus gesundem Fleisch hergestellten Würsten nur Kokken und Keime der Subtilis-Mesentericus Gruppe festgestellt. Nach MOULTON und LEWIS (27) überstehen nur grampositive, thermoresistente Sporen- und Nicht-Sporenbildner die Brühtemperatur, gramnegative Organismen gehen zugrunde.

"Über den Bakteriengehalt in Brühwurstbrät liegen Zahlen vor (11 u.a.), die von 100 Mill. bis 138,4 Mrd./g Keimen sprechen. Der Verfasser glaubt, dass der Keimgehalt des Wurstbrätes etwa dem der Oberfläche unbearbeiteten Fleisches gleichkommt. In "Meat through the Microscope" (27) ist der Bakteriengehalt der Frankfurter Würstchen und dessen Veränderungen während des Herstellungsprozesses angegeben. Nach Meinung KNORRs (21) könnten in Brühwürsten Keimzahlen bis zu einer Million noch toleriert werden, ohne dass gegen die Genusstauglichkeit Einwände zu erheben wären.

Von entscheidender Bedeutung für die Höhe und Dauer der Brühwursttemperatur ist die Hitzeresistenz derjenigen Bakterienarten, mit deren Vorkommen in Brühwurst zu rechnen ist. Sie stellt keine festumrissene Grösse dar, sondern wird im einzelnen von vielen Faktoren mitbestimmt. Es ist deshalb sehr schwierig, diesbezüglich eine erschöpfende Aussage zu machen. Allgemein gesprochen ist sie von der Hitzekoagulation des Zellplasmas und der Inaktivierung bzw. der Zerstörung der zelleigenen Bakterienfermente abhängig. Es kann generell zwischen drei Faktorengruppen unterschieden werden; und zwar (41)

- 1) der bakterieneigenen bzw. der artspezifischen Widerstandsfähigkeit,
- 2) den Einflüssen des Milieus, wie diese während Wachstum und Vermehrung wirksam sind. Hierzu zählen das Alter, die Inkubationstemperatur, sowie Feuchtigkeitsgehalt und Zusammensetzung des Nährbodens,
- 3) Entscheidende Bedeutung dürfte der Einwirkung der Umgebung während der Erhitzungsdauer zukommen. Hier sei in erster Linie den Veränderungen des pH-Wertes, des Redoxpotentials, des Kohlenhydrat-, Protein- und Fettgehaltes im Nährsubstrat gedacht, ferner des Einflusses von Kolloiden (z.B. der Stärke), Salzen und vieler anderer organischer und anorganischer Substanzen, wie sie in ihm enthalten sein können. Überhaupt muss angenommen werden, dass beinahe jeder Bestandteil des Nährmediums (32) in bestimmter Masse die Hitzeresistenz mitzubeeinflussen vermag.

Eingehende Untersuchungen auf diesem Gebiete beschäftigen sich vor allem mit den hitzeresistenzsteigernden Eigenschaften von Fetten und fetthaltigen Medien. Eine Zunahme ihrer Widerstandsfähigkeiten erfahren danach alle grampositive Bakterienarten (13). Die Steigerung der Hitzeresistenz kann in fetthaltigem Medium beträchtliche Ausmasse annehmen, wenn die der Hitzeeinwirkung ausgesetzten Zellen von trockenem oder doch relativ trockenem Milieu stammen. YESAIR, CAMERON und BOHRER (49) untersuchten an Hand von apathogenen, nicht hitzeresistenten, weisse Kolonien bildenden Mikrokokken den Einfluss des zelleigenen Bakterienwassergehaltes auf ihre Hitzeresistenz in Fett, Bouillonbrühe und Luft. Sie konnten zeigen, dass diese Bakterien unter obigen Bedingungen eine derartige Steigerung der Hitzeresistenz erfuhren, dass sie selbst die Abtötung von hitzeresistenten Fäulniskeimen in wässerigen Lösungen überstehen konnten.

Zu ähnlichen Befunden gelangte INGRAM (16). Diesem zufolge hat es den Anschein (apathogene, nicht hitzeresistente, weisse Staphylokokken), dass bei Bakterienzellen nur dann eine beträchtliche Steigerung ihrer Hitzeresistenz statthat, wenn diese von kaum feuchten Kulturverhältnissen direkt in Fett überführt werden. Zellen hingegen, welche wässerigen Lösungen stammen, wiesen nur eine unwesentliche Steigerung in Gegenwart von Fett. Bis jetzt ist es noch nicht gelungen, eine überzeugende Erklärung für dieses Phänomen zu finden. Man versucht das mit einer Art Schutzfunktion, welche Fette auf die Bakterien bzw. in ihm eingehüllten Organismen ausüben sollen, zu erklären (13). YESAIR, CAMERON und BOHRER (49) führen diese hingegen auf dessen niedrigen Wassergehalt oder deren vollkommene Wasserfreiheit, und ROGACHERA (35) auf die schlechte Wärmeleitfähigkeit von Fett zurück.

