2189

Sonderdruck aus „DIE FLEISCHWIRTSCHAFT", 44. (16.) Jahrgang Mai 1964 — Heft 5 — Seite 4
Verlag: Verlagshaus Sponholz, Frankfurt am Main, Großer Hasenpfad 42-48 — Berlin-Schöneberg, Martin-Luther-Str. 120
Redaktion: Prof. Dr. Helmut Bartels, Gießen

Dr. M. S. Pohja, Hämeenlinna
und Prof. Dr. F. P. Niinivaara, Helsinki, Finnland

Aus dem Forschungszentrum für die Fleischindustrie Häm
linna-Finnland und dem Institut für Fleischtechnologie de
Universität Helsinki-Finnland

Eigenschaften und Bedeutung der in Rohwurst und in Pökellake vorkommenden Fett abbauenden Bakterien

Über den Beitrag von Mikroben zu den in der Rohwurst während der Reifung stattfindenden Veränderungen sind zahlreiche Untersuchungen durchgeführt worden. Dabei hat die Aufmerksamkeit in erster Linie den Veränderungen in der Zusammensetzung der Bakterienflora sowie der Zahl, den Eigenschaften und der Bedeutung der die Nitratreduktion und die Bildung von Säuren fördernden Bakterien gegolten. Weiter befaßte sich eine erhebliche Zahl von Untersuchungen mit den das Verderben der Rohwürste bewirkenden Organismen und mit ihren Eigenschaften.

Im Reifungsprozeß der Rohwurst spielt neben der Farbentstehung und der Bildung von Säuren die Aromabildung eine wichtige Rolle, über die verhältnismäßig wenige Arbeiten veröffentlicht worden sind (**Eser** und **Niinivaara** 1963). Die Aromabildung in ihrer Gesamtheit ist eine komplizierte, von Bakterienfermenten und fleischeigenen Enzymen herbeigeführte Ereignisreihe, welche **Terplan** (1962) als „fermentative Aromabildung" bezeichnet. Dies bezieht sich in erster Linie auf den hydrolytischen Abbau des Eiweißes, der Fette und der Kohlenhydrate des Fleisches. Von Einfluß auf die Bildung des endgültigen Aromas des Erzeugnisses sind ferner viele herstellungstechnische Faktoren, wie z. B. die Räucherung, die Art und Menge der Gewürze, das Salz, das Nitrit und das Nitrat.

A. Frühere Untersuchungen

1. Allgemeines über die Fett abbauenden Mikroben

Die Fett löslichen (lipolytischen) Bakterien stellen eine heterogene Gruppe von Bakterien dar. Solche sind z. B. in den Gattungen **Pseudomonas, Achromobacter, Alcaligenes, Serratia, Proteus, Bacillus, Clostridium** und **Micrococcus** zu finden. Auch viele Schimmelarten und Hefen besitzen lipolytische Eigenschaften. Wenn in Fleischprodukten anwesend, können diese Bakterien Zersetzung des fleischeigenen Fetts und des zugesetzten Specks und Talgs herbeiführen. Das von ihnen gebildete Lipaseenzym fördert katalytisch die Hydrolyse dieser Fette zu Glycerol und Fettsäuren. Insbesondere in der Rohwurst mit ihrer Reifungstemperatur von etwa +20 °C *und einer* Reifungsperiode von mehreren Tagen können die lipolytischen Bakterien einen Fettabbau bewirken. Das Lipasebildevermögen und die Lipaseaktivität dieser Bakterien sind gegebenerweise stark vom pH-Wert der Wurstmasse, von der Salzkonzentration und von der Reifungstemperatur der Wurst abhängig.

Nach den Untersuchungen von **Maillet** und **Henry** (1960) nahm in Rohwurst die Menge der Fettsäuren von ursprünglich 0,45 % auf 2—4 % und sogar bis auf 5—7 % zu. Zahlreiche Forscher führen an, daß der Fettabbau das Aroma des Produkts beeinflußt (**Keller** 1954, 1955, **Keller** und **Meyer** 1954, **Losem** 1956, **Meyer** 1954, **ten Cate** 1960 u. a. m.). **Terplan** (1962) erwähnt u. a., daß bei der Herstellung von Rohwurst die Lipolyse bis zu einer gewissen Grenze erwünscht ist. Insofern im Produkt auch oxydative Bakterien vorhanden sind, kann Oxydation des Fetts eintreten, die vom Standpunkt des Aromas nachträglich sein kann. Viele der in Rohwurst vorkommenden Lipolyten, die den Gattungen **Achromobacter, Alcaligenes, Escherichia, Aerobacter** und **Pseudomonas** angehören, erzeugen bei ihrem Wachstum auf Fett enthaltenden Nährböden Substanzen mit Fruchtgeruch. Man kann folglich annehmen, daß gewisse Lipolyten **eine günstige Wirkung auf die Aromabildung der Rohwurst ausüben, sofern keine Oxydation der freigesetzten Fettsäuren stattfindet.**

2. Über die auf das Wachstum und auf die Lipaseaktivität der lipolytischen Bakterien einwirkenden Faktoren

Die optimale Temperatur und der optimale pH-Wert für das Wachstum der lipolytischen Bakterien sind nicht immer die gleichen wie diejenigen für ihre Lipaseaktivität.

Nashif und **Nelson** (1953a) geben an, daß die von den meisten untersuchten Bakterien erzeugte Lipase im pH-Bereich 7,0—7,2 die stärkste Aktivität aufweist. Einige haben ihr pH-Optimum bei pH 7,8. Der optimale pH-Wert der Lipase von zahlreichen Schimmelarten und Hefen liegt etwas unter pH 7,0.

