"ÜBER DIE IN SALZLAKE UND ROHWURST VORKOMMENDEN MIKROKOKKEN

von

M.S. Pohja

Forschungsanstalt der Genossenschaftlichen Schlachthöfe,
Hämeenlinna, FinnlandEinleitung

In Finnland zieht man seit bereits etwa 3 Jahren eine Mikrokokkenreinkultur bei der Rohwurstherstellung zu Hilfe. Da die Ergebnisse äusserst günstig waren, sind die Forschungsarbeiten zum Auffinden neuer, zum Zweck geeigneter Mikrokokken weiter fortgeführt worden. Es ist ja allgemein bekannt, dass die Bakterien mit der Zeit einer Mutation unterliegen und dabei eventuell gewisse ihrer Eigenschaften einbüßen. Deshalb kann ein und derselbe Bakterienstamm nicht viele Jahre hindurch benutzt werden, sondern man muss vielmehr neue Stämme finden, die sich bezüglich ihrer Eigenschaften zur Anwendung bei der Rohwurstherstellung eignen. Dementsprechend sind auch bei uns fortlaufend aus Salzlake und aus Rohwurst Mikrokokken isoliert, deren Eigenschaften untersucht und deren Einwirkung auf das Reifen der Rohwurst ausgeprobt worden. Ferner sind Untersuchungen ausgeführt worden, in denen dahin gestrebt wurde, durch das Zusammenwirken von der Familie Lactobacteriaceae angehörigen Arten und von Mikrokokken eine schöne Farbe, gute Haltbarkeit derselben, guten Geschmack und gutes Aroma im fertigen Produkt zu erzielen. Die vorliegende Darstellung hat den Zweck, diese Untersuchungen kurz zu beschreiben.

Beim Suchen nach Mikrokokkenstämmen, die sich für die Rohwurstherstellung eignen, waren wir genötigt, eine sehr grosse Zahl von Mikrokokken aus Salzlake und aus Rohwurst zu isolieren.

Beim Versuch, diese Mikrokokken an Hand der Beschreibungen in Bergey's Manual zu identifizieren, sind wir so gut wie regelmässig auf grosse Schwierigkeiten gestossen. Der Fall ist äusserst selten, dass irgendein Mikrokokkenstamm hinsichtlich seiner Eigenschaften mit einem in Bergey's Manual erwähnten übereinstimmt. Das besagte Werk (6. Aufl. 1948) enthält Angaben über insgesamt 457 der Gattung Micrococcus angehörige Arten, deren nähere Eigenschaften in Originalarbeiten beschrieben sind. Von diesen 457 Arten sind nur 22 in Bergey des näheren beschrieben. Nicht ein einziger dieser Mikrokokken ist aus Salzlake oder aus Fleischprodukten isoliert. Drei Mikrokokkenarten sind von der Oberfläche von Würsten oder von Fleisch isoliert und die übrigen 432 Arten u.a. aus der Luft, von der Hautoberfläche, aus Eiterherden, Wasser usf.

Da diese mit der Identifizierung verknüpften Schwierigkeiten für alle mit mikrobiologischen Untersuchungen an Fleischprodukten beschäftigten Personen gemeinsam sind, wäre es angebracht ein genaueres taxonomisches Studium der Bakterien in Fleischprodukten durchzuführen. Dieser Gedanke wurde bereits voriges Jahr in der in Roskilde abgehaltenen Zusammenkunft hervorgebracht. In diesem Zusammenhang möchte ich in Kürze die Ergebnisse darstellen, welche in der in unserem Laboratorium ausgeführten Forschungsarbeit bisher erzielt worden sind, ebenso die Richtlinien, nach denen die diesbezügliche Arbeit fortgeführt werden soll. Es liegt auf der Hand, dass eine diesartige Arbeit sehr umfangreich und schwierig ausführbar ist; daher stellen auch die hier anzuführenden Ergebnisse nur einen Bruchteil dessen dar, was die Arbeit in ihrer Gesamtheit umfassen wird. Im Interesse des erfolgreichen Durchführens dieser Arbeit wäre deshalb eine Zusammenarbeit mit anderen diesem Kreis angehörenden Forschungsanstalten von hervorragender Bedeutung. Aus diesem Grunde haben wir es als angebracht erachtet, unsere Forschungsarbeit vorzustellen, obwohl sich dieselbe hinsichtlich der Resultate erst ganz in ihren Anfängen befindet.