Von verschiedenen Seiten wird immer wieder der grosse Einfluss des pH-Wertes auf den Faktor Hitzeresistenz betont (32). Im allgemeinen ist ihre Widerstandsfähigkeit um den Neutralpunkt herum, am grössten.

Aber auch andere Faktoren müssen hier angeführt werden, wie z.B. der Salzgehalt. Er soll die Hitzeresistenz verschiedener Keime bei Konzentrationen von 1-2,5 % steigern, jedoch bei Werten über 3 % hemmend auf diese einwirken (46,45). Die Meinungen darüber gehen noch auseinander, es scheint jedoch, dass die Wirkung des Kochsalzes und vielleicht auch diejenige anderer Salze in wechselndem Masse von Suspensionsmitteln und den besonderen Eigenschaften der Bakterien abhängig ist (32).

Weiterhin sind gewisse Anaerobier befähigt, allein durch ihre Anwesenheit in einem Substrat, die Hitzeresistenz (synergistische Resistenzsteigerung) anderer Anaerobierarten zu erhöhen. Mikroorganismen, wie z.B. *Clostridium welchii* und *Cl. perfringens*, welche sonst nur 3 Min. bei Temperaturen von 100° überlebt hatten, überstanden in Gegenwart von *Cl. sporogenes* eine 10 Mal so grosse Zeitspanne. Man vermutet, dass diese Eigenschaft nur gewissen Bakterien eigen ist (3).

Von besonderer Wichtigkeit ist auch der Infektionsgrad eines Substrats. Je stärker dieser ist, desto eher besteht die Möglichkeit, dass einige Keime den angewendeten Temperaturen widerstehen. LAMANNA (23) ist der Ansicht, dass die Hitzeresistenz der Bakterienzellen in Beziehung zu ihrer maximalen Wachstumstemperatur steht. Von Sporen meint er Ähnliches.

Die Hitzeresistenz der Anaerobier ist im allgemeinen grösser als die der Aerobier. Zur Abtötung der ersten sind, wie schon angedeutet, Temperaturen von 80-100°C für die Dauer von 3 Min. unumgänglich (Bouillon). Verschieden davon überstehen sogar Siedehitze. Frisch angelegte Kultur von Anaerobiern weisen eine grössere Hitzeresistenz auf als ältere (20). Der Grössteil der gramnegativen Stäbchen ist hitzelabil.

Ebenso wie die Hitzeresistenz der Vegetativform der Bazillen ist auch die ihrer Sporen den verschiedensten Einflüssen unterworfen. Vieles gilt in dieser Hinsicht, was von den Vegetativformen gesagt wurde. Sie liegt, wie schon ausgeführt, um durchschnittlich 50° höher als die ihrer vegetativen Wuchs-

formen. Als am widerstandsfähigsten erwiesen sich unter ihnen die Putrificus-Sporen, als am geringsten dagegen, diejenigen der Subtilis-Mesentericus Gruppe (24). Ein wichtiges Charakteristikum ist ferner die unerwartete Aktivität der Sporen auf einen Hitzeschock hin bzw. nach der Einwirkung von subletalen Temperaturen. ALLEN (1) bemerkte eine raschere Vermehrung bei 30 Min. lang auf 62,5° erhitzten Sporen des *B. subtilis* als bei nicht erhitzten. EVANS und CURRAN (7) beobachteten ein beschleunigtes Auskeimen von Sporen mesophiler Keime, nach dem sie subletalen Temperaturen ausgesetzt worden waren. Nach BEERENS (3) sollen in rohem Fleisch selbst auch Substanzen enthalten sein, welche die Widerstandsfähigkeit der Bakteriensporen gegen Hitze erhöhen.

Vergleicht man die im Schrifttum zitierten bakteriellen Hitze-resistenzwerte mit den Versuchsbedingungen, unter denen sie zustande gekommen sind, so wird klar, wie äusserst fragwürdig und gewagt, wenn nicht überhaupt problematisch, es erscheinen muss, daraus bindende Schlüsse auf deren Verhalten, z.B. in Wurst, ziehen zu wollen. Solche Überlegungen waren mit massgebend für die Fragestellung dieser Arbeit gewesen. In ihr sollte anhand möglichst praxisnaher Verhältnisse der Einfluss von Brühtemperatur und -dauer auf die qualitative und quantitative Zusammensetzung der wursteigenen Flora und deren Veränderungen während des Herstellungsprozesses studiert sowie deren Widerstandsfähigkeit gegenüber ihrem potentiellen Milieu untersucht werden. Die damit verbundenen Temperaturmessungen erlauben zusätzlich noch einen Einblick in den Wärmegang von Brühwürsten. Über diesen wird im einzelnen an anderer Stelle berichtet werden. In der vorliegenden Arbeit soll er nur soweit erwähnt werden, als es zur Erläuterung der Versuchsergebnisse notwendig ist.