Die von **Pseudomonas fragio** gebildete Lipase ist aktiv im pH-Bereich 4,9 bis 8,2 mit einem Optimum bei pH 5,7—6,6. Am meisten Lipase wurde bei einer Züchtungstemperatur von +15 °C gebildet, während dagegen bei +30 °C überhaupt keine oder nur wenig Lipase entstand. Für zahlreiche andere Gramnegative Bakterien betrug die optimale Temperatur der Lipasebildung etwa +20 °C, obgleich das Optimum der Lipaseakti etwa +40 °C lag (**Nashif** und **Nelson** 1953b). **Alford** und **Elliot** (1 **Alford et al.** (1961) und **Alford** und **Pierce** (1961) stellten ebenfalls am meisten Lipase bei niedrigen Temperaturen gebildet wurde. zeugte **Pseudomonas fluorescens** reichlich Lipase bei +20 °C, woc Lipasebildung bei +30 °C äußerst gering war. Die Vermehrung Wachstum der Zellen war jedoch bei +30 °C am stärksten. Je rechnet ergab sich ungefähr ebensoviel Lipase bei +5 °C wie bei

Alford und **Elliot** (1960) stellten ferner Versuche mit verschiede straten an und fanden, daß sich in 1 %iger Peptonbrühe zu Be pH 7,0 am meisten Lipase bildete. Das Optimum für die Lipasebilc etwa pH 7,0, obgleich solche auch noch bei pH-Werten unter 6,0 wurde. **Sulzbacher** und **Alford** (1961) haben weiterhin festgestellt Substrat mit reichlichem Kohlenhydratgehalt die Lipasebildung z stand bringt. Am meisten Lipase bildet sich, wenn die Bakterier freier 1 %iger, auf pH 7,0 gepufferter Peptonbrühe wachsen.

Nashif und **Nelson** (1953a) haben beobachtet, daß bei einer Phos zentration des Nährbodens über 0,05-M die Lipasebildung inhibi Ferner fanden sie, daß schon 1 % NaCl die Lipaseerzeugung durch **monas fragio** störte, und bei einer NaCl-Konzentration von 3% überhaupt keine Lipaseaktivität wahrgenommen.

Auch die Größe der Fettkugeln im Substrat ist wichtig. **Goldr Rayman** (1952) wiesen nach, daß nicht so sehr die chemische Zus setzung des Fetts die Stärke der Lipolyse beeinflußt als vielmehr stand, in wie feinen Tröpfchen das Fett im Nährboden verteilt ist

3. Der Nachweis der lipolytischen Bakterien

Beim Untersuchen der lipolytischen Bakterien hat man als Nährbo Rindertalg, Erdnuß-, Baumwollsamen-, Kokos- und Palmöl, Butt garine, Tween, Tributyrin und Eidotter verwendet. Lipolytische B bilden auf diesen Substraten um die Kolonie entweder eine kla oder eine Trübung. Zum Nachweis der Bildung freier Fettsäuren fernerhin verschiedene Indikatorfarbstoffe wie z. B. Nilblausulph troriablau u. dgl. benutzt.

Viele der in Gebrauch stehenden Verfahren haben gewisse Nacht Tributyrin haben u. a. **Anderson** (1934) und **Rhodes** (1959) experir Beim Anwenden desselben können jedoch die Ergebnisse ungenau Tributyrin leicht hydrolysiert wird. Bekanntlicherweise zerfällt es in alkalischen Milieu (**Tammisto** 1933, **Rath** 1961). Dies bringt mit stark alkalische Bakterien auf Tributyrinsubstrat eine positive R zeitigen, selbst wenn sie u. U. keine lipolytischen Eigenschaften h

Turner (1929) sowie **Collins** und **Hammer** (1934) bedienten sich zu weis der Lipolyse des Nilblausulphats als Zusatz zu Agar. Sie fand bei, daß es sich gut zum Nachweis der Lipolyse eignet, dabei abe hervorrufen kann, indem es das Wachstum einiger Mikroben i **Long** und **Hammer** (1937) erwähnen, daß Nilblausulphat das best zum Nachweis der Lipolyse sei. Da das Reagenz das Wachstum Mikroben verhindert, ist der Indikator nach erfolgter Züchtung Kolonien zuzugeben.

Unter Anwendung von Viktoriablau läßt sich die Lipolyse ebenso wie mit Nilblausulphat nachweisen. Diesen Indikator haben u. a (1958) sowie **Jones** und **Richards** (1952) benutzt. Viktoriablau i jedoch das Wachstum Gram-positiver Bakterien.

Rath (1961) hat alle obengenannten Verfahren ausprobiert, aber derselben als hinreichend gut und zuverlässig befunden. Er hat ei fiziertes Viktoriablau-Verfahren zum quantitativen Nachweis der tischen Bakterien ausgearbeitet. Bei diesem wird in eine Petrischale Agar gegossen und dieser dann mit inokuliertem Nährstoffsubstra schichtet. Die Züchtung erfolgt bei +30 °C, der durchschnittlichen O temperatur für das Wachstum lipolytischer Bakterien. Wenn sich di nien wohl ausgebildet haben, wird mit Viktoriablau gefärbtes Fett z ben. Nach 3- bis 6tägiger Inkubation bei 25 °C, der durchschnittlich timaltemperatur der Lipaseaktivität, umgeben sich die lipolytischer nien mit einer tiefblauen Färbung, während die Kolonien ihre Farbe haben.

Zusammenfassung

wurden die lipolytischen Eigenschaften der in Rohwurst und in Pökelke vorkommenden Bakterien untersucht. Insgesamt 127 Bakterienstämme wurden auf ihre lipolytischen Eigenschaften geprüft. Die lipolytische Aktivität jedes Bakterienstammes hängt von vielen Faktoren ab. Entscheidend ist die Art des Fettes. Beim Untersuchen der Bedeutung der lipolytischen Bakterien in der Rohwurstreifung, müssen auch andere Umgebungsfaktoren, wie der pH-Wert, Natriumchloridkonzentration und die Züchtungstemperatur berücksichtigt werden. Es gibt nur ausnahmsweise eine direkte Korrelation zwischen Wachstumsintensität und Lipaseaktivität der Bakterien.

Literatur

Alford, J. A. und Elliott, L. E., 1960. Lipolytic activity of Microorganisms at low and intermediate temperatures. I. Action of Pseudomonas fluorescens on lard. Food Res. **25**, 296—303.

Alford, J. A., Elliott, L. E., Hornstein, I. und Crowe, P. F., 1961. Lipolytic activity of micrococci at low and intermediate temperatures. II. Fatty acids released as determined by gas chromatography. Food Sci. **26**, 234—238.

Alford, J. A. und Pierce, D. A., 1961. Lipolytic activity of microorganisms at low and intermediate temperatures. III. Activity of microbial lipases at temperatures below 0 °C. Food Sci. **26**, 518—524.

