

peroxyd-Moleküls mitwirkt. Es wurde ferner gefunden<sup>15</sup>, daß Antioxydantien in niedriger Konzentration die Lipoxydase-Oxydation nicht hemmen, wie man es bei einer typischen Autoxydation-Ketten-Reaktion erwarten sollte, obwohl bei hohen Konzentrationen der Antioxydantien die Reaktion durch eine direkte Hemmung der Lipoxydase-Aktivität verzögert wird.

Ein weiterer Beweis, daß Lipoxydase bei der Bildung eines jeden Hydroperoxyd-Moleküls beteiligt ist, wurde von *O. S. Privett* und Mitarbb.<sup>7</sup> geliefert, die die bei einer Lipoxydase-Oxydation von Linoleat mit roher Lipoxydase erzeugten Peroxyde isolierten. Wie bereits erwähnt, waren diese Peroxyde, im Gegensatz zu den bei der Autoxydation gebildeten, etwas optisch aktiv. Wenn die Peroxyde mit Zinnchlorür zu Hydroxy-Derivaten reduziert wurden, nahm die optische Aktivität stark zu und näherte sich dem doppelten Wert der von natürlicher Rizinolsäure. Dies traf sogar zu bei niedrigen Enzym-Konzentrationen und unter milden Oxydationsbedingungen, die im Fall einer Kettenreaktion verhältnismäßig lange Reaktionsketten begünstigen würden.

Bei dem von *J. L. Bolland*<sup>12,13</sup> vorgeschlagenen Reaktionsschema werden die Reaktionsketten durch Reaktionen zwischen zwei freien Radikalen beendet, führen also zur Bildung polymerer Produkte. *O. S. Privett*<sup>7</sup> beobachtete, daß die Menge der Polymeren bei hohen Lipoxydase-Konzentrationen zunahm, eine Tatsache, die in Übereinstimmung mit dem Autoxydation-Kettenreaktions-Mechanismus der Lipoxydase-Oxydation steht. Wenn die Polymeren jedoch durch Destillation von den Monomeren getrennt werden, stellt es sich heraus, daß diese ebenfalls optisch aktiv waren, so daß wahrscheinlich die Lipoxydase bei der Bildung der Polymeren beteiligt ist.

<sup>15</sup> *A. L. Tappel, W. O. Lundberg u. P. D. Boyer, Arch. Biochem. Biophysics* **42**, 293 [1953].

Obwohl diese Beobachtungen darauf hinweisen, daß der Kettenreaktions-Mechanismus der Autoxydation im Fall der Lipoxydase-Oxydation nicht anwendbar ist, schließen sie doch nicht die Möglichkeit eines anderen Typs eines Ketten-Mechanismus aus, wie man diesen für andere Enzyme angenommen hat. Tatsächlich sind derartige Ketten-Mechanismen sehr wahrscheinlich. Unsere derzeitige Ansicht besagt jedoch, daß in einem solchen Mechanismus das Enzym bei der Bildung eines jeden Hydroperoxyd-Moleküls bzw. polymerer Produkte beteiligt ist. Die Beobachtung, daß bei niedrigeren Sauerstoff- und höheren Lipoxydase-Konzentrationen mehr Polymere gebildet werden, steht also völlig in Übereinstimmung mit dieser Ansicht.

#### Zusammenfassung

Bei dem gegenwärtigen Stand unserer Kenntnis der Lipoxydase-Oxydation erscheint es wahrscheinlich, daß die normalen Hauptprodukte der Lipoxydase-katalysierten Oxydation polyungesättigter Fettsäuren optisch aktive *cis-trans* konjugierte Dien-Hydroperoxyde sind. Es besteht eine geringe Möglichkeit, daß mit gereinigter Lipoxydase *trans-trans* konjugierte Dien-Hydroperoxyde gebildet werden, aber wenn das der Fall ist, muß man notwendigerweise annehmen, daß rohe Lipoxydase-Extrakte oder verdorbene Präparate gereinigter Lipoxydase Bestandteile enthalten, die die Bildung der thermodynamisch weniger stabilen *cis-trans-* an Stelle der *trans-trans-* Formen begünstigen.

Obwohl bei der Lipoxydase-Oxydation polyungesättigter Fettsäuren eine Art Ketten-Mechanismus beteiligt sein kann, muß sich ein derartiger Ketten-Mechanismus von dem der Autoxydation unterscheiden, weil 1. die bei der Lipoxydase-Oxydation gebildeten Hydroperoxyde und Polymeren optisch aktiv sind, 2. die Kinetik der Lipoxydase-Oxydation nicht der der Autoxydation entspricht, sondern vielmehr der Kinetik verschiedener anderer Enzym-Systeme ähnelt und 3. die Wirkung von Antioxydantien auf Lipoxydase-Reaktionen anders ist, als man bei einem vorherrschenden Ketten-Mechanismus der Autoxydation erwarten sollte.

## Über den mikrobiologischen Verderb von Margarine

Von *N. Maltshewsky*

Aus der Bundesforschungsanstalt für Lebensmittelrisikoforschung, Karlsruhe (Direktor: Prof. Dr. J. Kuprianoff)

Übersicht und Diskussion der bisher bekanntgewordenen Untersuchungen.