VERSUCHSTEIL

Als Versuchsmaterial fand "Lauantaimakkara" Verwendung, eine Wurstart, der in Deutschland etwa die Fleischwurst und in Amerika die Bolognaurst entsprechen dürfte. Sie erschien in Hinblick auf ihre Zusammensetzung und ihren hohen Zerkleinerungsgrad als ein besonders geeignetes Versuchsobjekt. Ihre Zusammensetzung war folgende:

Färsenfleisch	40,9	%
Schweinespeck	27,6	%
Wasser	22,7	%
Kartoffelmehl	5,4	%
Milchpulver	1,0	%
NaCl	2,0	%
Polyphosphat	0,3	%
NaNO ₂	0,02	%
Gewürze	0,08	%
	<u>100,00</u>	%

Bei ihrer Herstellung in der hiesigen Versuchsfabrik war man bemüht, dem gewerbetüblichen Fabrikationsprozess soweit als möglich Rechnung zu tragen. Der Herstellungsvorgang gliedert sich im einzelnen wie folgt:

Vortrocknungszeit	25	Min.
Räucherzeit	45	"
Brühzeit	60	"
Abkühlung	15	"

Jede Versuchsreihe umfasst 7 Würste, von denen jede Wurst bei einem Kaliber von 65 mm durchschnittlich 1240 g. schwer ist. Jede wird nach dem Stopfen ein erstes Mal sowie nach ihrer Entnahme für die Anstellung der bakteriologischen Untersuchung ein zweites Mal gewogen, um die auftretenden Gewichtsveränderungen registrieren zu können.

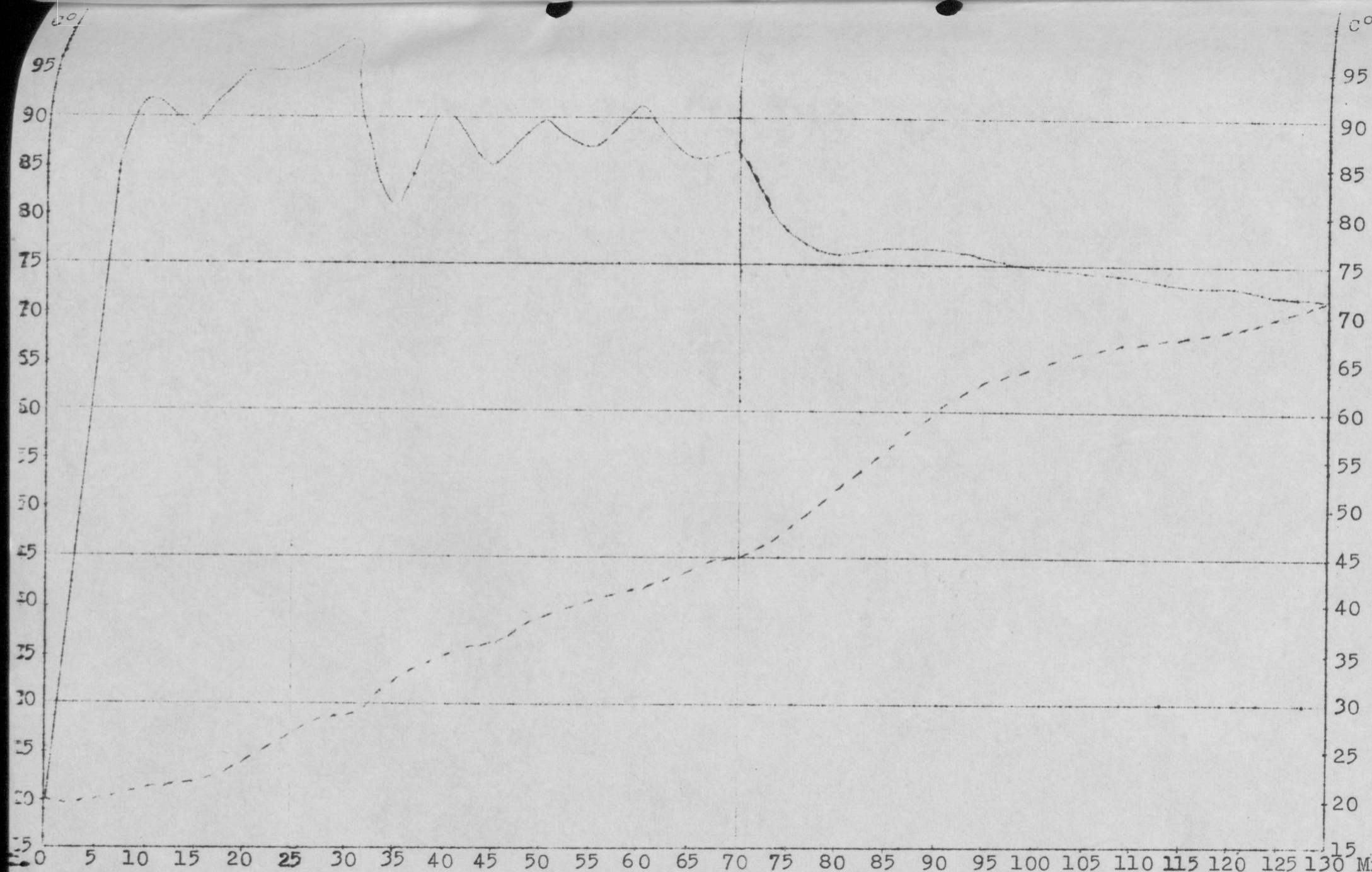
Der Zeitpunkt für die Entnahmen der Proben ist in der Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1. Zeitpunkte für die Probeentnahmen