Alifax, R., 1958. Die Verwendung von Sorbitol-monolaurat (Tween 20) als Fettemulgator in bestimmten Nährböden zur Untersuchung lipolytischer Mikroorganismen. Le Lait **38**, 129—134. Ref. Rath, 1961.

Anderson, J. A., 1934. An agar plate method for the detection and enumeration of lipolytic microorganisms. J. Bact. **27**, 69—70.

Collins, M. A. und Hammer, B. W., 1934. Types of lipolysis brought out by bacteria, as shown by Nilebluesulphate. J. Bact. **27**, 487—496.

Eser, H. und Niinivaara, F. P. Gaschromatographische Untersuchungen über das Aroma der Rohwurst. Z. Lebensm.-Unters. u. -Forsch. Im Druck.

Goldman, M. L. und Rayman, M. M., 1952. Hydrolysis of fats by bacteria of the Pseudomonas Genus. Food. Res. **17**, 326—337.

Jones, A. und Richards, T., 1952. Night blue and Victoria blue as indicators in lipolysis media. Proc. Soc. appl. Bact. **15**, 82—93.

Jørgensen, A., 1956. Mikroorganismen der Gärungsindustrie. S. 538—539, Nürnberg.

Keller, H., 1954. Die bakterielle Aromatisierung der Rohwurst. Fleischwirtschaft **6**, 125—126.

Keller, H., 1955. Versuche zur bakteriellen Aromatisierung der Rohwurst. Ann. Inst. Pasteur **7**, 235.

Keller, H. und Meyer, E., 1954. Bakterielle Aromatisierung der Rohwurst. Fleischwirtschaft **6**, 453—454.

Long, H. F. und Hammer, B. W., 1937. Methods for the detection of lipolysis by microorganisms. J. Science **11**, 343—351.

Losem, P., 1956. Versuche zur Verbesserung von Dauerwurst durch Aromabakterien. Vet. Med. Diss., Gießen.

Maillet, J. und Henry, M., 1960. Etude de quelques produits de la proteolyse et de la lipolyse dans le saucisson cru. VI Sympos. sur les Matièrs Etrangères dans les Aliments. Madrid, Oct.

Meyer, E., 1954. Versuche zur bakteriellen Aromatisierung von Rohwürsten. Vet. Med. Diss., Gießen.

Nashif, S. A. und Nelson, F. E., 1953a. The lipase of Pseudomonas fragi. I. Caracterization of the enzyme. J. Dairy Sci. **36**, 459—470.

Nashif, S. A. und Nelson, F. E., 1953b. The extracellular lipases of some gram-negative non-sporeforming rod-shaped bacteria. J. Dairy Sci. **36**, 698—706.

Pohja, M. S., Rigler, F. und Niinivaara, F. P., 1960. Ein Verfahren zum Nachweis der Proteolyse in Fleisch. Fleischwirtschaft **12**, 834—835.

Rath, S., 1961. Ein Versuch zur Verbesserung der Methodik zur quantitativen Ermittlung lipolytischer Keime. Milchwissensch. Ber. **11**, 97—122.

Rhodes, M. E., 1959. The characterization of Pseudomonas fluorescens. J. Gen. Microbiol. **21**, 221—263.

Sierra, G., 1957. Studies on bacterial Esterases. Part I. Differentiation of a lipase and two ali-esterases during the growth of Pseudomonas aeruginosa and some observations on growth and esterase inhibition. Antonie van Leeuwenhoek **23**, 241—265.

Sulzbacher, W. L. und Alford, J. A., 1961. Lipolytic activity by psycrophilic bacteria. VII Europäischer Kongreß der Fleischforschungsinstitute.

Tammisto, E. S., 1933. Untersuchungen über die Lipasen von Bakterien. Ann. Acad. Scient. Fenn., Serie A, **38**, 5, 1—100.

Ten Cate, L., 1960. De Lipasen der Snijworst. Tijdschrift voor Diergeneeskunde, deel 85, afl. 16, 999—1001.

Terplan, G., 1962. Biologische, chemische und physikalische Vorgänge bei der Herstellung von gepökelten und gereiften Fleischwaren. Abhandlung zur Erlangung der Venia legendi. Aus dem Institut für Nahrungsmittelkunde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität, München.

Turner, R. H., 1929. The action of bacteria on fat. I. Relative merits of various differential plating media for lipase-producing organisms. J. Inf. Dis. **44**, 126—134. Ref. Rath, 1961.

Willis, A. T., 1960. J. Path. Bact. **80**, 379—390.

Anschrift der Verfasser: Dr. M. S. Pohja, Forschungszentrum für die Fleischindustrie Hämeenlinna (Finnland); Prof. Dr. F. P. Niinivaara, Institut für Fleischtechnologie, Universität Helsinki/Viikki (Finnland).

The properties and significance of lipolytic bacteria o salami-type sausages and in curing brines

By Dr. M. S. Pohja, Hämeenlinna and Prof. Dr. F. P. Nii Helsinki

The lipolytic properties of the bacteria in dry sausage anc investigated. In total 127 strains were examined regarding tl properties. The lipolytic activity of each strain depends factors. The kind of fat is of decisive importance. When the of the lipolytic bacteria in the ripening of dry sausage is also other environmental factors like the pH value, sodi concentration and the growth temperature must be taken i ration. There is only exceptionally a direct correlation l intensity of the growth and the lipolytic activity of the ba

Sur la nature et l'importance des bactéries à effet lip trouvant dans de la saucisse crue et dans de la saum

Par le Dr. M. S. Pohja, Hämeenlinna, et le Prof. Dr. F. vaara, Helsinki.

On a analysé l'effet lipolytique des bactéries se trouvant saucisse crue et dans de la saumure. 127 espèces différentes c au total ont été analysées en vue d'en déterminer les effets respectifs. L'activité lipolytique de toute espèce de bactérie beaucoup de facteurs. Un des plus importants en est la n graisse en cause. En ce qui concerne l'analyse de l'influence les bactéries lipolytiques lors du processus de maturation de crue, il faut tenir compte aussi d'autres facteurs relatifs ambiants, tels que valeur-pH, concentration en chlorure de temperature du milieu des cultures. L'intensité de propagatio et l'activité de la lipase en tant que ferment bactérien d'auti en correlation directe que bien exceptionnellement.

Sobre las características y la importancia (influencia) terias lipolíticas (lipoides) que se encuentran en emb dos y salmueras

Por el Dr. M. S. Pohja de Hämeelinna y el Prof. Dr. F. F. Ni de Helsinki.