I. Über die aus Salzlake und Rohwurst isolierten Mikrokokken

Dieser Teil der Untersuchung hat den Zweck, gewisse Klarheit in die Taxonomie der Mikrokokken in Fleischprodukten zu bringen. Das Versuchsmaterial besteht aus Mikrokokken, die aus Salzlaken und aus Rohwürsten isoliert wurden.

1. Die aus Salzlake isolierten Mikrokokken

Aus den zum Einpökeln benutzten Salzlaken von fünf verschiedenen Fabriken wurden insgesamt 183 Mikrokokkenstämme isoliert. Das Isolieren erfolgte von Nähragaren mit 0, 5, 10 bzw. 15 % NaCl. Die Keimzahl der Salzlaken war folgende (Tabelle 1):

Tabelle 1. Keimzahl der Salzlake, auf Nähragar mit verschiedenen NaCl-Gehalten gezählt

Fabrik	Keimzahl, Zellen je ml			
	0% NaCl	5% NaCl	10% NaCl	15% NaCl
1	1.875.000	80.000	65.000	700
2	220.000	6.000.000	1.000.000	130.000
3	180.000	2.000.000	650.000	125.000
4	245.000	200.000	100.000	64.000
5	550.000	5.000.000	720.000	254.000

Tabelle 2. Anzahl der isolierten Bakterienstämme

Fabrik	Bakterienstämme isoliert, Zahl				Insges.
	0% NaCl	5% NaCl	10% NaCl	15% NaCl	
1	9	10	11	7	37
2	9	2	-	9	20
3	12	12	15	14	53
4	10	9	10	12	41
5	11	7	8	6	32
Insgesamt	51	40	44	48	183

Ein jeder der isolierten Mikrokokkenstämme wurde auf eine Schrägagar übertragen, welche die gleiche Menge NaCl wie derjenige Nähragar enthielt, von dem das Isolieren erfolgte.

Die Eigenschaften eines jeden isolierten Mikrokokkenstamms wurden anfangs unter Befolgung der in Bergey's Manual dargestellten Systematik untersucht. Hierbei wurden die zehn wichtigsten Eigenschaften eines jeden der 183 Stämme unter-

sucht, wie z.B. die Nitratreduktion, das Wachstum in $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4^-$ -Nährlösung, die Gelatineauflösung, Lackmusmilch u.dgl. Die ermittelten Eigenschaften wurden auf einer besonderen, für diesen Zweck entwickelten Lochkarte vermerkt, die bei der betreffenden Eigenschaft die Eintragung + bzw. - erhielt und ferner im Fall einer positiven Reaktion entsprechend gelocht wurde. Nach diesem Vorgang wurden die Eigenschaften eines jeden Stamms mit Hilfe der Lochkarten mit denjenigen der übrigen Stämme verglichen und von den untereinander gleichartigen Stämmen alle bis auf einen ausgeschaltet; dieser eine Stamm wurde für die weiteren Untersuchungen belassen. Auf diese Weise blieben von den insgesamt 183 Stämmen 119 Stämme für die weitere Untersuchung übrig. Von dieser Zahl waren 85 Stämme völlig verschieden, obwohl sich ein Teil derselben nur bezüglich einer oder zweier Eigenschaften von anderen Stämmen unterschied. 34 der 119 Stämme waren solche, die sonst in ihren Eigenschaften mit gewissen anderen Stämmen übereinstimmten, von diesen aber bezüglich ihres Pigments abwichen. Ein Teil dieser war von Substraten mit verschiedenen Salzgehalten isoliert worden und es ist daher möglich, dass bereits der Salzgehalt allein die Pigmentbildung hat beeinflussen können. Die weiteren Untersuchungen werden zeigen, wie viele der 119 Stämme noch untereinander gleichartig sind.

Folgende Tabelle (Tabelle 3) zeigt, wie viele der besagten 119 verschiedenen Mikrokokkenstämme von einem Nährboden mit 0, 5, 10 bzw. 15 % NaCl isoliert worden sind.

Tabelle 3. Verschiedene Mikrokokkenstämme

Mikrokokken	Nähragar mit NaCl-Gehalt			
	0 %	5 %	10 %	15 %
Insgesamt Stämme isoliert	51	40	44	48
Verschiedene Stämme festgestellt	32	30	28	29

2. Die aus Rohwurst isolierten Mikrokokken

Aus Rohwurst sind im Zusammenhang mit zeitigeren Untersuchungen 243 Bakterienstämme isoliert worden, wovon 126 Stämme aus Mikrokokken bestanden. Bei der genaueren Untersuchung fanden sich unter diesen 126 Stämmen 11 verschiedenartige Mikrokokkenstämme, von denen nur zwei Arten (*M. caseolyticus* und *M. flavus*) in ihren Eigenschaften mit Angaben in Bergey's Manual übereinstimmen.