Herstellungsphase		Temperatur im Wurstzentrum	Zeit vom Anfang der Herstellung, Min.
1	Spritzfähiges Brät	15-22°	0
2	Ende der Vortrocknung	23-24°	25
3	Ende der Räucherung	35-45°	70
4	Anfang der Brühung	56°	85-98
5	Mitte der Brühung	65°	101-116
6	Ende der Brühung	67-72°	130
7	Ende der Abkühlung, im Wasser	57-62°	145
8	Im Kühlraum	10°	265

Für die Temperaturmessungen im Wurstinnen während des Verarbeitungsvorganges stand ein Potentiometer amerikanischer Herkunft (Brown) zur Verfügung. Zu ihrer Messung wurde in die sog. Kontrollwurst ein Thermoelement (Konstantan-Kupfer-Elektrode) derart eingeführt, dass dieses im Zentrum der Wurst zu liegen kam. Um Defekte und Verluste durch Wärmeableitung zu vermeiden bzw. auf ein Minimum herabzudrücken, erfolgte ein wasserdichtes Umwickeln von Konnektorstück und Zuleitung mittels Alkathenfolie. Ein zweites Element dient zur Messung der Temperatur im jeweiligen Medium.

Die Temperatur wird während des ganzen Verarbeitungsprozesses in 5-minütigen Zeitintervallen abgelesen, und falls erforderlich, werden (65 und 56°) auch in kürzeren Zeitabständen gemessen. Das in der Kontrollwurst befindliche Element wurde bis zu deren Untersuchung in ihr belassen, so dass eine Überprüfung der Temperaturen im Wurstinneren auch nach deren Verbringung in den Kühlraum möglich ist. Den Erwärmungsvorgang während der Herstellung gibt die Kurve in Abb. 1 wieder.



Vortrocknung

Räucherzeit

Brühzeit

271

In allen Fällen zeigt es sich, dass die Brühwassertemperatur überhaupt nicht oder erst gegen Ende der Brühzeit nur für wenige Minuten erreicht wird und Temperaturen von mehr als 60° erst während der letzten 20-40 Minuten, ein Umstand, der festgehalten zu werden verdient. Die "Abschreckung" bedingt nach anfänglicher, geringgradiger Temperaturzunahme eine Abnahme der Temperatur um durchschnittlich 10°C . Der Temperaturabfall im Wurstinneeren gestaltet sich während der Abkühlung im Kühlraum bei einer Kühlraumtemperatur von 9°C ungefähr so, dass sich diese nach 15 Minuten Abkühlungszeit um 10 Grad, nach 40 Min. um 20 Grad, nach 60 min. um 36 Grad und nach 90 Min. um 45 Grad erniedrigt hat und nach 120 Min. Abkühlungszeit bis auf $10-15^{\circ}$ abgesunken ist.

Arbeitsvorgang für die bakteriologische Untersuchung

Für die bakteriologische Untersuchung wurden die Probewürste wie folgt behandelt:

- 1) Unter sterilen Bedingungen (Sterilraum) werden jeweils 10 g Wurstgut entnommen und mit 90 ccm steriler, physiologischer Kochsalzlösung verrieben und davon jeweils 1 ccm pro Platte (Aerobie) bzw. Leberbouillon (Anaerobie) gegeben. Sobald es die Wurstkonsistenz zulässt, wird ein Abklatschpräparat auf demselben Plattenmaterial wie bei 1) angefertigt. Dies war gewöhnlich dann möglich, wenn die Wurstinnentemperatur 56° erreicht hatte. Die so beimpften Platten wurden in beiden Fällen im Brutschrank bei 25° bzw. 37° und 45°C aufbewahrt, die Leberbouillonröhrchen für die Anaerobier unter N_2 -Atmosphäre bei 28°C in einem Anaerobentopf (System Brewer) verbracht, und täglich die Art und der Umfang des Keimwachstums registriert.
- 2) Nach 96-120 Stunden geschieht die Untersuchung ihrer morphologischen Eigenschaften an Hand von Ausstrichpräparaten (Gramfärbung, Sporenfärbung, Polkörperchenfärbung, Ziehl-Nielsen-Färbung u.a.)

3) Reinkulturen werden auf Schrägagar angelegt und diese zur Feststellung der optimalen Wachstumstemperatur bei 25°, 37° und 45° bebrütet.

4) Nach 48 Stunden erfolgte dann in der Regel die Ausimpfung der Reinkulturen zur artmässigen Differenzierung.