Se han examinado las características lipolíticas de las bacte encuentran en embutidos crudos y salmueras. Se han examin 127 cultivos de bacterias en cuanto a sus caracteristicas li actividad lipolítica de cada cultivo depende de muchos factor es la clase de grasa. Al estudiar (escudriñar) la importancia de las bacterias lipolíticas en la maduración de embutidos cruc tener en cuenta también el grado de acidez ó ph, el valor (fósforo, la concentración de cloruro de carbonato y la tempera la cría. Excepcionalmente existe sólo una correlación direc intensidad de crecimiento, vegetación y la actividad lipá bacterias.

Sulle caratteristiche e l'importanza dei batteri lipoliti nei salumi crudi e nelle salamoie

Del Dott. M. S. Pohja, Hämeenlinna e Prof. Dott. F. P. Nii Helsinki.

Si sono esaminate le proprietà lipolitiche dei batteri present crudi e nelle salamoie. In totale sono stati analizzati 127 cepp riguarda le loro caratteristiche lipolitiche. L'attività lipolit ceppo dipende da molti fattori. Determinante è la specie Nell'esaminare l'importanza dei batteri lipolitici nella stagi salumi crudi, occore prendere in cosiderazione anche altri fat tali, quali il valore del pH, la concentrazione del cloruro di temperatura delle colture. Solo raramente esiste una diretta tra l'intensità dell'accrescimento e l'attività della lipasi dei b

Druck: Westdeutsche Verlags- und Druckerei-Ges. mbH., 6 Frankfurt am Main

Zusammenfassung

wurden die lipolytischen Eigenschaften der in Rohwurst und in Pökel-
ce vorkommenden Bakterien untersucht. Insgesamt 127 Bakterienstämme wurden auf ihre lipolytischen Eigenschaften geprüft. Die lipolytische Aktivität jedes Bakterienstammes hängt von vielen Faktoren ab. Entscheidend ist die Art des Fettes. Beim Untersuchen der Bedeutung der lipolytischen Bakterien in der Rohwurstreifung, müssen auch andere Umgebungsfaktoren, wie der pH-Wert, Natriumchloridkonzentration und die Züchtungstemperatur berücksichtigt werden. Es gibt nur ausnahmsweise eine direkte Korrelation zwischen Wachstumsintensität und Lipaseaktivität der Bakterien.

Literatur

Alford, J. A. und Elliott, L. E., 1960. Lipolytic activity of Microorganisms at low and intermediate temperatures. I. Action of Pseudomonas fluorescens on lard. Food Res. **25**, 296—303.

Alford, J. A., Elliott, L. E., Hornstein, I. und Crowe, P. F., 1961. Lipolytic activity of micrococci at low and intermediate temperatures. II. Fatty acids released as determined by gas chromatography. Food Sci. **26**, 234—238.

Alford, J. A. und Pierce, D. A., 1961. Lipolytic activity of microorganisms at low and intermediate temperatures. III. Activity of microbial lipases at temperatures below 0 °C. Food Sci. **26**, 518—524.

Alifax, R., 1958. Die Verwendung von Sorbitol-monolaurat (Tween 20) als Fettemulgator in bestimmten Nährböden zur Untersuchung lipolytischer Mikroorganismen. Le Lait **38**, 129—134. Ref. Rath, 1961.

Anderson, J. A., 1934. An agar plate method for the detection and enumeration of lipolytic microorganisms. J. Bact. **27**, 69—70.

Collins, M. A. und Hammer, B. W., 1934. Types of lipolysis brought out by bacteria, as shown by Nilebluesulphate. J. Bact. **27**, 487—496.

Eser, H. und Niinivaara, F. P. Gaschromatographische Untersuchungen über das Aroma der Rohwurst. Z. Lebensm.-Unters. u. -Forsch. Im Druck.

Goldman, M. L. und Rayman, M. M., 1952. Hydrolysis of fats by bacteria of the Pseudomonas Genus. Food. Res. **17**, 326—337.

Jones, A. und Richards, T., 1952. Night blue and Victoria blue as indicators in lipolysis media. Proc. Soc. appl. Bact. **15**, 82—93.

Kr-gensen, A., 1956. Mikroorganismen der Gärungsindustrie. S. 538—539, Nürnberg.

Keller, H., 1954. Die bakterielle Aromatisierung der Rohwurst. Fleischwirtschaft **6**, 125—126.

Keller, H., 1955. Versuche zur bakteriellen Aromatisierung der Rohwurst. Ann. Inst. Pasteur **7**, 235.

Keller, H. und Meyer, E., 1954. Bakterielle Aromatisierung der Rohwurst. Fleischwirtschaft **6**, 453—454.

Long, H. F. und Hammer, B. W., 1937. Methods for the detection of lipolysis by microorganisms. J. Science **11**, 343—351.

Losem, P., 1956. Versuche zur Verbesserung von Dauerwurst durch Aromabakterien. Vet. Med. Diss., Gießen.

Maillet, J. und Henry, M., 1960. Etude de quelques produits de la proteolyse et de la lipolyse dans le saucisson cru. VI Sympos. sur les Matièrs Etrangères dans les Aliments. Madrid, Oct.

Meyer, E., 1954. Versuche zur bakteriellen Aromatisierung von Rohwürsten. Vet. Med. Diss., Gießen.

Nashif, S. A. und Nelson, F. E., 1953a. The lipase of Pseudomonas fragi. I. Caracterization of the enzyme. J. Dairy Sci. **36**, 459—470.

Nashif, S. A. und Nelson, F. E., 1953b. The extracellular lipases of some gram-negative non-sporeforming rod-shaped bacteria. J. Dairy Sci. **36**, 698—706.

Pohja, M. S., Rigler, F. und Niinivaara, F. P., 1960. Ein Verfahren zum Nachweis der Proteolyse in Fleisch. Fleischwirtschaft **12**, 834—835.

Rath, S., 1961. Ein Versuch zur Verbesserung der Methodik zur quantitativen Ermittlung lipolytischer Keime. Milchwissensch. Ber. **11**, 97—122.

Rhodes, M. E., 1959. The characterization of Pseudomonas fluorescens. J. Gen. Microbiol. **21**, 221—263.