### Microbiological Deterioration of Margarine

Review and discussion of previous investigations.

Außer dem Verderb durch chemische und physikalische Faktoren wird nach dem gegenwärtigen Stand unseres Wissens der Verderb von Margarine hauptsächlich durch mikrobiologische Prozesse verursacht. Um sich über die Mikroben-Entwicklung in Margarine ein besseres Bild machen zu können, erscheint es zweckmäßig, zunächst einen Blick auf die schon früher gemachten mikrobiologischen Untersuchungen von Butter zu werfen. Anschließend sollen die bisher über Margarine bekannt gewordenen Untersuchungen zusammengestellt und die Ergebnisse diskutiert werden. In einer weiteren Arbeit berichten wir dann über eigene Versuche zu diesem Thema.

### Mikrobiologische Untersuchungen an Butter

Als einer der ersten versuchte *R. Reimann*<sup>1</sup>, die Rolle der Mikroorganismen bei dem Ranzigwerden der Butter festzustellen; er kam zu der Auffassung, daß dieser Prozeß hydroly-

### Deterioro microbiológico de la margarina

Revista y discusión de investigaciones previas.

### L'altération microbiologique de la margarine

Revue rapide, et discussion sur les recherches connues jusqu'à maintenant.

tisch vor sich geht und einen größeren Anteil am Verderb hat als Sonnenlicht. In Fortsetzung dieser Arbeiten fand *O. Jensen*<sup>2</sup>, daß die Mikroben bei Butter eine viel größere Rolle spielen als bei dem Verderb von reinen Fetten. Je nach Art der Butter wurde auch ein unterschiedliches mikrobielles Bild beobachtet. So wurde bei Aufbewahrung von Süßrahmbutter bei Zimmertemperatur in ihrem Innern während der ersten Tage eine Vermehrung verschiedener Milchsäure-Bakterien und Hefen beobachtet, dagegen nahm die Zahl von proteolytischen Mikroben und *Oidium lactis* ab. Auf der Oberfläche dieser Buttersorte hatte dagegen die Gesamtzahl aller proteolytischen Bakterien und anderer Mikroorganismen (*Oidium lactis*, *Cladosporium* und Hefe) in den ersten 3 Tagen stark

<sup>1</sup> Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. II **6**, 131, 166 [1900].

<sup>2</sup> Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. II **8**, 11, 42, 74, 107, 140, 171, 211, 248, 278, 309, 342, 367, 406 [1902].

zugenommen. In Sauerrahmbutter wurden große Mengen verschiedener Arten der milchsäurebildenden Bakterien gefunden. Dadurch, daß in manchen Fällen in der Butter verschiedene Gruppen von Mikroorganismen vorkommen und auf die Butter eine gemeinsame Wirkung ausüben können (z. B. Symbiose von *Oidium lactis* und *Bact. fluorescens*), wird sie gewöhnlich schneller zersetzt. Da die fettverderbenden Mikroorganismen aerob sind, schreitet das Ranzigwerden der Butter gewöhnlich von außen nach innen fort. *O. Jensen* entdeckte dabei eine Entwicklung von flüchtigen Fettsäuren und deren Estern. Als Konservierungsmittel gegen den Butterverderb wurden Kochsalz und Milchzucker empfohlen. Als Herkunft der für die Butter schädlichen Mikroben wurden Wasser und Luft bezeichnet. Durch Ansäuern des Rahms mit reinen Kulturen von Milchsäure-Bakterien konnte die Entwicklung der in der Butter vorkommenden Fremdkeime verhindert werden. Nach *O. Jensen* spielt die Luft selbst nur dann eine direkte Rolle bei dem Verderb von Butter, wenn diese dem Sonnenlicht oder einer höheren Temperatur ausgesetzt ist; dabei wird sie oxydiert, bekommt einen unangenehmen Geschmack und Geruch, wird aber nicht ranzig.

Da die Fette Ester von Glycerin und Fettsäuren darstellen und ziemlich resistent gegen mikrobiellen Angriff sind, werden sie sehr langsam von den Mikroorganismen gespalten. Mikrobiologische Fettspaltung mit Hilfe von Lipase<sup>3,4</sup> geht hydrolytisch nach folgendem Schema vor sich:



Dabei entstehen Fettsäuren und Glycerin; letzteres kann weiter von anderen Mikroorganismen als Energiequelle verwendet werden. Dagegen werden die Fettsäuren der Butter nicht so leicht verbraucht und reichern sich deshalb an, was das Ranzigwerden der Butter zur Folge hat. Nur wenige Mikroorganismen verwenden Fettsäuren als Energiequelle, dabei werden Methylketone gebildet, die einen charakteristischen, unangenehmen Geruch und Geschmack verursachen. Dieser Prozeß kann nur in Gegenwart von Sauerstoff verlaufen. Während die hydrolytische Fettspaltung unter aeroben Bedingungen vor sich geht, können einige Mikroben den Mangel an freiem Sauerstoff bei anaeroben Bedingungen durch Abspaltung von gebundenem Sauerstoff ausgleichen (Denitrifikation, Desulfurifikation). Die in Mikroorganismenzellen vorkommenden Lipasen sind wasserlöslich und bei neutraler Reaktion wirksam, im Gegensatz zu den Lipasen in Pflanzenzellen, die wasserunlöslich sind und um pH 5 spalten.