Tabelle 4. Anzahl der aus Rohwürsten während verschiedener Herstellungsphasen isolierten Bakterienstämme

Bakterienstamm	Bakterienstämme isoliert, Zahl				Insges.
	Spritzfähiges Brät	Nach der Vortrocknung	Nach der Räucherung	Während der Lagerung ²⁾	
Mikrokokken	53	52	13	8	126
Diplokokken	3	1	-	-	4
Sarzinen	6	3	-	-	9
Gram+ Stäbchen	12	10	19	14	55
Gram- Stäbchen	8	12	4	3	27
Gramvar. Stäbch. Kokkusbazillen ¹⁾	2	2	-	-	4
Streptokokken	-	5	2	-	3
Insgesamt	85	85	46	27	243

1) Noch nicht identifizierter, wahrscheinlich zur Familie Lactobacteriaceae gehöriger Stamm

2) 14 Tage im Lagerraum

Die Rohwürste, von denen die vorstehend angeführten Bakterienstämme isoliert worden sind, wurden in unserer Versuchsfabrik hergestellt. Ausser diesen sollen weitere Mikrokokkenstämme von den Rohwürsten von fünf Fleischwarenfabriken während verschiedener Herstellungsphasen isoliert werden.

Ausser den erwähnten Mikrokokken sind als Versuchsmaterial für die fortgesetzten Untersuchungen 20 von Prof. Lerche aus Rohwürsten isolierte Mikrokokkenstämme sowie desweiteren 6 verschiedene von Dr. Leistner aus Salzlake isolierte Mikrokokkenstämme erhalten worden.

II. Die Eignung der Mikrokokkenstämme zur Anwendung bei der Rohwurstherstellung

Die Untersuchung hatte den Zweck, neue Bakterienstämme zu finden, die sich zur Anwendung bei der Rohwurstherstellung eignen würden. Es bestand ferner die Absicht, das Zusammenwirken von einigen der Familie Lactobacteriaceae angehörigen Arten und von Mikrokokken in bezug auf die Reifung der Rohwurst zu untersuchen. In diesem Sinn wurde vor den eigentlichen Rohwurstversuchen eine bakteriologische Untersuchung vorgenommen, in welcher 29 verschiedene Mikrokokken-, 3 Laktobazillen- und 3 Streptokokkenstämme geprüft wurden. Hierbei wurde die Vermehrungsgeschwindigkeit dieser Stämme in Nährfleischbrühe, deren Fähigkeit Nitrat zu Nitrit zu reduzieren sowie Glukose und Saccharose zu Säuren zu vergären untersucht. Diejenigen Stämme, bei denen die besagten Eigenschaften am stärksten vertreten waren, wurden für die Rohwurstversuche gewählt.

Zum ersten Rohwurstversuch wurden unter den 29 Mikrokokkenstämmen 12 Stämme sowie unter den Arten der Familie Lactobacteriaceae 1 Streptokokkenstamm (*Str. faecalis*) ausgewählt, welcher letzterer stark Glukose und Saccharose zu Säuren vergärte. Im Verlauf der Herstellung der Rohwurst wurde die Veränderung des pH-Werts sowie die Bildung und Erhaltung der Farbe verfolgt. In den fertigen Produkten wurde überdies die Gesamtzahl der aeroben Bakterien bestimmt. Auf Grund der Ergebnisse aus dem ersten Versuch wurden unter den 12 Versuchsorganismen 7 Mikrokokkenstämme für den zweiten Rohwurstversuch ausgewählt. Die Rohwürste wurden nun unter Zufügung von Mikrokokkenreinkultur sowie eine Mischung von Mikrokokken + Streptokokken hergestellt. Hierbei liess sich feststellen, ob der Streptokokkenzusatz einen das Aroma und den Geschmack bessernden Einfluss hatte. Die Ergebnisse zeigten, dass nur vier der Mikrokokkenstämme einen deutlich die Farbe der Wurst, die Haltbarkeit der Farbe und das Aroma bessernden Einfluss besaßen. Ferner war in den mit Hilfe dieser Mikrokokkenrein-

kulturen hergestellten Erzeugnissen die Gesamtzahl der aeroben Bakterien geringer als in der Kontrollwurst. Das Zusetzen des Streptokokkenstamms schien das Aroma und den Geschmack der fertigen Produkte zu bessern, obwohl es den pH-Wert der Wurst nicht herabsetzte. Es ist offenbar, dass mit Hilfe des Streptokokkenstamms die richtige Säurebildung erzielt wird. Vermutlich besteht die entstandene Säure ausschliesslich aus Milchsäure, und die Bildung von Essigsäure, Ameisensäure und anderen Säuren ist dank des Streptokokkenzusatzes gering. In diesen Teilen ist die Untersuchung noch unvollendet.

