

Sixth Meeting of Meat Research Institutes  
 Utrecht: August 29th - September 3rd 1960  
 Untersuchungen über das Vermögen einiger  
Micrococcus- und Bacillus-Stämme, Gelatine,  
 Kasein und Fleischeiweiss abzubauen.

Von M.S. Pohja und F.P. Niinivaara  
 Forschungsanstalt der genossenschaftlichen Schlachthöfe,  
 Hämeenlinna, Finnland.

In unserer früheren Untersuchung, (Fleischwirtschaft 12, 1960, im Druck) haben wir betont, dass beim Untersuchen die das Fleisch proteolysierenden Bakterien ist es nicht ausreichend, die Gelatineverflüssigungs- und Kaseinhydrolyseversuche durchzuführen. Anlass zu dieser Bemerkung haben uns die Untersuchungen gegeben, wobei die proteolytischen Eigenschaften der aus Fleisch isolierten Mikrokokken untersucht wurden. Wir haben nämlich festgestellt, dass mehrere Stämme die Eigenschaft besaßen, Gelatine und Kasein abzubauen, aber diese Stämme waren nicht fähig, Fleisch zu proteolysieren. Will man die fleischproteolysierenden Eigenschaften der Bakterien untersuchen, muss man die Untersuchung auf einem aus Fleisch hergestellten Nährboden durchführen. Die Untersuchung auf Gelatine- oder Kaseinnährboden gibt irreführende Resultate.

Um die obenerwähnte Beobachtung zu bekräftigen, haben wir eine vergleichende Untersuchung mit einigen Micrococcus- und Bacillus-Stämmen durchgeführt. Es wurden mit diesen Stämmen gleichzeitig die proteolytischen Eigenschaften auf Gelatine-, Kasein- und Fleischnährböden durchgeführt mit der von uns früher beschriebenen Hydrolysezone- und Ninhydrinmethode (vgl. obenerwähnte Veröffentlichung). In dem Kaseinhydrolyseversuch wurde Kasein-Pepton-Agar gebraucht (DEMETER: Bakteriologische Untersuchungsmethoden von Milch, Milcherzeugnissen, Molkereihilfsstoffen und Versandmaterial, S. 48, 1943). Der pH-Wert aller Nährböden war pH 7,0, die Züchtungstemperatur 25°C. Die Nährböden enthielten kein Natriumchlorid..

RESULTATE

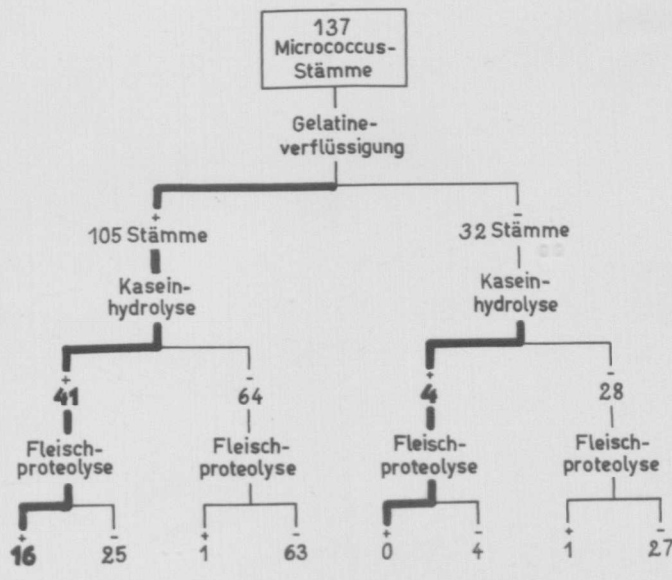
Vom Schema geht es hervor, dass insgesamt 45 Stämme (41 + 4) Kasein hydrolysierten. Von diesen 45 Stämmen waren 41 Stämme

Das Untersuchungsmaterial bestand aus 137, aus Fleisch und Fleischprodukten isolierten Mikrokokkenstämmen und 14 Bacillus-Stämmen, die aus verschiedenen Gewürzen isoliert waren. Von jedem Mikrokokkenstamm wurden 60 verschiedene Eigenschaften untersucht. Alle 137 Stämme waren in Bezug auf gewisse Eigenschaften unterschiedlich.