5) Von den anaerobisches Wachstum zeigenden Leberbouillonkulturen wird dann ebenfalls 1 cm auf eine Nähragarplatte abgeschwemmt, um die fakultativen Anaerobier ermitteln zu können. An Nährböden kamen für die Untersuchungen zur Anwendung jeweils:

a) eine Nähragarplatte mit folgender Zusammensetzung: Fleischextrakt 5,0, Hefeextrakt 3,0, Pepton 3,0, Glukose 1,0, Agar 10,0, Wasser ad 1000 ml;

b) eine Bromthymolblauagarplatte;

und falls erforderlich zu Abgrenzung und Differenzierung der Endobacteriaceae von den restlichen gramnegativen Keimen:

c) eine Gassner- bzw. Drigalski-Agarplatte;

zur Differenzierung und Abgrenzung der Mikrokokken von anderen kokkoiden Keimen: eine Chapman-Stone-Agarplatte (Zusammensetzung nach Difco Manual). Ein 15 %iger Kochsalzzusatz wirkt dabei als Selektivmittel und verhindert das Wachstum anderer Bakterienarten als der Kokken. Pathogene und Lebensmittelvergiftung verursachende Angehörige bilden gelblich-ockerfarbene bis orangefarbene, von einer durchsichtig klaren Zone umrandete Kolonien; alle nicht pathogenen Mikrokokken, Kolonien von weisser Farbe oder bleiben unpigmentiert.

Zur Differenzierung und Züchtung von Reinkulturen an Laktobazillen, kamen Nährböden, wie man sie an der Bundesforschungsanstalt für Fleischwirtschaft in Kulmbach für diesen Zweck gebraucht (wirksames Prinzip: Blut bzw. Glukosezusatz), zur Anwendung und für Streptokokken Blutagarplatten verschiedener Zusammensetzung.

Der Bromthymolblau-Nährboden gestattet die Unterscheidung der Wurstflora in alkali- und nichtalkalibildende Keime und wurde für diesen Zweck entwickelt. Seine Zusammensetzung: Fleisch-extrakt 5,0, Pepton 3,0, Laktose 1,0, Hefeextrakt 3,0, Glukose 1,0, Agar 15,0, alkoholische Bromthymolblaulösung 5 ml, Wasser ad 1000 ml. Zur Herstellung sei bemerkt:

Substanzen lösen und 10 Min. lang im Dampftopf aufkochen, danach Einstellen des Nährbodens auf einen pH-Wert von 6,8, 5 ccm Thymolblaulösung zu fügen, abführen und sterilisieren 3 Mal bei 100°C. Der fertige, erstarrte Nährboden soll ein gelbgrünliches, milchiges Aussehen zeigen. Seine Farbe schlägt im alkalischen Milieu nach blaugrün um.

Alkalibildner, in der Hauptsache wohl proteolytische Fäulnis-erreger, bilden eine blaue Zone um ihre Kolonien aus. Darüber hinaus verhindert der Zusatz von Bromthymolblau das lästige Schwärmphenomen, ohne andererseits das Bakterienwachstum wesentlich selektiv zu beeinflussen oder irgendwie augenscheinlich zu verzögern. Glukose und Laktose wurden hinzugefügt, um auch nicht alkalibildendem Floraanteil bessere Nährbedingungen zu schaffen. Es kommt dadurch zu keiner Verdeckung der Alkalibildung.

Die Leberbouillon für die Anaerobier wurde nach den gebräuchlichen Richtlinien hergestellt.

Die Differenzierung der Keime erfolgte nach Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Volume 6) für die aeroben, mesophilen Sporenbildner, auch unter zusätzlicher Heranziehung von Smith-Gordon-Clarks: "Aerobic Mesophilic Sporeforming Bacteria", für Streptokokken mit nach den in Hallmanns: "Bakteriologie und Serologie" enthaltenen Vorschlägen. Für die wichtigsten Gruppen seien die Differenzierungsschemata in Tab. 2 angeführt. Eine Aufführung aller würde im Rahmen dieses Vortrages zu weit führen.

Für die zahlmässige Auswertung gelangte das Kochsche Plattenzählverfahren zur Anwendung, zur Zählung selbst ein Registrierapparat nach Gerber.

ERGEBNISSE

In den ersten Untersuchungen wurde weniger auf eine zahlenmässige Erfassung der Bakterienflora Wert gelegt, als vielmehr auf deren qualitative Zusammensetzung sowie den Veränderungen, welche sie im Verlaufe des Herstellungsprozesses erfährt, geachtet. Einen Eindruck von der Gesamtmenge der Bakterien vermitteln die Ergebnisse in der Tabelle 3.

Tabelle 3. Bakteriengehalt der Wurst während der Herstellung

Zeitpunkt der Entnahme bzw. Untersuchung	Keimzahl/g		Wurst- temp. C°	Zeit ^{x)} Min.
	25°	37°		
Spritzfähiges Brät	26.000.000	2.600.000	18°	-
Ende der Vortrocknung	30.100.000	5.400.000	29°	25
Ende der Räucherung	26.000.000	4.400.000	41°	45
Anfang der Brühung	10.400.000	3.750.000	56°	
Während der Brühung	109.000	77.000	65°	60
Ende der normalen Brühung	22.000	13.000	70°	
Nach dem "Abschrecken"	23.500	23.000	14°	15
Nach 75 Min. Brühung	15.850	10.000	71.5°	75
Nach 90 Min. Brühung	12.500	2.000	72°	90
Nach dem "Abschrecken"	4.450	1.850	18°	15