Zur Feststellung, welche Mikroorganismen die Lipase enthalten und dadurch für die Butter gefährlich sein können, stellte *O. Laxa*<sup>5</sup> Versuchsreihen mit verschiedenen Mikroorganismen-Stämmen an. Als starke Fettspalter nannte er *Oidium lactis*, *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*, *Saccharomyceten* und *Bact. fluorescens*; die milchsäurebildenden Bakterien, die des öfteren zur Verbesserung der Butterqualität verwendet werden, wurden als nicht fettspaltend bezeichnet.

Neben der primären mikrobiellen Infektion, die unmittelbar während der Herstellung der Butter auftritt und bei richtiger Behandlung z. T. beseitigt wird, können das Verpackungsmaterial und die Lagerungsart in erhöhtem Maß die Quelle der sekundären Infektion von Butter bilden. In dieser Hinsicht untersuchte *K. Grippenberg*<sup>6</sup> die Entwicklung von Schimmel bei verschiedenen Lagerungsbedingungen der Butter. Dabei stellte er einen Verderb der Butter durch Entstehung grüner und schwarzer Flecken fest. Erreger dieser Erscheinungen waren im ersten Fall *Penicillium sp.* und im zweiten *Trichosporium*. Außer diesen Schimmelpilzen verursachte auch *Mucor* einen Verderb der Butter. Zur Bekämpfung dieser (als eine Luftinfektion bezeichneten) Mikroorganismen empfahl *Grippenberg*, ein mit Kochsalz durchtränktes Verpackungspapier

zu verwenden. So kann das Wachstum von *Mucor* schon bei 5% NaCl-Gehalt verhindert werden. *Penicillium* und *Trichosporium* entwickeln sich erst nach 17 Tagen bei Verwendung von 20% NaCl und ergeben bei einer Konzentration von 25% NaCl überhaupt kein Wachstum.

Daß die Entwicklung der Schimmelpilze in Butter von den Lagerbedingungen und dem Verpackungsmaterial abhängig ist, zeigten auch *A. H. Pedersen* und Mitarbb.<sup>7</sup> Feuchte Butter schimmelt leichter an als trockene, ebenso wie ungesalzene Süßrahmbutter leichter schimmelt als eine 1% Salz enthaltende. Die Lagerräume für Butter sollen trocken sein (rel. Feuchtigkeit nicht höher als 75%).

Ein in Südafrika öfters vorkommender Befall der Butter durch Schimmelpilze unter Bildung dunkler Flecken wurde von *H. Penning*<sup>8</sup> beschrieben. Dieser Schaden konnte während der Lagerung nur bekämpft werden durch: 1. Verwendung von sorgfältig vorbereitetem Verpackungspapier (Behandlung mit Formaldehyd-Dämpfen), 2. Trockenlagerung und gute Belüftung des Lagerraums und der Wände und 3. Aufrechterhaltung einer Lagertemperatur von -9°C. Wenn schon Butter, wie es *O. Jensen* erwähnte, wegen ihres bedeutenden Gehalts an Wasser mit darin gelösten Nährstoffen einen vorzüglichen Nährboden für die Mikroorganismen darstellt, so muß Margarine wegen ihrer Zusammensetzung desto mehr als ein noch günstigeres Substrat für deren Entwicklung angesehen werden.

#### Charakteristik des durch Mikroorganismen hervorgerufenen Verderbs von Margarine

Die verschiedenen Verderberscheinungen in Margarine wurden von einigen Forschern in folgender Weise beschrieben:

Bei Untersuchungen aus pflanzlichen Ölen hergestellter Margarine fand *H. C. Jacobsen*<sup>9</sup> eine Parfüm-Ranzigkeit und zeigte durch seine zahlreichen Versuche mit verschiedenen Mikroorganismen, daß der unangenehme Geruch in ranzigem Kokosnußöl tatsächlich durch Mikroorganismen verursacht wurde. Die Entwicklung derartiger Mikroorganismen im Öl wurde schon durch eine kleine Menge Wasser (0.2 bis 0.5%) begünstigt. Als Erreger des Ranzigwerdens der pflanzlichen Margarine bezeichnete *Jacobsen*: *Penicillium*-, *Aspergillum*-, *Cladosporium*-, *Harmodendron*-, *Phoma*-, *Mucor spec.* und *Cladosporium butyri*. Seine Versuche ergaben auch, daß — obwohl *Oidium lactis* ein Fettspalter ist — dieser Pilz doch kein Ranzigwerden der Margarine hervorrufen konnte. *Penicillium glaucum* und *Cladosporium*, die in der pflanzlichen Margarine am häufigsten gefunden werden, verursachten das stärkste Ranzigwerden. Eine steril hergestellte Margarine wurde 5 Tage nach Beimpfung mit *Cladosporium butyri* und *Penicillium glaucum* ranzig, und nach 7 Wochen erhöhte sich der Fettsäure-Gehalt bis auf ca. 10%. In einem stark getrockneten Kokosnußöl ergaben diese Schimmelpilze keine Veränderung, dagegen riefen sie schon bei Spuren von Wasser im Öl ein Ranzigwerden hervor.