Sierra, G., 1957. Studies on bacterial Esterases. Part I. Differentiation of a lipase and two ali-esterases during the growth of Pseudomonas aeruginosa and some observations on growth and esterase inhibition. Antonie van Leeuwenhoek **23**, 241—265.

Sulzbacher, W. L. und Alford, J. A., 1961. Lipolytic activity by psycrophilic bacteria. VII Europäischer Kongreß der Fleischforschungsinstitute.

Tammisto, E. S., 1933. Untersuchungen über die Lipasen von Bakterien. Ann. Acad. Scient. Fenn., Serie A, **38**, 5, 1—100.

Ten Cate, L., 1960. De Lipasen der Snijworst. Tijdschrift voor Diergeneeskunde, deel 85, afl. 16, 999—1001.

Terplan, G., 1962. Biologische, chemische und physikalische Vorgänge bei der Herstellung von gepökelten und gereiften Fleischwaren. Abhandlung zur Erlangung der Venia legendi. Aus dem Institut für Nahrungsmittelkunde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität, München.

Turner, R. H., 1929. The action of bacteria on fat. I. Relative merits of various differential plating media for lipase-producing organisms. J. Inf. Dis. **44**, 126—134. Ref. Rath, 1961.

Willis, A. T., 1960. J. Path. Bact. **80**, 379—390.

Anschrift der Verfasser: Dr. M. S. Pohja, Forschungszentrum für die Fleischindustrie Hämeenlinna (Finnland); Prof. Dr. F. P. Niinivaara, Institut für Fleischtechnologie, Universität Helsinki/Viikki (Finnland).

The properties and significance of lipolyt[illegible]teria occ[illegible] salami-type sausages and in curing brine[illegible]

By Dr. M. S. Pohja, Hämeenlinna and Prof. [illegible] P. Niin[illegible] Helsinki

The lipolytic properties of the bacteria in dr[illegible]ge and b[illegible] investigated. In total 127 strains were examine[illegible]ding thei[illegible] properties. The lipolytic activity of each s[illegible]epends o[illegible] factors. The kind of fat is of decisive importan[illegible]en the si[illegible] of the lipolytic bacteria in the ripening of d[illegible]ge is in[illegible] also other environmental factors like the p[illegible] sodiun[illegible] concentration and the growth temperature mu[illegible]ken int[illegible]ration. There is only exceptionally a direct [illegible]ation bet[illegible] intensity of the growth and the lipolytic activ[illegible]he bacte[illegible]

Sur la nature et l'importance des bactéries [illegible]ffet lipol[illegible] trouvant dans de la saucisse crue et dans d[illegible] saumur[illegible]

Par le Dr. M. S. Pohja, Hämeenlinna, et le [illegible] Dr. F. P. [illegible]vaara, Helsinki.

On a analysé l'effet lipolytique des bactéries [illegible]ouvant d[illegible] saucisse crue et dans de la saumure. 127 espèces [illegible]entes des [illegible] au total ont été analysées en vue d'en déterminer [illegible] effets li[illegible] respectifs. L'activité lipolytique de toute espèce [illegible]actéries [illegible] beaucoup de facteurs. Un des plus importants [illegible] la mat[illegible] graisse en cause. En ce qui concerne l'analyse de [illegible]fluence e[illegible] les bactéries lipolytiques lors du processus de ma[illegible]ation de L[illegible] crue, il faut tenir compte aussi d'autres facteu[illegible]elatifs au [illegible] ambiants, tels que valeur-pH, concentration en [illegible]lorure de [illegible] temperature du milieu des cultures. L'intensité de [illegible]propagation [illegible] et l'activité de la lipase en tant que ferment bacté[illegible]en d'autre [illegible] en correlation directe que bien exceptionnellement [illegible]

Sobre las características y la importancia (influencia) de [illegible]terias lipolíticas (lipoides) que se encuentran en embut[illegible]dos y salmueras

Por el Dr. M. S. Pohja de Hämeelinna y el Prof. Dr. F. F. Niin[illegible] de Helsinki.

Se han examinado las características lipolíticas de las bacteri[illegible] encuentran en embutidos crudos y salmueras. Se han examinad[illegible] 127 cultivos de bacterias en cuanto a sus características lipo[illegible] actividad lipolítica de cada cultivo depende de muchos factores [illegible] es la clase de grasa. Al estudiar (escudriñar) la importancia (i[illegible] de las bacterias lipolíticas en la maduración de embutidos crudos [illegible] tener en cuenta también el grado de acidez ó ph, el valor (ca[illegible] fósforo, la concentración de cloruro de carbonato y la temperatu[illegible] la cría. Excepcionalmente existe sólo una correlación directa [illegible] intensidad de crecimiento, vegetación y la actividad lipásic[illegible] bacterias.

Sulle caratteristiche e l'importanza dei batteri lipolitici nei salumi crudi e nelle salamoie

Del Dott. M. S. Pohja, Hämeenlinna e Prof. Dott. F. P. Niin[illegible] Helsinki.

Si sono esaminate le proprietà lipolitiche dei batteri presenti n[illegible] crudi e nelle salamoie. In totale sono stati analizzati 127 ceppi p[illegible] riguarda le loro caratteristiche lipolitiche. L'attività lipolitica [illegible] ceppo dipende da molti fattori. Determinante è la specie d[illegible] Nell'esaminare l'importanza dei batteri lipolitici nella stagion[illegible] salumi crudi, occore prendere in cosiderazione anche altri fattor[illegible] tali, quali il valore del pH, la concentrazione del cloruro di s[illegible] temperatura delle colture. Solo raramente esiste una diretta co[illegible] tra l'intensità dell'accrescimento e l'attività della lipasi dei batt[illegible]

Druck: Westdeutsche Verlags- und Druckerei-Ges. mbH., 6 Frankfurt am Mai[illegible]