x) Die Dauer der Herstellungsphase

Dieser zufolge beläuft sich der Keimgehalt im spritzfähigen Wurstbrät auf 26 Mill. pro Gramm. Vortrocknungs- und Räucherzeit bleiben ohne nennenswerten Einfluss auf den Keimgehalt, dessen Hauptanteil zu diesem Zeitpunkt mengenmässig noch aus alkalibildenden Arten besteht. Eine bemerkenswerte Dezimierung leitet erst das Brühen ein. Er beträgt zu Beginn noch 26 Mill. und schmilzt bis zur Beendigung der regulären Brühzeit (60 Min.) auf 22.000 Keime zusammen. Ihre Ausdehnung auf 90 Min. hat noch eine weitere bemerkenswerte Verminderung des Keimgehaltes zur Folge.

Die im Verlaufe der verschiedenen Herstellungsphasen isolierten Bakterienstämme sind in Tab. 4 aufgeführt. Aus ihr geht eindeutig hervor, dass durch den Brühprozess eine beträchtliche

Abb. 2. 4 Abklatschpräparate auf Nähragar III

1 = 56°C

2 = 65°C

3 = Ende des Brühens (60 Min. 71°C)

4 = nach dem Abschrecken

Tabelle 4. Die in den verschiedenen Temperaturen festgestellten Bakterienstämme

Bakterienart	15-22	22-29	35-45	56	65	67-72
<u>Micrococcus candidus</u>	+	+	+	+	+	-
M. caseolyticus	+	+	+	+	-	-
M. conglomeratus	+	+	+	+	+	+
M. epidermidis	+	+	+	+	+	-
M. flavus	+	+	+	+	+	+
M. freudenreichii	+	+	+	+	+	-
M. pyogenes albus	+	+	+	+	+	-
M. rubens	+	+	+	-	-	-
M. varians	+	+	+	+	+	+
<u>Gaffkya tetragena</u>	+	+	+	+	+	+
G. anaerobia	+	+	+	-	-	-
<u>Leuconostoc citrovorum</u>	+	+	+	-	-	-
L. mesenteroides	+	-	-	-	-	-
<u>Lactobacillus thermophilus</u>	+	+	+	+	+	-
L. brevis rudensis	+	+	+	-	-	-
L. brevis	+	+	-	-	-	-
<u>Microbacterium lacticum</u>	+	+	+	+	+	-
<u>Bacillus megatherium inter-</u> medius/cereus	+	+	+	+	+	+
B. megatherium	+	+	+	+	+	+
B. cereus mycoides	+	+	+	+	+	+
B. pumilus subtilis inter-	+	+	+	+	+	+
medius	+	+	+	+	-	-
B. macerans	+	+	+	+	+	+
<u>Alcaligenes marshallii</u>	+	+	+	+	+	+
Alc. metalcaligenes	+	+	+	+	+	-
Alc. viscosus	+	+	-	-	-	-
<u>Flavobacterium breve</u>	+	+	+	+	+	-
Flavobact. arborescens	+	+	-	-	-	-
Flavobact. lutescens	+	+	-	-	-	-
<u>Escherichia coli</u>	+	+	-	-	-	-
<u>Aerobacter cloacae</u>	+	+	-	-	-	-
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	+	+	+	+	-	-
<u>Proteus rettgeri</u>	+	+	-	-	-	-

Abnahme der Bakterienflora hinsichtlich Art und Zahl bewirkt wird, sich damit jedoch keine vollkommene Abtötung bakteriellen Lebens erzielen lässt (Abb. 2). Wie sich zeigt, halten sich Kokken und Stäbchen zu Beginn der Herstellung artenmässig ungefähr das Gleichgewicht. Ähnliches gilt selbst auch wieder von gramnegativen und grampositiven Stäbchen. Dieses Verhältnis verschiebt sich im Verlaufe der Wurstherstellung mit steigender Temperatur, unter gleichzeitiger Verminderung des Artenreichtums und der Menge, immer mehr zu Gunsten der Kokken, welche am Ende dann zusammen mit der aeroben Sporenbildner das Feld beherrschen. Eine auffallende Verminderung tritt jedoch erst nach Erreichung von Temperaturen um die $55-60^{\circ}$ herum ein. Von dieser Reduzierung werden in erster Linie die gramnegativen Keime betroffen. Aerobe Sporenbildner, genauer gesagt, wahrscheinlich ihre Sporen, sowie eine ganze Reihe Micrococcaceae-Arten (Staphylococcen, Micrococcen, Gaffkya) zusammen mit einer nicht näher differenzierten, strikt anaeroben Streptococcus-Art, überstehen die Brühzeit. Alle anderen aber fallen ihr zum Opfer. Bei Temperaturen bis zu 65° war wiederholt auch ein grampositives Stäbchen vom Laktobazillentyp festgestellt worden. Die anaeroben Arten erleiden überraschender Weise bei niedrigen Temperaturen, zumeist schon während Vortrocknung und Räucherung, den Tod, oder doch eine weitgehende Einschränkung ihrer Lebensäusserungen, dass innerhalb eines Zeitraums von 20 Tagen keinerlei Lebensäusserungen mehr bemerkt werden konnte.