Auch *W. N. Stokoe*<sup>10</sup> beschrieb die Parfüm-Ranzigkeit als einen typischen, durch Mikroorganismen hervorgerufenen Verderb, der nicht nur in einer älteren, sondern auch in einer vor wenigen Tagen hergestellten Margarine vorkommen kann. Bei dem Verderb durch Parfüm-Ranzigkeit kann das Produkt ein gutes äußeres Aussehen behalten. Dieser Prozeß ist nach *Stokoe* als Hydrolyse mit anschließender Oxydation aufzufassen. Dabei ergeben sich ein unangenehmer Geruch und Geschmack und eine saure Reaktion. Da aber die biochemische Wirkung von verschiedenen Mikroorganismen sehr unterschiedlich sein kann, ist die Acidität allein noch kein Beweis des Ranzigwerdens; einige Fette haben einen niedrigen

<sup>3</sup> *A. Rippel-Baldes*, Grundriß der Mikrobiologie, II. Aufl., Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1952, S. 185.

<sup>4</sup> *R. E. Buchanan*, Bacteriology, 5. Aufl., New York 1951, S. 276.

<sup>5</sup> Arch. Hyg. Bakteriol. 41, 119 [1902].

<sup>6</sup> Milchwirtsch. Zbl. 28, 626, 644, 662 [1899].

<sup>7</sup> *G. H. Pedersen*, *A. N. Fisker*, *S. K. Pedersen* u. *T. Thomsen*, Beretn. Forsøgs-lab., Kopenhagen 74, 44 [1952]; ref. Food sci. Abstr. 26, 637 [1954].

<sup>8</sup> Farming South Africa 28, 330 [1953]; ref. Food sci. Abstr. 26, 638 [1954].

<sup>9</sup> Folia microbiol. 5, 94 [1918].

<sup>10</sup> J. Soc. chem. Ind. (London) 40, 75 T [1921].

Säuregehalt und sind stark ranzig, andere dagegen haben einen hohen Gehalt an freien Fettsäuren, sind süß und nicht ranzig.

Die Reihe der für den Verderb von Margarine verantwortlichen Mikroorganismen wurde durch die Untersuchungen von *Stokoe* erweitert. Außer den früher erwähnten Schimmelpilz-Arten, wilden Hefen und *Torula* wurden noch *Bact. fluorescens* sp., *Bact. proteus* sp., *Bact. coli*, *Bact. putrificus*, *Micrococcus luteus* und *Sarcina lutea* gefunden. Zur Feststellung der Stärke der Säurebildung während der Fettspaltung wurden diese Mikroorganismen in Reinkulturen in die aus Kokosnußöl hergestellte Margarine eingepflegt. Nach 1 bis 2 Wochen wurde eine Erhöhung des Säuregehalts von 0.1 bis 0.8% beobachtet. Von *Stokoe* wurden über einen Zeitraum von 2 Jahren sich erstreckende Untersuchungen der für die Margarine industriell verwendbaren Öle und Fette durchgeführt. Dabei beobachtete auch er ein besonders starkes Ranzigwerden mit schlechtem Geruch (Entwicklung von Ketonen) der mit Kokosnuß- und Palmkernöl hergestellten Margarine. Als Erreger dieses Verderbs erschienen hauptsächlich *Penicillium* und *Aspergillus*-Arten.

Als Talg-Ranzigkeit bezeichnet *Stokoe* einen Verderb von Margarine, der nicht durch Mikroorganismen hervorgerufen wird, sondern als Resultat einer Oxydation durch Licht und Luft anzusehen ist.

*A. Schroeder*<sup>11</sup> beschreibt zwei Arten des Verderbs von Margarine: Ölsäure-Ranzigkeit und Parfüm-Ranzigkeit. Die erste ist auf Zerfall der Fette unter Freiwerden von ungesättigten Fettsäuren zurückzuführen und wird hauptsächlich durch Mikroorganismen verursacht, kann aber auch durch physikalische Faktoren (Licht, Luft, Feuchtigkeit und Wärme) hervorgerufen werden. Ein unangenehmer Geruch und Geschmack bei Ölsäure-Ranzigkeit entwickelten sich infolge einer weiteren Oxydation der gebildeten ungesättigten Fettsäuren zu Aldehyden und Ketonen. Auch wird nach *Schroeder* die Ölsäure-Ranzigkeit von einer Entfärbungs-Ranzigkeit begleitet, wobei die durch mikrobielle Prozesse gebildeten Peroxyde eine Bleichung bzw. eine Verfärbung der Fette hervorrufen. In den harten Fetten mit hohem Schmelzpunkt — wie Kokosfett, Palmkernfett und tierischen Fetten, bei denen der Verderb als Talg-Ranzigkeit bezeichnet wird — kommt die Ölsäure-Ranzigkeit nicht vor. Parfüm-Ranzigkeit ist nach *Schroeder* mit der Verseifung identisch. Dieser Prozeß, der durch Mikroorganismen verursacht wird, wurde als „bio-chemischer Verderb“ bezeichnet und konnte öfters bei mit Kokos- oder Palmkernfett hergestellter Margarine beobachtet werden. Die Gefahr der Verseifung von Margarine ist um so größer, je mehr Kokos- und Palmkernfett zur Herstellung der Margarine verwendet werden.