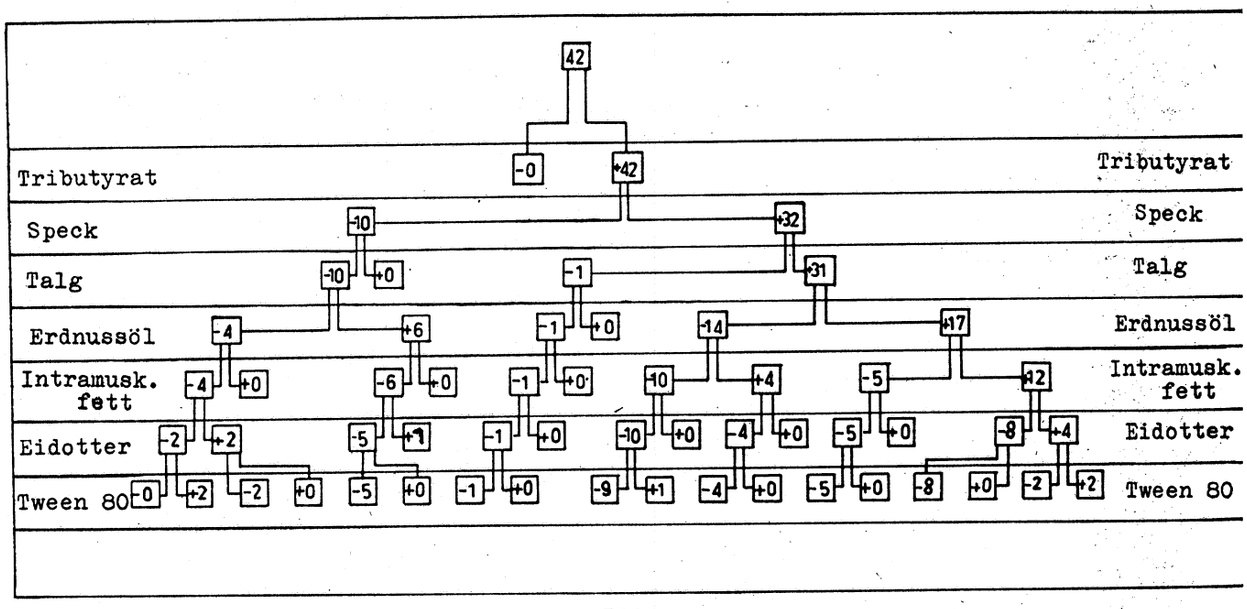

Bild 1:

Die von 42 isolierten Stämmen bewirkte Lipolyse auf verschiedenen Fettsubstraten.

+ : Lipolyse — : Keine Lipolyse

cher Tätigkeit unter den in der Rohwurst bestehenden Verhältnissen besitzen, wurde (qualitativ) die Abhängigkeit ihrer Lipaseaktivität vom pH-Wert, von der Salzkonzentration und von der Inkubationstemperatur untersucht.

Ausführung des Versuchs

Die Abhängigkeit der Lipaseaktivität der Bakterienstämme von pH-Wert, Salzkonzentration und Temperatur wurde auf Speck-Agaren untersucht, mit den Salzkonzentrationen 0, 1, 2, 3, 4 bzw. 5 % und bei jeder dieser Konzentrationen mit den pH-Werten 4,9, 5,3, 5,6, 5,8, 6,2, 6,5 und 7,0 sowie mit den Inkubationstemperaturen +12 °, +20 °, +25 °, +30 °, +35 ° und +40 °C.

Die Fettsubstrate wurden in folgender Weise bereitet: 30 g Pepton, 9 g Hefeextrakt und 45 g Agar wurden in Wasser zu 1500 ml aufgelöst. Von der Lösung wurden je 245 ml in sechs Erlenmeyerflaschen von 500 ml genommen und es wurde 1, 2, 3, 4 bzw. 5 % NaCl zugegeben, während die Nährlösung in einer Flasche keinen Salzzusatz erhielt. Die Lösungen wurden in üblicher Weise im Autoklav sterilisiert. Jede der Nährlösungen mit verschiedenen Salzgehalten wurde in Dosen zu je 35 ml auf sieben 200-ml-Erlenmeyerkolben unterteilt. Hiernach wurde in jeder Konzentrationsreihe der pH-Wert der Aliquoten von 35 ml durch Zugabe von 35 ml sterilisierter Mischung einer 0,1-molaren KH_2PO_4- und einer 0,1-molaren Na_2HPO_4-Lösung auf die obengenannten, von 4,9 bis 7,0 abgestuften Werte eingestellt. Die fertigen Lösungen, deren endgültige pH-Abstimmung mit sterilisierter 0,1-n HCl oder sterilisiertem 0,1-n NaOH erfolgte, waren 0,05-molar bezüglich der Phosphate.

Anschließend wurde in die Erlenmeyerkolben 2 ml zerlassenen, durch Gaze filtrierten und sterilisierten Specks gegeben. Die Lösungen wurden dann eine halbe Minute lang im Turrax-Homogenisator homogenisiert und unmittelbar in Petrischalen vergossen.

Die Inokulation mit den zu untersuchenden Stämmen erfolgte als Stichimpfung auf die Agaroberfläche aus 24 Stunden alter Nährbrühe (3 g Pepton, 3 g Hefeextrakt, 5 g Fleischextrakt und 1 g Glukose zu 1000 ml aufgelöst). Jede Schale wurde mit den obengenannten sieben Stämmen inokuliert.

Ergebnisse

Die Ergebnisse, in Bild 2 dargestellt, geben zu erkennen, daß alle sieben Stämme bei der Inkubationstemperatur +30 °C, bei Salzkonzentrationen von 0 bis 5 % und bei pH 5,9—6,5 Speck lipolysieren. Bei höherer oder niedrigerer Temperatur wurde die Lipaseaktivität geringer.

Alle Stämme mit Ausnahme von Nr. 61 bewirkten Lipolyse von Speck auch bei +12 °C, jedoch in bemerkenswerterem Maß nur, wenn dabei der pH-Wert 5,9 oder höher war. Die Lipaseaktivität scheint mit ansteigendem pH-Wert stärker zu werden. Wachstum der Stämme wurde in mehreren pH-Bereichen und bei verschiedenen Salzkonzentrationen verzeichnet, obwohl ihre Lipaseaktivität nahezu Null war.

Der Stamm Nr. 162 erwies sich als fähig, Speck in einem erheblich ausgedehnteren pH- und Temperaturbereich als die übrigen Stämme sowie gleichzeitig bei verschiedenen Salzkonzentrationen zu hydrolisieren. Jedoch bewirkte dieser Stamm ebensowenig wie die übrigen eine Specklipolyse bei den in der Rohwurst bestehenden Verhältnissen (pH 4,9 bis 5,9, Salzkonzentration 5 % und Temperatur +20 °C). Mit dem 162 ergab sich Lipolyse von Speck, wenn der Salzgehalt 4 % od war.