Im dritten und vierten Rohwurstversuch wurde der Wurstbrät eine jede der vier Mikrokokkenkulturen allein sowie auch zusammen mit der Streptokokkenkultur zugegeben. Diese Rohwurstversuche zeigten, dass sämtliche vier Mikrokokken die Farbbildung und Haltbarkeit der Farbe sowie den Geschmack und das Aroma des fertigen Produkts verbesserten. Die Gesamtzahl der Bakterien im fertigen Erzeugnis war deutlich geringer als in den Kontrollwürsten.

Tabelle 5. Keimgehalt der fertigen Rohwurst

Der Rohwurst zugesetzte Reinkultur	Keimgehalt, Zellen/g	
	25°	37°
M. varians	26.800.000	1.500.000
M. epidermidis I	21.800.000	5.700.000
M. epidermidis II	15.200.000	300.000
Micrococcus M53	7.200.000	700.000
Kontrolle	33.600.000	15.000.000

Man kann folglich annehmen, dass die in Frage stehenden Mikrokokkenstämme eine antagonistische Wirkung auf die übrigen in der Rohwurst vorkommenden Bakterien ausüben. Der Streptokokkenzusatz besserte den Geschmack und das Aroma der Erzeugnisse, obgleich er den pH-Wert der fertigen Produkte nicht beeinflusste. Anscheinend soll man demgemäss, insofern die Absicht besteht, mit Hilfe von Bakterienreinkulturen die Rohreifung der Erzeugnisse, die Bildung und Erhaltung der Farbe, das Aroma und den Geschmack sowie die Haltbarkeit des fertigen Produkts

zu fördern, danach streben eine geeignete Mischkultur zu verwenden, wie eben z.B. die in den vorliegenden Versuchen angewandte Mikrokokken-Streptokokkenkultur. Hierbei erzeugt der Mikrokokkenstamm seinem Nitratreduziervermögen zufolge eine schöne rote Färbung des Produkts und bessert somit die Bildung und Erhaltung der Farbe, beteiligt sich an der Säurebildung und wirkt vermögens seiner antagonistischen Eigenschaften die Tätigkeit der Übrigen in der Wurst vorkommenden Bakterien hemmend. Der Streptokokkenstamm führt die richtige Säurebildung herbei und verbessert dadurch den Geschmack und das Aroma des Erzeugnisses.

Als Zusammenfassung aller Rohwurstversuche kann folgendes gesagt werden:

Als der beste Stamm hinsichtlich der Bildung und Erhaltung der Farbe hat sich der Stamm ähnelnd *M. epidermidis* I erwiesen. Der pH-Wert der Rohwurst war bei Anwendung sämtlicher vier vorerwähnten Stämme der gleichen Grössenordnung, etwa pH 5,0-5,3. Bezüglich des Geschmacks waren diejenigen Würste am besten, denen *M. epidermidis* I + *Str. faecalis* und *Micrococcus* M53 + *Str. faecalis* zugegeben worden war. Das stärkste Wachstum in Nährfleischbrühe wies der Stamm ähnelnd *M. varians* auf. In allen vier Rohwurstversuchen behielt die Kontrollwurst in der Mitte eine graue Farbe.

III. Die Fortsetzung der Untersuchungen

Gegenwärtig ist eine Untersuchung im Gange, in der 36 Eigenschaften der 119 aus Salzlake isolierten Mikrokokkenstämme genauer untersucht werden. Auf Grund der Ergebnisse werden dann alle untereinander verschiedenen Stämme für weitere Untersuchungen ausgewählt. In gleicher Weise werden die aus Rohwurst in verschiedenen Herstellungsphasen isolierten Mikrokokkenstämme und ferner die von Prof. Lerche und von Dr. Leistner isolierten Stämme untersucht. Hiernach sollen die

Eigenschaften sämtlicher vorgenannten Stämme mit Hilfe der Lochkarten untereinander verglichen und von den gleichartigen Stämmen alle bis auf einen ausgeschaltet werden, welcher einer eingehenderen Untersuchung unterzogen wird. Durch dieses Vorgehen ergibt sich ein Versuchsmaterial, das sich aus Mikrokokken zusammensetzt, die aus Salzlake und aus Rohwurst isoliert sind.