Ähnlich der Entfärbungs-Ranzigkeit wurde ein Verderb durch stellenweises Auftreten von farbigen Flecken auf und in Margarine beobachtet, was als Resultat einer Entwicklung von Mikroorganismen erklärt wurde. *A. Zoffmann*<sup>12</sup> beschreibt blutrote und orangefarbene Flecken in Margarine, die durch *Bact. prodigiosum* hervorgerufen wurden. *Oidium lactis* verursachte nach seinen Beobachtungen auf der Oberfläche und bis zu einer Tiefe von 2 cm ein marmoriertes Aussehen der Margarine. Doch meinte *Zoffmann*, daß die Schimmelpilze aus der Gattung *Penicillium* und *Aspergillus*, die gewöhnlich blaugrüne Flecken in den Hohlräumen und auf der Oberfläche der Margarine bilden können, die gefährlichsten Verderber in dieser Hinsicht sind.

Ein großer Schaden entstand einer Margarine-Fabrik vor etwa 25 Jahren, als auf der Oberfläche und im Innern der Margarine grünlich-schwarze Flecken in großen Mengen auftraten. Bei Untersuchung dieser Erscheinungen entdeckte *O. Laxa*<sup>13</sup> einen unbekanntenen Schimmelpilz-Stamm, der als *Mar-*

*garinomyces Bubaki* bezeichnet wurde. In einigen Stadien der Entwicklung erinnerte dieser Pilz an *Cladosporium*, aber in der Form seiner Konidien ähnelte er dem *Fusarium*. Durch Erhitzung auf 100° C während 1 bis 5 Min. wurde der Pilz gänzlich getötet. Als kritische Temperatur wurde 60° bis 70° C bezeichnet. In 20 Min. war dieser Pilz bei 60° C in seiner Entwicklung noch nicht gestört; dagegen verhinderte eine Erhitzung auf 70° C während derselben Zeit sein Wachstum völlig. Als Herkunft dieses Pilzes wurde das Wasser eines Brunnens bezeichnet, doch war er ziemlich verbreitet und wurde auch an den Wänden einer Molkerei gefunden. Zu seiner Bekämpfung und als Konservierungsmittel für die Margarine wurde Natriumfluorid verwendet: 0.05% NaF schränkte die Entwicklung dieses Pilzes deutlich ein, und eine Konzentration von 0.5% konnte das Wachstum gänzlich verhindern. Dasselbe Resultat ergab Borsäure in einer Konzentration von 0.1%.

Um die Ursache des als Seifigkeit bezeichneten bekannten Geschmacksfehlers in Margarine zu erklären, wurden von *K. Richter* und *v. Lilienfeld*<sup>14</sup> einige interessante Versuchsreihen unter Verwendung verschiedener, aus Margarine isolierter Mikroorganismen durchgeführt. Zuerst wurde die Seifigkeit mit Hilfe von Reinkulturen von Kahlhefen und deren Symbiose mit alkalibildenden Bakterien in einer mit Kokosfett hergestellten, margarine-ähnlichen Emulsion erreicht. In weiteren Versuchsreihen verwendeten *Richter* und *Lilienfeld* gewöhnliche Hefen (*Oidium*- und *Monila*-Arten) und deren Mischkulturen mit aromabildenden Milchsäure-Bakterien. Die Seifigkeit trat bei einigen Kulturen schon nach 24 Std. bei 20° C, bei anderen erst nach 3 bis 8 oder noch mehr Tagen auf. Auch nach Meinung von *A. J. C. Andersen*<sup>15</sup> wird der scharfe „seifige“ Geschmack in Margarine, begleitet von hohem Säuregehalt, öfters durch fettspaltende Hefe und Bakterien hervorgerufen.

#### Über das Vorkommen der Mikroorganismen in Margarine

Als einer der ersten führte *H. Jacobsen*<sup>9</sup> ausführliche mikrobiologische Untersuchungen der pflanzlichen Margarine durch. Er stellte fest, daß die für Margarine verwendeten pflanzlichen Öle an Mikroorganismen reich sind und deshalb bei entsprechenden Bedingungen leicht verderben. In 1 g einer pflanzlichen Margarine fand *Jacobsen* von 100 000 bis 18 000 000 Keime, die hauptsächlich *Torula*, Micrococen und Schimmelpilzen angehörten.