5. Die Eigenschaften der beim Untersuchen der Lipaseaktivit Stämme

Gemeinsame Eigenschaften

Sämtliche Stämme waren Gram-positiv, nicht sporentragen positiv, hämolyse-negativ, unbeweglich, oxydase- und perox tiv; sie bewirkten sämtlich Hydrolyse von Tributyrat sowie I Speck, Talg und Fleischfett; keiner der Stämme verursachte einem Tween 80 enthaltenden Substrat.

Mikrokokken

Alle Mikrokokkenstämme bildeten Säure aus Glukose, bewirk von Erdnußöl und Hydrolyse von Gelatine; sie waren ace wuchsen auf einem Nährboden mit 15 % NaCl, waren nic Harnstoff als einzige Stickstoffquelle zu verwerten. Die üb schaften waren wie folgt (Tabelle 2):

Tabelle 2

Die Eigenschaften einiger Mikrokokkenstämme

Eigenschaft	Stamm Nr 49	61	63
Lipolyse auf Eidotter-Agar	+	—	—
Fleischproteolyse*)	—	—	—
Kaseinhydrolyse	+	+	+
Für das Wachstum optimale NaCl-Konzentration			
0 %			+
5 %	+	+	
Säure aus Arabinose	+	+	—
Nitratreduktion	—	+	—

*) Der Fleischproteolyseversuch wurde nach dem von Pohja et al. (1960) Verfahren ausgeführt.

Gram-positive Stäbchen

Keiner der beiden Stämme bewirkte Lipolyse auf Eidott Stämme reduzierten nicht Nitrat, sie bildeten Säure aus Lact charose, aber nicht aus Raffinose; sie verursachten keine Fleis Nur der Stamm Nr. 81 bewirkte Lipolyse von Erdnußöl und Kasein sowie verflüssigte Gelatine.

Besprechung

In Rohwürsten und in Pökellaken kommen in recht reichlich lytische Bakterien vor. Der vorwiegende Teil derselben beste positiven Organismen, mit Mikrokokken in der Mehrheit. G stabförmige Bakterien fanden sich auch unter den isoliert jedoch in bedeutend geringerer Zahl. Hierzu trägt selbstvers der Umstand bei, daß der größte Teil der untersuchten Stämme

In qualitativen Arbeiten kann man die Lipolyse recht gut unter Anwendung von Eidotteragar (**Willis** 1960) oder von Tween 80 (**Sierra** 1957) nachweisen. Mittels des erstgenannten weist man die Lipolyse nach erfolgter Züchtung nach, indem man die Kolonien mit gesättigter Kupfersulphatlösung übergießt, wodurch die freigesetzten Fettsäuren stark blaugrün gefärbt werden. Bei dem von **Sierra** benutzten Tween 80-Substrat bildet sich um die lipolytischen Kolonien eine Trübung.

B. Eigene Untersuchungen

Die vorliegende Arbeit hatte den Zweck, aus Rohwürsten und Pökellaken lipolytische Bakterien zu isolieren sowie die folgenden Punkte zu untersuchen:

a) Das Vermögen der isolierten Stämme, auf verschiedenen Substraten Lipolyse (Fettabbau) herbeizuführen.

b) Die Abhängigkeit ihrer Lipaseaktivität vom pH-Wert, von der Kochsalzkonzentration und von der Temperatur des Milieus.

c) Ob sich unter den isolierten Bakterien Stämme befinden, die imstande sind, Lipolyse des Fetts in der Rohwurst unter den bestehenden Verhältnissen hervorzurufen.

1. Isolierung der Stämme

Zum Isolieren der Stämme wurde Tributyratagar (**Jones** und **Richards** 1952) benutzt. Das Grundsubstrat hatte folgende Zusammensetzung:

Hefeextrakt	3,0 g
Pepton	10,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	20,0 g
Leitungswasser	auf 1000 ml

Nach Einstellung auf pH 7,0 wurde 1 ml Glycerol-Tributyrat je 100 ml Grundsubstrat zugegeben. Anschließend wurde in üblicher Weise im Autoklav sterilisiert.

Mit Anwendung des obengenannten Nährbodens wurden aus 44 Rohwürsten und 8 Pökellaken insgesamt 127 Stämme isoliert, die sämtlich Hydrolyse des Tributyrats bewirkten. Unter diesen Stämmen fanden sich

Mikrokokken	76 Stämme
Gram-positive Stäbchen	32 Stämme
Gram-negative Stämme	19 Stämme

2. Die zum Nachweis der Lipolyse benutzten Fettsubstrate

Obgleich die Anwendung von Tributyrat beim Nachweis der lipolytischen Fähigkeit nicht immer ein zuverlässiges Ergebnis zeitigt, weil Tributyrat leicht in alkalischem Milieu hydrolysiert wird (**Tammisto** 1933, **Rath** 1961), wurde das besagte Substrat trotzdem in der vorliegenden Arbeit zur Isolierung der Bakterienstämme verwendet. Dieses Substrat ist leicht herzustellen und die eventuell Lipolyse verursachenden Stämme können von ihm leicht isoliert werden. Es ist auch zu vermuten, daß mit Tributyrat alle Lipolyten ausfindig gemacht werden können, die hingegen bei Anwendung von Nilblausulphat oder anderen Indikatoren u. U. der Entdeckung entgehen, da diese Indikatoren das Wachstum gewisser Bakterienstämme verhindern.

Zur Feststellung der lipolytischen Aktivität der 127 isolierten Bakterienstämme wurde mit sämtlichen Stämmen ein Lipolyseversuch unter Anwendung der folgenden Fettsubstrate vorgenommen (mit 3tägiger Inkubation bei +30 °C):

1. Eisenbergers Nilblau-Fettagar (**Jörgensen** 1956). Als Fettsubstanz diente Erdnußöl.

2. Eidotter-Agar (**Willis** 1960).
   Das Grundsubstrat war das gleiche wie im Tributyrat-Nährboden. Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt. Nach erfolgter Inkubation wurden die Schalen mit gesättigter $CuSO_4$-Lösung übergossen und der Überschuß der Lösung weggeschüttet. Die Kolonien umgeben sich bei Anwesenheit freier Fettsäuren mit einer stark blaugefärbten Zone.