Die Keimverteilung auf den Abklatschplatten lässt keinerlei eindeutige Anordnung des mengenmässigen Wachstums erkennen. Die Keime waren gleichmässig über die ganze Abklatschplatte verteilt gewachsen, wenn auch ein etwas dichteres Wachstum im Übergangsbereich zwischen Zentrum und Randzone zu beobachten gewesen war. Speziell die Kolonien von alkalibildenden Stäbchen lagen in der Mehrzahl etwas mehr randständig als zentral.

Die Brühtemperatur scheint aber doch nicht ganz ohne Wirkung auf die überlebenden Keimarten geblieben zu sein. Während man sonst allgemein für das Auskeimen der Sporen eine Zeit von 3-5 Tagen veranschlägt, erfolgt diese offensichtlich unter der Ein-

wirkung der Brühtemperatur - sie dürfte wohl stimulierender Natur sein - schon nach 30 Stunden. Mikrokokken weisen dagegen eine Verlängerung ihrer Latenzperiode von 2, auf 3 bis 4 Tage.

Unterzieht man diese Ergebnisse einer kritischen Betrachtung, dann verdient vor allem der Umstand Beachtung, dass nicht nur, wie von vorneherein anzunehmen gewesen war, Sporenbildner und thermophile Keime, sondern auch eine bemerkenswerte Anzahl mesophiler Bakterienarten das Brühen überlebten. Dabei überrascht ausser dem zahlenmässigen Umfang des Micrococcaceae-Wachstums auch dessen Artenreichtum. In diesem Zusammenhang weiss man, dass sich Mikrokokken durch eine relativ grosse Widerstandsfähigkeit gegenüber Rauch, Salzen und deren synergistische Wirkung auszeichnen und hinsichtlich ihrer Wachstumsbedingungen (pH-Wert, Beschaffenheit des Nährbodens, Feuchtigkeitsgehalt) keine grossen Ansprüche stellen. Und doch überrascht das Ergebnis einigermassen. Die in der Wurst vorliegenden Verhältnisse müssen offensichtlich einer Steigerung ihrer Hitzeresistenz äusserst zuträglich sein. Welche Faktoren dabei im einzelnen eine Rolle spielen, kann nur vermutet werden. Man hat nachgewiesen, dass in Gegenwart von Fett alle grampositive Keime eine Steigerung ihrer Hitzeresistenz, welche, wenn sie trockenem Milieu entstammen und von dort aus direkt auf Fleisch geraten oder das Wurstbrät infizieren können, beträchtliche Ausmasse annimmt. Kokken sind häufig als Verunreinigungen in Luft und Staub enthalten. Gelangen sie von dort durch Kontaktinfektion auf ihr späteres Nährmedium, so könnten die Voraussetzungen für eine derartige Steigerung erfüllt sein. Allerdings ist zu bedenken, dass andere grampositive Kokken den gleichen begünstigenden Bedingungen ausgesetzt sind. Trotzdem kommt es anscheinend nicht zu einer Zunahme ihres Wachstums, zumindest aber nicht in dem Umfang, wie sie den überlebenden Mikrokokken eigen zu sein scheint. Vielleicht fallen bei ersteren die hemmenden Einflüsse mehr ins Gewicht. Es könnte immerhin möglich sein, dass derartige Keime deshalb schon, bevor sie der Hitzeeinwirkung unterworfen werden, eine Schwächung ihrer Widerstandsfähigkeit erlitten haben, welche ihre Ansprechbarkeit auf die hitzeresistenzfördernden Faktoren herabsetzt oder gar unmöglich macht.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der Brühtemperatur auf die artspezifische Zusammensetzung und die Menge der Bakterienflora der Brühwurst untersucht werden.

Wie die Temperaturmessungen ergaben, steigen im Wurstinne die Temperaturen erst während der letzten Drittels der Brühzeit auf mehr als 60°C an und erreichen die Brühwassertemperaturen entweder überhaupt nicht oder doch nur für wenige Minuten. Sie genügen zwar, um die gramnegative und den Grossteil der grampositiven Brühwurstflora abzutöten, dagegen nicht zur Ausschaltung von Angehörigen der Micrococcaceae (*M. conglomeratus*, *M. flavus*, *M. varians*, *Gaffkya tetragena*) und Bacillaceae (*Bac. megatherium-cereus intermed.*, *B. cereus mycoides*, *B. pumilus-subtilis intermed.*, *B. macerans*). Sie überstanden regelmässig diese Brühtemperaturen. Für die Bazillen ist u.U. sogar ein stimulierender Einfluss auf deren Lebenstätigkeit (Sporen) in Betracht zu ziehen.

SUMMARY

In this paper the results of an investigation upon the effect of the cooking temperature on the composition and the amount of the bacterial flora of the Bologna type sausages are given.

By measuring the temperatures in the centre of the sausages, it was found that the temperatures rose to 60°C and over only during the last third of the cooking period, and reached the temperature of the cooking water either not at all or only for a few minutes.