Im Zusammenhang mit der eingehenderen Untersuchung wird vorerst versucht, alle verschiedenen Mikrokokkenstämme unter den Arten in Bergey's Manual einzureihen. Hiernach werden deren Sauerstoffbedarf, Temperatur- und pH-Kurven und Salzbeständigkeit untersucht. Es ist festzustellen, ob die Mikrokokken das Vermögen haben, aus verschiedenen Eiweißstoffen Aminosäuren zu erzeugen, Mono-, Di- und Polysaccharide zu vergären und das Fett abzubauen. Hierbei gilt es festzustellen, ob hinsichtlich des Proteolyses, des Zuckerabbauvermögens und des Fettabbaus spezifische Eigenschaften unter den verschiedenen Mikrokokken bestehen. Hiernach ist es auch festzustellen, welche Verbindungen als Endprodukt dieser Reaktionen entstehen. Es wird auch untersucht, ob die Mikrokokken das Vermögen besitzen, Nitrat und Nitrit zu reduzieren und ob sich als Zwischenstufe der Reduktion Hydroxylamin und als Endprodukt Ammoniak bildet. Ferner sind die antibiotischen Eigenschaften aller Mikrokokkenstämme zu untersuchen. Es ist angebracht, die Testorganismen für diese Arbeit von verdorbenen Rohwürsten zu isolieren.

Auf Grund dieser Untersuchungsergebnisse muss versucht werden, die gegenwärtige Systematik für die in Rohwürsten und Salzlaken vorkommenden Mikrokokken zu präzisieren.

Zusammenfassung

1. Aus der Pökellake von fünf verschiedenen Fabriken sind 183 Mikrokokkenstämme isoliert worden, darunter 83 untereinander verschiedene Stämme.
2. Aus Rohwürsten sind in verschiedenen Herstellungsphasen 126 Mikrokokkenstämme isoliert worden, darunter 11 untereinander verschiedene Stämme.
3. Es sind zur Anwendung bei der Rohwurstherstellung geeignete Mikrokokken untersucht worden. Insgesamt 29 verschiedene Mikrokokken-, 3 Laktobazillus- und 3 Streptokokkenstämme wurden geprüft. Unter diesen hatten nur 4 Mikrokokkenstämme und ein Streptokokkenstamm einen deutlich die Farbe, den Geschmack, das Aroma und die Haltbarkeit der Rohwurst bessernden Einfluss. Der Streptokokkenstamm wurde zusammen mit den Mikrokokkenstämmen zum Einsatz gebracht.
4. Eine eingehendere Untersuchung hinsichtlich der Eigenschaften der aus Rohwürsten und Salzlaken isolierten Mikrokokken wird betrieben. Es werden u.a. die Temperatur- und pH-Kurven, die Salzverträglichkeit, die proteolytischen und fettabbauenden Eigenschaften, das Vermögen Mono-, Di- und Polysaccharide zu vergären, die Zwischen- und Endprodukte der Nitratreduktion sowie die antibiotischen Eigenschaften untersucht.
5. Es wird versucht, auf Grund der Untersuchungsergebnisse einerseits die gegenwärtige Systematik für die in Rohwürsten und in Salzlaken vorkommenden Mikrokokken zu präzisieren und andererseits neue Bakterienstämme aufzufinden, die sich zur Anwendung als Reinkultur bei der Herstellung von Rohwurst eignen würden.

Summary

1. From the curing brines of five different factories 183 micrococcus strains have been isolated, from which 83 were different.
2. From dry sausages 126 micrococcus strains have been isolated at varying stages of processing, from which 11 were different.
3. Micrococci suitable for use at the processing of dry sausage have been investigated. Altogether 29 different micrococcus strains, three lactobacillus strains and three streptococcus strains have been tested. Among these, only four micrococcus strains and one streptococcus strain showed a distinct effect of improving the colour, taste, aroma and keeping quality of the dry sausage. The streptococcus strain has been used together with the micrococcus strains.
4. Closer investigation is being carried out relating to the properties of the micrococci isolated from dry sausages and brines. Among other things, the following will be investigated: temperature and pH curves, salt tolerance, proteolytic and lipolytic properties, ability to ferment mono-, di- and polysaccharides, intermediate and ultimate products of nitrate reduction, and antibiotic properties.
5. It will be attempted on the basis of the results of the investigation, on one hand, to revise the existing systematics with regard to the micrococci occurring in dry sausages and in brines, and, on the other hand, to find new strains of bacteria that would be suitable for pure cultures to be used in the processing of dry sausages.