3. Tween 80-Agar (**Sierra** 1957).
   Das Grundsubstrat enthielt 10,0 g Pepton, 5,0 g NaCl, 0,1 g $CaCl_2 \cdot H_2O$, 3,0 g Fleischextrakt, 0,2 g Fe-Citrat, 15 g Agar und destilliertes Wasser zu 1000 ml. Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt. Nach erfolgter Sterilisation wurde 1 ml autoklaviertes Tween 80 je 100 ml Grundsubstanz zugegeben.

4. Speck-Agar
   Das gleiche Grundsubstrat wie im Tributyratnährboden wurde verwendet. Der Speck wurde durch langsames Erhitzen zerlassen, durch Gaze filtriert und in normaler Weise im Autoklav sterilisiert. 2 ml zerlassenen Specks wurden zu 70 ml des Grundsubstrats zugegeben, der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und im Turrax-Homogenisator homogenisiert. Unmittelbar danach wurden die Petrischalen beschickt. Nach erfolgter Inkubation wurde die Anwesenheit freier Fettsäuren mittels gesättigter $CuSO_4$-Lösung festgestellt.

5. Talg-Agar
   Dieser Agar wurde in gleicher Weise wie der Speck-Agar bereitet. Auch hier wurden die freien Fettsäuren mit gesättigter $CuSO_4$-Lösung nachgewiesen.

6. Intramuskularfett-Agar
   Das Grundsubstrat war das gleiche wie im Tributyratn
   100 g gemahlenem Rinderbraten (von Musculus biceps fen
   150 g Kohlentetrachlorid und 25 g kristallwasserfreies
   geben; es wurde gut gemischt und das Gemisch unter
   Schütteln eine halbe Stunde in Zimmertemperatur stehen
   Extrakt wurde durch Filtrierpapier (**Schleicher und Schüll**
   aufgeschichtetem kristallwasserfreiem Na_2SO_4 filtiert, das
   auf dem Wasserbad eingedämpft und im Vakuumschr
   1 Stunde bei 100 °C getrocknet. 2 ml zerlassenes Fett wur
   Grundsubstrat zugegeben und im Turrax-Homogenisat
   siert, wonach unmittelbar die Petrischalen beschickt
   freien Fettsäuren wurden mittels gesättigter $CuSO_4$-I
   gewiesen.

In Verbindung mit den Untersuchungen wurde auch die Abs
Fleischfetts durch Zerlassen mit Hilfe von heißem Wasser
Fettausbeute fiel jedoch bedeutend geringer als bei der Kol
ridextraktion aus. Mit sämtlichen 127 Bakterienstämmen wu
lyseversuch gleichzeitig unter Verwendung mit Wasser und
tetrachlorid ausgezogenen Fette vorgenommen und es wur
stimmende Resultate erzielt.

3. Die von den isolierten Stämmen bewirkte Lipolyse auf v Fettsubstraten

Die erzielten Ergebnisse zeigten, daß von den 127 Stämmen,
Hydrolyse des Tributyrats herbeiführten, nur 42 eine Lipo
obengenannten Nährböden erzeugten, wie Tabelle 1 und
angeben.

Tabelle 1

Von den isolierten Bakterienstämmen auf verschiedenen F hervorgerufene Lipolyse

Insgesamt 127 Stämme. Inkubation: 3 Tage bei +3

Substrat \ Zahl der Stämme	Mikrokokken 76	Gram-pos. Stäbchen 32	Gram-neg. Stäbchen 19
Tributyrat	76	32	19
Erdnußöl	15	2	6
Eidotter	3	0	3
Tween 80	4	0	1
Speck	27	4	1
Talg	26	4	1
Intramuskularfett	11	4	1

Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß sich unter den Gram-positiv
bedeutend mehr Speck, Talg und intramuskulares Fett li
Stämme als unter den Gram-negativen fanden. Desgleichen si
die Zahl der Stämme mit lipolytischer Wirkung auf tierische
den Mikrokokken größer als unter den stabförmigen Bakteri
Tributyratsubstrat ist gut zum Isolieren der Stämme geeignet,
tuelle Lipolyse ohne Indikatoren festzustellen ist. Stämme,
butyrat lipolysieren, bewirken jedoch nicht immer Lipoly
Fette, und es ist deshalb notwendig, das lipolytische Vermö
lierten Stämme erneut unter Anwendung von Tierfett im N
untersuchen.

Tabelle 1 läßt ferner erkennen, daß die beim Nachweis des
Vermögens von Bakterienstämmen recht allgemein verwend
und Eidottersubstrate sich nicht als Nährboden beim Studium
keit von Bakterien, die in Fleischprodukten vorkommen,
scheinen.

Aus Bild 1 kann man sehen, welche Stämme auf den verschi
substraten lipolytische Wirkung entfaltet haben. Zum Beispi
Stämme eine Lipolyse von Talg bewirkt, von diesen aber veru
17 Stämme eine Lipolyse des Erdnußöls usf.

Unter den 42 Stämmen, die sämtlich Tributyrat lipolysierten
auf irgendeinem der obengenannten Fettsubstrate herbeiführ
sich 19 Mikrokokken, 4 Gram-positive Stäbchen und 8 Gr
Stäbchen. Stämme mit lipolytischer Wirkung auf sowohl Spe
intramuskulares Rinderfett kamen unter diesen Stämmen wi

Mikrokokken	11 Stämme
Gram-positive Stäbchen	4 Stämme
Gram-negative Stäbchen	1 Stamm

Von diesen 16 Stämmen wurden für fortgesetzte Studien 7 S
gewählt, die auf den besagten Nährböden die stärkste Lipoly
Fünf von ihnen waren Mikrokokken und die übrigen zwei w
positive Stäbchen.

4. Der Einfluß von Inkubationstemperatur, Salzkonzentratio Wert auf die Lipaseaktivität

Von den in der Rohwurst während des Reifungsprozesses vorl
Bakterien sind nur diejenigen Stämme imstande, Fett abzubau
lipolytische Wirkung unter den dabei herrschenden Verhält
falten, d. h. bei pH 5,9—4,9, bei der NaCl-Konzentration 4—5
einer Temperatur von +18—20 °C. Um zu ermitteln, ob die
gesetzten Studien ausgewählten sieben Stämme Voraussetzur