Nach *Stokoe*<sup>10</sup> kann die zur Ranzigkeit führende Infektion von Margarine verursacht werden: 1. durch äußere Betriebsbedingungen, wie Luft, Apparaturen usw., 2. durch die für die Margarine-Herstellung verwendeten Rohstoffe und 3. durch das Verpackungsmaterial. Im 1. und 3. Fall ist durch sorgfältiges Arbeiten, Sterilisieren, Desinfizieren usw., die Infektion leicht zu vermeiden, dagegen bietet der Fall 2 sehr ernste und schwierige Probleme. Deshalb wird auch eine strenge mikrobiologische Untersuchung der für die Margarine verwendeten Öle und Fette empfohlen. In eingehenden Untersuchungen zeigte *Stokoe*, daß nur 5% von mehreren hundert Proben steril waren. In 10 bis 20% der Proben wurden in 1 ml nicht mehr als 6 Sporen gefunden. Der größte Teil aller anderen Proben wimmelte dagegen von Schimmelpilz-Sporen und anderen Mikroorganismen. Die flüssig bleibenden Öle waren in dieser Hinsicht die schlechtesten. Dabei waren die Schimmelpilz-Sporen in größeren Mengen vorhanden als die Bakterien-Keime. Die harten Fette erwiesen sich als steril. Kokosnuß- und Palmkernöl waren, ausgenommen einige abweichende Proben, gewöhnlich ziemlich steril. Die tierischen Fette konnten als fast ganz steril bezeichnet werden; nur in einigen Fällen wurden bakterielle Sporen, und zwar in geringerem Ausmaß als Pilzsporen, gefunden. Bei solchen speziellen Untersuchungen von Fetten und Ölen wurden folgende Schimmelpilze festgestellt: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor* und *Botrytis cinerea*. In den Ölen können die Pilzsporen lange Zeit er-

<sup>11</sup> Margarine-Ind. 25, 13 [1932].

<sup>12</sup> Chem. Umschau Gebiete Fette, Öle, Wachse, Harze 18, 4 [1911].

<sup>13</sup> Zbl. Bakteriöl. Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. II 81, 392 [1930].

<sup>14</sup> Margarine-Ind. 24, 276 [1931].

<sup>15</sup> Margarine, Pergamon Press Ltd, London 1954.

halten bleiben, zum Auswachsen kommen sie jedoch nur bei entsprechend günstigen Bedingungen. Zur völligen Vernichtung dieser Keime werden die Öle auf 150–170° C in trockener Luft und unter vermindertem Druck erhitzt.

Außer den Ölen kann auch die Emulsion eine sehr wichtige Rolle in der Frage des Keimgehalts und des Verderbs der Margarine spielen. Einerseits wird sie als Infektionsquelle und andererseits als ein vorzügliches Milieu für die Entwicklung der Mikroorganismen angesehen. Hierauf weisen z. B. die Beobachtungen von V. Mareš<sup>16</sup>, nach denen das Wachstum der Mikroorganismen in Margarine in den Anfangsstadien nicht direkt in der Fettphase, sondern in der wäßrigen Phase vor sich gehen kann. Obwohl einige natürliche Öle und Fette Mikroorganismen enthalten können, sind die reinen, raffinierten Fette doch kein geeignetes Substrat für ihre Entwicklung. Das wurde von Mareš durch das Einimpfen von Sporen eines aus verdorbener Margarine isolierten starken *Penicillium expansum*-Stammes in Tropfen von sterilem, raffiniertem Erdnuß- und Kokosnußöl nachgewiesen<sup>17</sup>. Bei dem Versuch wurde kein Auswachsen beobachtet; erst nach Hinzutritt von Feuchtigkeit und Entstehung eines Nährbodens mit aufgelösten mineralischen und organischen Stoffen in den Fetttropfen setzte die Entwicklung der Mikroorganismen ein. Mareš folgert daraus, daß die Margarine-Emulsion eine sehr wichtige Rolle in dem Verderb von Margarine spielt. Unter bestimmten Bedingungen kann die Emulsion zu einem sehr geeigneten Nährsubstrat für die Entwicklung von Mikroorganismen werden, wobei die ablaufenden biochemischen Prozesse später zum Ranzigwerden der Margarine führen. Dabei kann ein solcher Verderb der Margarine viel schneller vor sich gehen als ein Verderben infolge physikalischer Einflüsse.

Daraus ergibt sich, daß die Margarine durch ihre Bestandteile ziemlich stark infiziert sein kann. Nach V. D. Foltz und T. H. Lord<sup>18</sup> ist die Infektion von Margarine mengen- und artmäßig der anderer Lebensmittel sehr ähnlich. Aus 50 willkürlich entnommenen Proben von Gebrauchsmargarine isolierten sie 40 verschiedene Bakterien-Arten, unter denen sporenbildende Stäbchen und Micrococccen am häufigsten vertreten waren. Nach den biochemischen Eigenschaften gehörten 55 % der isolierten Stämme den caseolytischen und 3.3 % den lipolytischen Kulturen an. Unter den Schimmelpilzen, die — wie auch die Hefen — in geringerem Maß als die Bakterien vertreten waren, befanden sich hauptsächlich *Penicillium*- und *Aspergillus*-Gattungen. Foltz und Lord erinnern in ihrer Arbeit auch an die Möglichkeit einer Infektion der Margarine aus der Luft und durch fehlerhafte, unhygienische Betriebsbedingungen.