The reached temperatures were yet high enough to kill the Gram negative and the largest part of the Gram positive bacteria of the sausage flora; on the other hand, they were too low to kill certain members of the families Micrococcaceae and Bacillaceae. The latter tolerated regularly these cooking temperatures. It has to be taken into consideration that these temperatures may even present a stimulating effect on the vitality (of the spores).

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALLEN, P.W.: Zit. nach Jensen: Microbiology of Meat, 1945.
2. von AMELUNXEN, H.: Inaug.-Diss. Hannover 1951.
3. BEERENS, M.: Ann.Inst.Pasteur Lille 7, 75, 1955.
4. BENZE, B.: Inaug.-Diss. Hannover 1950.
5. BIGELOW u. ESTY: Zit. nach Reddish, G.F.: Antiseptics, Disinfectants, Fungicides and Sterilization. 1954.
6. DESKINS u. HUSSEMAN: Food Sci.Abstr. 27, 261, 1955.
7. EVANS u. CURRAN: Zit. nach Jensen: Microbiology of Meat.
8. FREDHOLM, H.: Nordisk Veterinärmedicin 6, 1954.
9. GORDON-SMITH: Aerobic Sporeforming Bacteria.
10. GRUSCHKE, E.: Inaug.-Diss. Berlin 1929.
11. HAGEN, G.: Diss. Berlin 1942.
12. HALL: Food Industrie 10, 424 u. 464, 1938.
13. JENSEN, L.B.: Meat and Meat Foods. New York 1949.
14. JEPSEN, W.H.O.: Meat Hygiene. 1957.
15. INGRAM, M.: Ann.Inst.Past.Lille 7, 32, 1955.
16. INGRAM, M.: Ann.Inst.Past.Lille 7, 146, 1955.
17. INGRAM, M. & BARNES, E.: Ann.Inst.Past.Lille 7, 101-14, 1955.
18. INGRAM & HOBBS: Food Sci.Abstr. 28, 19, 1956.
19. KELLER, H.: Fleischwirtschaft 6, 233, 1954.
20. KELLER, BUSS u. RASCHKE: Arch.Lebensmittelhyg. 6, 166, 1955.
21. KNORR: Fleischwirtschaft 6, 367, 1954.
22. KOLLER, R.: Salz, Rauch und Fleisch. Salzburg 1941.
23. LAMANNA: Zit. nach Jensen: Microbiology of Meat.
24. LERCHE, M.: Ann.Inst.Past. Lille 7, 46-49, 1955.
25. McDIVITT & HUSSEMAN: Ref. Food Sci.Abstr. 29, June, 1957.
26. MALLMANN, ZAIKOWSKI u. RUSTER: Veröffentlichung № 264, Michigan Agricultural Experiment Station.
27. MOULTON & LEWIS: Meat through the Microscope. 1948.
28. -: National Provisioner, June 18, 15, 1949.
29. NIVEN, C.F., Jun.: Bull. № 13 (Dez. 1951), AMIF.
30. NIVEN, C.F.: Ann.Inst.Past. Lille 7, 120, 1955.
31. RASCHKE: Fleischwirtschaft 9, 77, 1957.
32. REDDISH, G.F.: Antiseptics, Disinfectants, Fungicides and Sterilization. Philadelphia 1954.
33. RODERICK & NORTON: Zit. nach Tanner: Microbiology of Foods.
34. ROEMMELE: Fleischwirtschaft 7, 277, 1954.

35. ROGACHERA: Zit. nach Tanner: Microbiology of Foods.
36. ORLA-JENSEN, S.: Zit. nach Ingram & Barnes: Ann.Inst.Past. Lille 7, 101-14, 1955.
37. POHJA, M.: Fleischwirtschaft 9, 547-549, 1957.
38. POHJA u. NIINIVAARA: Z.Lebensm.-Unters. u. -Forsch. 106, 298, 1957.
39. POHJA u. NIINIVAARA: Deutsche Lebensm.-Rundschau 53, 64, 1957.
40. SAITO, F. u. ISHII, T.: Ref. in Chem.Zentralblatt 126, 10647, 1955.
41. SCHMIDT, C.F.: Ref. in Reddish, G.F.: Antiseptics, Disinfectants, Fungicides and Sterilization.
42. SCHÖNBERG, F.: Fleischwirtschaft 7, 243, 1955.
43. STEINKE u. FOSTER: Food Research 16, 372, 1951.
44. TANNER, F.W.: The Microbiology of Foods. Champaign 1944.
45. VILJOEN, I.A.: Zit. nach Reddish, G.F. (32)
46. WEISS, H.: Zit. nach Reddish, G.F. (32)
47. WIEDEMANN, WATSON, MAYFIELD & WALTER: Ref. Food Sci.Abstr. 29, № 1, 1951.
48. WILL, SULZBACHER & McLEON: Food Technol. 5, 7, 1954.
49. YESAIR, CAMERON & BOHRER: Food Research 11, 327, 1946.
50. ZANZUCCHI, A. & DELINDATI, G.: Industria Conserve 28, 73-78, 1953.