Die Proteolyseversuche wurden aus einer 48 Stunden alten Fleischbouillonkultur durchgeführt. Diese Kultur wurde auf Gelatine-, Kasein- und Fleischnährboden geimpft. Die Resultate der Versuche zeigten, dass alle 14 Bacillus-Stämme Gelatine, Kasein und Fleisch abbauten.

Von den 137 Micrococcus-Stämmen waren 105 fähig, Gelatine zu verflüssigen, 41 von diesen 105 Stämmen hydrolysierten Kasein. 16 Stämme von den 41 verursachten die Proteolyse von Fleisch. Die 64 Kasein nicht hydrolysierenden Stämme enthielten einen Stamm, der die Proteolyse vom Fleisch verursachte.

Die Gruppierung der untersuchten Stämme auf Grund der proteolytischen Eigenschaften geht am besten aus der unterstehenden schematischen Darstellung hervor!





Von dem Schema geht es hervor, dass insgesamt 45 Stämme (41 + 4) Kasein hydrolysierten. Von diesen 45 Stämmen waren 41 Stämme fähig Gelatine zu verflüssigen, aber nur 16 Stämme verursachten die Proteolyse vom Fleisch. Zwei Stämme dagegen proteolysierten Fleisch, aber hydrolysierten nicht Kasein.

#### Zusammenfassung

Beim Untersuchen die proteolytischen Eigenschaften der Bakterien muss man die chemische Natur des betreffenden Eiweissstoffes berücksichtigen. Das Vermögen der Bakterien Gelatine, Kasein oder Fleisch abzubauen ist unterschiedlich, und derselbe Stamm ist nicht immer fähig, alle diese Eiweissubstrate zu proteolysieren. Dies ist verständlich, wenn man daran denkt, wie unterschiedlich der chemische Charakter dieser Eiweissstoffe ist.

Es ist deswegen aus diesem Grund möglich, Schlussfolgerungen aus der proteolytischen Fähigkeit gewisser Bakterienstämme nur gegen dasjenige Eiweissubstrat, was der Testnährboden enthält, zu ziehen. Denkt man an die Proteolyse des Fleisches, kann man diesbezügliche Schlussfolgerungen nur dann ziehen, wenn der Nährboden Fleischeiweiss, nicht aber wenn er z. B. Kasein oder Gelatine als Eiweissubstrat enthält.

#### Summary

When studying the proteolytic properties of bacteria the chemical nature of the proteins in question must be taken into account. The ability of bacteria to decompose gelatine, casein or meat is different and the same strain is not always able to decompose all these substrata. This is due to the fact that the chemical nature of these proteins is different.

It is therefore possible to draw conclusions from the proteolytic ability of certain bacteria strains only against the protein which the test culture medium contains. In case of meat proteolysis conclusions can be drawn first then when the culture medium contains meat protein but not e.g. casein or gelatine as protein substratum.

Sixth Meeting of Meat Research Institutes

Utrecht: August 29th - September 3rd 1960

Über die Bedeutung einiger stark proteolytischen, zur Gattung Bacillus angehörigen Stämme bei der Reifung der Rohwurst. In höchstem Grade ausschlaggebende Bedeutung hinsichtlich des Wachstums und der Vermehrung der Bakterien.

Von M.S. Pohja und F.P. Niinivaara

Forschungsanstalt der Genossenschaftlichen Schlachthöfe, Hämeenlinna, Finnland.

In die Rohwurstmasse gelangen stets Bakterien verschiedener Art in grösserer oder geringerer Menge mit den zur Herstellung benutzten Rohstoffen und Zusatzstoffen, durch Vermittlung der Hände und der Kleidung der Arbeiter und der bei der Herstellung benutzten Geräte sowie aus der Luft. Die in der Rohwurst während der Reifung bestehenden Verhältnisse - Salzgehalt, pH-Wert, Temperatur und Wassergehalt - haben jedoch einen Einfluss darauf, welche in die Wurst geratenen Bakterien im Verlauf der Vortrocknung imstande sind sich zu vermehren und zu wachsen. Aus diesem Grunde muss man beim Untersuchen der in Rohwurst vorkommenden Bakterien solche Züchtungsverhältnisse anwenden, welche den Verhältnissen in der Rohwurst während des Reifungsprozesses entsprechen. Nur dann sind an Hand der erzielten Ergebnisse Schlüsse möglich, inwiefern gewisse Bakterien in der Rohwurst sich zu vermehren und zu wachsen sowie gewisse Änderungen in der Wurstmasse hervorzurufen vermögen.