#### Über die Maßnahmen zur Verhinderung des mikrobiellen Verderbs von Margarine

Zur Gewinnung einer Margarine guter Qualität werden von Mareš<sup>16</sup> folgende Maßnahmen bei der Herstellung von Margarine empfohlen: 1. Vermeidung der sekundären Infektion und 2. Erzeugung einer Margarine-Emulsion, die die Entwicklung von der Margarine schädigenden Mikroben nicht begünstigt.

Um den Einfluß der Emulsion auf das Verschimmeln von Margarine zu prüfen, stellte Mareš Versuche mit Impfungen einiger — aus älteren Margarine-Würfeln isolierter — Schimmelpilz-Stämme\* an. Reinkulturen dieser Schimmelpilze wurden Margarine-Qualitäten eingepflegt, die aus verschiedenartigen Fettemulsionen von wechselnder Beständig-

keit hergestellt waren. In den Würfeln mit stabiler, richtig gekirnter Margarine-Emulsion (Wasser in Fett) wuchsen die Schimmelpilze auch nach 3 Monaten nicht aus. Bei der Margarine, die mit unbeständiger, schlecht gekirnter Emulsion hergestellt und bei der die emulgierte Phase frei wurde, konnte man ein Ranzigwerden durch die eingepflegten Schimmelpilz-Kulturen schon nach 4 bis 6 Wochen beobachten.

Die Verwendung von Milch für Margarine wird von Mareš sehr empfohlen, dagegen sind Fettansätze mit aus niedermolekularen Fettsäuren bestehenden Fetten möglichst zu vermeiden. Somit ist ersichtlich, daß unter normalen Lagerungsbedingungen die Margarine gut erhalten bleibt, wenn sie eine tadellose Emulsion darstellt.

Ebenso wie bei Butter kann auch bei Margarine eine Verwendung von biologischen Maßnahmen bzw. bestimmten Mikroben-Kulturen die Qualität und Haltbarkeit erhöhen. Zu diesem Zweck benutzte Stokoe<sup>10</sup> Mischkulturen, die eine Symbiose von säureresistenten (nicht fett- und eiweißspaltenden) Hefen mit Milchsäure-Bakterien darstellten. Eine mit diesen Kulturen behandelte Margarine konnte einen süßen, frischen Geschmack während einiger Wochen behalten.

Zur Verhinderung des Verderbs von Margarine wurde eine direkte Hemmung der Entwicklung von Mikroorganismen-Keimen auch durch Verwendung chemischer Stoffe erprobt. Zur Prüfung der Haltbarkeit von Margarine stellten K. Fischer und O. Gruenert<sup>19</sup> Versuchsreihen unter Verwendung von Benzoesäure, Hydrin (Benzoesäure und einige andere Stoffe enthaltendes Konservierungsmittel), Salicyl- und Borsäure in Mengen von 0.2 bis 1 g/kg Margarine an. Nach einer Lagerung bei 6° C während 1 bis 5 Monaten wurden chemische Untersuchungen der Proben durchgeführt und festgestellt, daß bei den niederen Konzentrationen die Schimmelpilze schon nach 1 Monat und in den höheren Konzentrationen erst nach 2 Monaten sich entwickeln konnten. Dagegen verhinderte ein Zusatz von 3 % NaCl die Entwicklung von Schimmel und ermöglichte die Erhaltung der Margarine in einem guten Zustand.

Jacobsen<sup>9</sup> ermittelte die Wirkung von einigen Konservierungsstoffen auf die Entwicklung bestimmter Mikroorganismen in Margarine und verwendete: Natriumchlorid, Natriumformiat, Kaliumnitrat, Natriumsulfat, Natrium- und Magnesiumlactat, Milchsäure, Benzoesäure, Natriumbenzoat, Borsäure und Borax. Als Testorganismen dienten die aus verdorbener Margarine isolierten *Penicillium glaucum*, *Cladosporium* und *Oidium lactis*. Dabei wirkte sich unter den Salzen das Kochsalz als Konservierungsmittel am stärksten aus. Milchsäure zusammen mit NaCl hemmte die Entwicklung der Schimmelpilze nicht stark. Benzoesäure verhinderte das Wachstum der Schimmelpilze in einer 0.1%igen Konzentration; in Anwesenheit von 15 % Salz genügte ein Gehalt von 0.05 % Benzoesäure. Natriumbenzoat wirkte schwächer; 2 % dieses Mittels waren noch nicht genügend, um das Wachstum der *Penicillium* und *Cladosporium* zu stören. Borsäure wirkte hemmend auf die Entwicklung von *Penicillium* und *Oidium*, nicht aber auf die von *Cladosporium*, der sich in Lösungen mit 10 % Salz und 2.5 % Borsäure entwickeln konnte. Borax ist mit seiner alkalischen Reaktion ein besseres Konservierungsmittel als Borsäure; in einer Lösung von 10 % NaCl + 0.1 % Borax wuchs auch *Cladosporium* nicht aus.