Unter den das Verderben der Rohwurst herbeiführenden Bakterien hat man im allgemeinen die Organismen der Gattung Bacillus für die schädlichsten gehalten. Von diesen könnten insbesondere die stark proteolytischen Bakterien äusserst schädlich wirken. Es hat sich jedoch gezeigt, dass in verdorbenen Rohwürsten durchaus nicht immer Organismen der Gattung Bacillus sondern meistens gewisse Lactobazillen vorkommen (CORETTI, Arch. f. Leb. Hyg. 9, 32, 1958).

In der Untersuchungen, in denen der schädliche Einfluss der Organismen der Gattung Bacillus bei der Rohwurstreifung studiert wurde, ist deren proteolytische Eigenschaft und ihre Abhängigkeit



vom pH-Wert und vom NaCl-Gehalt des Milieus sowie von der Züchtungstemperatur nicht untersucht worden. Im allgemeinen hat man dem pH-Wert des Milieus keine Beachtung geschenkt, obwohl dieser in höchstem Grade ausschlaggebende Bedeutung hinsichtlich des Wachstums und der Vermehrung der Bakterien besitzt. Wenn z.B. irgendein Bakterienstamm bei dem pH-Wert 7,5 und der NaCl-Konzentration 5 % des Nährbodens sowie bei der Züchtungstemperatur 37°C Fleisch proteolysiert, so kann hieraus nicht der Schluss gezogen werden, dass er das Fleisch auch in der Rohwurst proteolysieren würde, in welcher der pH-Wert 5,8, der NaCl-Gehalt 5 % und die Temperatur 20°C beträgt. In der vorliegenden Untersuchung wurde die proteolytische Eigenschaft einiger aus Gewürzen isolierten, stark proteolytischen Stämme der Gattung Bacillus in ihrer Abhängigkeit von pH-Wert, Salzgehalt und Züchtungstemperatur untersucht. Diese Bacillus-Stämme, die eine derart starke proteolytische Eigenschaft besaßen, dass sie selbst die schwerlöslichsten Eiweißstoffe des Fleisches in lösliche Form abbauten, erwiesen sich laut den Ergebnissen unserer Versuche als unfähig, das Fleisch unter den in der Rohwurst während des Reifungsprozesses herrschenden Verhältnissen (pH 5,9-4,9, 4-5 % NaCl, Temperatur 20°C) zu proteolysieren. Auf Grund der Resultate können wir feststellen, dass jedenfalls die hier untersuchten stark proteolytischen Bacillus-Stämme nicht das Verderben von Rohwurst herbeiführen können, insofern die Wurst einen pH-Wert unter pH 6,0 und einen Salzgehalt über 4 % aufweist und die Reifungstemperatur etwa 20°C ist. Unsere Untersuchungen erhärten die von CORETTI (1958) ausgesprochene Ansicht, dass die Bacillus-Stämme schwerlich als die allgemeinsten Verursacher des Verderbens der Rohwurst angesehen werden können.

Die übliche Herstellungstemperatur der Rohwurst ist heutzutage 20°C. In dieser Temperatur vermochten die untersuchten Bacillus-Stämme Proteolyse im pH-Bereich 4,9-7,0 nur dann herbeizuführen, wenn die Salzkonzentration geringer als 2,5 % war (Abb. 1 und 2).

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

### Isolierung der Stämme und ausgeführte Versuche

Aus schwarzem Pfeffer, Gewürzpfeffer und Majoran wurden insgesamt 14 der Gattung Bacillus angehörende Stämme isoliert. Mit sämtlichen 14 Stämmen wurde der Fleisch-Proteolyseversuch nach dem von uns ausgearbeiteten sog. Hydrolysezonenverfahren (vgl. POHJA et al., Fleischwirtschaft, 12, 1960, im Druck) angestellt. Dabei übten 4 Stämme, sämtlich aus schwarzem Pfeffer herkommend, einen äusserst starken proteolytischen Einfluss auf Fleisch aus. Mit diesen Stämmen wurden dann Fleisch-Proteolyseversuche ausgeführt, bei denen Fleischnährböden mit pH-Werten zwischen pH 4,9 und 7,0 und mit NaCl-Konzentrationen zwischen 0 und 10 % sowie die Züchtungstemperaturen 20°, 25° und 37°C zur Anwendung kamen (vgl. Abb. 2).

Die als Versuchsorganismen benutzten vier Stämme wurden nach BERGEY's Manual, 7. Aufl. (1957) und nach dem Werk "Aerobic Sporeforming Bacteria" (SMITH, GORDON and CLARK, 1952) identifiziert. Es zeigte sich, dass der Stamm Nr. 7 der Beschreibung von B. licheniformis und die Stämme Nr. 6, 9 und 12 derjenigen von B. subtilis entsprachen.

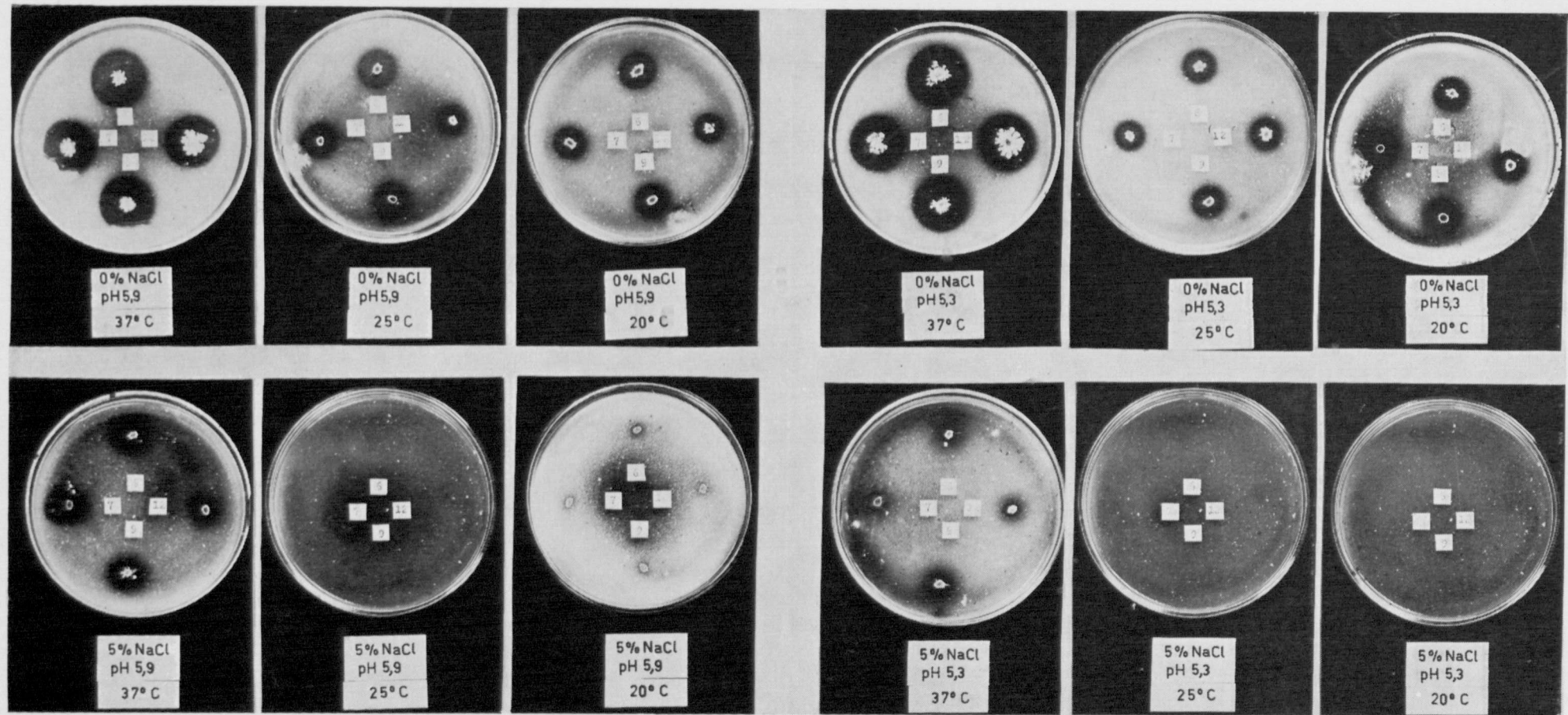
### Ergebnisse

Beim Untersuchen der besagten Bacillus-Stämme mit proteolytischem Einfluss auf Fleisch und der Abhängigkeit der von ihnen bewirkten Proteolyse von a) Temperatur, b) pH-Wert und c) Salzkonzentration ergaben sich folgende Feststellungen:

#### Temperatur 20° C

Die übliche Herstellungstemperatur der Rohwurst ist heutzutage 20°C. In dieser Temperatur vermochten die untersuchten Bacillus-Stämme Proteolyse im pH-Bereich 4,9-7,0 nur dann herbeizuführen, wenn die Salzkonzentration geringer als 2,5 % war (Abb. 1 und 2).





A

B

Abb. 1. Die proteolytische Wirkung einiger *Bacillus*-Stämme auf Fleischnährboden in verschiedenen pH-Werten, Salzkonzentrationen und Züchtungstemperaturen.

Gruppe A: pH-Wert des Nährbodens = pH-Wert des Rohwurstbrätes.

Gruppe B: pH-Wert des Nährbodens = pH-Wert der fertigen Rohwurst.

War die Salzkonzentration 3 % und pH höher als 5,3, so fand sehr schwache Proteolyse statt, und bei der Salzkonzentration 4 % ergab sich Proteolyse nur wenn pH über 6,2 lag. Bei der üblichen Salzkonzentration der Rohwurst, 4-5 % und bei ihrem normalen pH-Wert 5,0 bewirkten die untersuchten Bacillus-Stämme in der Temperatur 20°C keine Proteolyse. Bei den in der Rohwurst bestehenden Verhältnissen, d.h. im pH-Bereich 5,9-4,9, bei der NaCl-Konzentration 4 % und in der Temperatur 20°C die untersuchten Bacillus-Stämme keine Fleischproteolyse herbeizuführen vermögen. Da unter diesen Verhältnissen auch keine Vermehrung und kein Wachstum der Stämme stattfindet, können sie keine Veränderungen in der Rohwurst bewirken. Ist die Herstellungstemperatur der Rohwurst 25°C, so verursachen die Bacillus-Stämme keine Veränderungen in der Rohwurst, insofern der Salzgehalt der Rohwurst mindestens 5 % beträgt und der pH-Wert der Wurstmasse unter pH 5,9 liegt. Wenn dagegen die Herstellung der Rohwurst bei hoher Temperatur, z.B. 37°C erfolgt, rufen die Bacillus-Stämme noch bei einer NaCl-Konzentration von 7,5-8 % Fleischproteolyse in der Rohwurst hervor.

Dagegen können Bacillus-Stämme das Verderben von Brühwürsten verursachen. Bei den Brühwürsten beträgt die NaCl-Konzentration

Abb. 2

Über die Wirkung von pH-Wert, Salzkonzentration und Züchtungstemperatur auf die von Bacillus-Stämmen verursachten Proteolyse des Fleisches.

Temperatur 25°C

Erhöhen der Temperatur vermehrte die Stärke der von den untersuchten Bakterien herbeigeführten Proteolyse. Bei 20°C wurde Proteolyse im pH-Bereich 4,9-7,0 bis zur Salzkonzentration 4 % festgestellt. Wenn die Salzkonzentration auf 5 % erhöht wurde, zeigte sich keine Proteolyse mehr.

Temperatur 37°C

Wenn die Züchtungstemperatur 37°C beträgt, findet Proteolyse in einem ausgedehnten pH- und Salzkonzentrationsbereich statt,



bestehenden Verhältnissen (pH unter 4,9, NaCl-Konzentration von 7 %). Erst mit der Salzkonzentration 7,5 % erfolgte bei pH 4,9 keine Proteolyse und kein Wachstum mehr. Bei höherem pH-Wert ergab sich Proteolyse bei Salzkonzentrationen bis zu 8 %.

Betrachten der Abb. 2 lässt erkennen, dass unter den in der Rohwurst bestehenden Verhältnissen, d.h. im pH-Bereich 5,9-4,9, bei der NaCl-Konzentration 4 % und in der Temperatur 20°C die untersuchten Bacillus-Stämme keine Fleischproteolyse herbeizuführen vermögen. Da unter diesen Verhältnissen auch keine Vermehrung und kein Wachstum der Stämme stattfindet, können sie keine Veränderungen in der Rohwurst bewirken. Ist die Herstellungstemperatur der Rohwurst 25°C, so verursachen die Bacillus-Stämme keine Veränderungen in der Rohwurst, insofern der Salzgehalt der Rohwurst mindestens 5 % beträgt und der pH-Wert der Wurstmasse unter pH 5,9 liegt. Wenn dagegen die Herstellung der Rohwurst bei hoher Temperatur, z.B. 37°C erfolgt, rufen die Bacillus-Stämme noch bei einer NaCl-Konzentration von 7,5-8 % Fleischproteolyse in der Rohwurst hervor.

Dagegen können Bacillus-Stämme das Verderben von Brühwürsten verursachen. Bei den Brühwürsten beträgt die NaCl-Konzentration gewöhnlicherweise etwa 2 % und der pH-Wert 6,0-6,4. Unter diesen Verhältnissen bewirken die Bacillus-Stämme Fleischproteolyse und sie können somit zum Verderben der Brühwurst Anlass geben (vgl. Abb. 2).

#### Zusammenfassung

Aus schwarzem Pfeffer, Gewürzpfeffer und Majoran wurden 14 der Gattung Bacillus angehörige Stämme isoliert. Sämtliche Stämme proteolysierten Fleisch, jedoch nur vier derselben in starkem Mass. Mit diesen vier Stämmen wurden Fleischproteolyse-Versuche vorgenommen, bei denen Fleischnährböden mit pH-Werten von pH 4,9 bis 7,0 und NaCl-Konzentrationen von 0 bis 10 % sowie die Züchtungstemperaturen 20°, 25° und 37°C zur Anwendung kamen. Die Ergebnisse zeigen, dass unter den in der Rohwurst

bestehenden Verhältnissen (pH unter 4,9, NaCl-Konzentration höher als 4 % und Temperatur 20°C) die Bacillus-Stämme keine Veränderungen in der Wurst herbeizuführen vermögen. In der Temperatur 25°C waren die untersuchten Stämme nicht imstande, irgendwelche Veränderungen zu bewirken, wenn die NaCl-Konzentration höher als 5 % war. Die Bacillus-Stämme sind in Rohwurst nicht schädlich, insofern die Wurstmasse pH-Wert unter pH 5,9 und eine NaCl-Konzentration über 4 % hat und die Reifungstemperatur 20°C oder niedriger ist.

### Summary

Fourteen strains of bacteria belonging to the genus Bacillus were isolated from black pepper, allspice and majoran. All fourteen were found to cause proteolysis of meat, but only four of them in a strong degree. Meat proteolysis experiments were carried out with these four strains, employing meat substrates having varying pH values between pH 4,9 and 7,0 and NaCl concentrations from 0 to 10 %, and the cultivating temperatures being 20°, 25° and 37°C. The results show that in the conditions prevailing in dry sausage (pH below 4,9, NaCl concentration higher than 4 %, and ripening temperature 20°C) the Bacillus strains are unable to cause any changes in the sausage. At 25°C, the investigated strains could not produce any changes if the NaCl concentration exceeded 5 %. Bacillus strains are not detrimental in dry sausage if the sausage mix has pH lower than 5,9 and a NaCl concentration in excess of 4 % and if the temperature during the ripening process is 20°C or lower.