Bei Zusatz zu Margarine werden die erwähnten Konservierungsmittel in den Wassertropfen gelöst. Einige, z. B. Benzoesäure, können mit den Albuminen der für die Margarine-Herstellung verwendeten Milch reagieren. Wenn die Tröpfchen bei einer ordentlichen Durchmischung genügend klein und gut verteilt sowie mit der nötigen Menge an Salz und Konservierungsstoffen versehen sind, wird das Wachstum der gefährlichen Schimmelpilze unmöglich gemacht. Daraus ist zu ersehen, daß die Art der Verteilung der

<sup>19</sup> Z. Unters. Nahrungs- u. Genußmittel **22**, 553 [1911].

<sup>16</sup> Chem. Obzor **10**, 274 [1931].

<sup>17</sup> V. Mareš, Fettchem. Umschau **41**, 115 [1934].

<sup>18</sup> Food Res. **16**, 216 [1951].

\* *Penicillium expansum*, *P. commune* Th., *Cladosporium herb.* Pers., *Cl. herb. var. vincetoxici* Alleh., *Oospora lactis* Fres., *Oidium lactis* Fres., *Aspergillus glauc.* Link und Schimmelpilz Nr. 23.

wäßrigen Phase in der Fettphase sowohl für die Entwicklung und biochemische Tätigkeit von Mikroorganismen in der Margarine als auch bei der Verhinderung dieser Entwicklung eine sehr große Rolle spielt. Aus dem Versuch von *Jacobsen* geht hervor, daß bei einem Durchschnitt von 14% Wasser in der Margarine 2% Salz + 0.075% Benzoesäure oder 0.2% Natriumbenzoat oder eine Mischung von 0.05% Benzoesäure mit 0.05% Natriumbenzoat genügen, um das Auswachsen der Schimmelpilze zu verhindern. 0.4% Borax und 0.2% Borsäure in konz. Lösung (zusammen mit 2% NaCl) genügen zur Frischhaltung einer pflanzlichen Margarine während mindestens 5 Wochen.

Neben der Bekämpfung der primären Mikroben-Infektion, die in der Margarine unmittelbar durch die verwendeten Bestandteile verursacht werden kann, ist eine Verhütung der sekundären Infektion durch das Verpackungsmaterial und die Lagerungsbedingungen für die Frischhaltung der Margarine nicht weniger dringend. Vor dieser Gefahr der sekundären Infektion warnte *Stokoe*<sup>10</sup>, der verschiedene Sorten von Verpackungspapier mikrobiologisch untersucht hatte und sie in keinem Fall als steril bezeichnen konnte. Meistens wurden Sporen von Schimmelpilzen und verschiedene Bakterien gefunden. Bei Verwendung eines so infizierten Papiers und unter günstigen Bedingungen für Feuchtigkeit und andere Faktoren können sich solche Mikroorganismen in der Margarine entwickeln und dabei unerwünschte Veränderungen hervorrufen. Zur Bekämpfung dieses Verderbs von Margarine wurden einige Verhütungsmethoden ausgearbeitet. *Grippenberg*<sup>6</sup> empfahl, das Verpackungsmaterial vor dem Gebrauch in eine starke Salzlake zu legen (25%) oder mit Dampf zu behandeln. *Zoffmann*<sup>12</sup> verwendete eine Lösung von 1 Teil Salz + 3 Teilen Wasser, in die das Verpackungspapier 10 Std. lang eingetaucht wurde. Die Lagerungsbedingungen sollen nach *Grippenberg* kühl und trocken sein, um die Entwicklung der Mikroorganismen zu vermeiden; als Temperatur wird der Bereich zwischen +4° bis -5° C empfohlen. *Penning*<sup>8</sup> empfiehlt -9° C für die Lagerung der Butter.

Kürzlich wurde in einer russischen Arbeit über ein neues biologisches Mittel zur Verhinderung des Ranzigwerdens von Nahrungsfetten berichtet. *E. S. Tatarenko, A. E. Sobol* und *Z. N. Nowikowa*<sup>20</sup> entdeckten in im Myzel eines Schimmelpilzes (*Naumoviella oleaginosa sp. nov.*) aufgespeicherten Lipoiden ein Antioxydans, das bei Zugabe zu Nahrungsfetten in einer Menge von 0.01% die Haltbarkeit derselben bei der Lagerung um das 3.5-fache erhöhte. Dieser Körper war unverseifbar und hatte eine JZ von 140.9, was auf eine starke ungesättigte Verbindung hinweist, die anscheinend unter bestimmten Bedingungen leicht oxydiert werden kann.

#### Diskussion

Aus dem vorhandenen Versuchsmaterial ergibt sich, daß der mikrobiologische Verderb der Margarine durch Schimmelpilze, Hefen und Bakterien verursacht wird. Die Schimmelpilze sind als die weitverbreitetsten Mikroorganismen bekannt; wegen ihrer leicht übertragbaren Sporen können sie in ganz verschiedenen Umweltbedingungen angetroffen werden. In der Margarine-Industrie werden die Schimmelpilze selten als primäre Infektion beobachtet, sondern meistens durch Verpackung und Lagerung als sekundäre Infektion eingebracht. Wie aus den oben erwähnten Versuchen zu ersehen ist, kann die Gefahr der Schimmelpilz-Bildung durch entsprechende hygienische Betriebsbedingungen vermieden werden. Falls die Schimmelpilz-Sporen die Margarine erreichen, können sich viele dieser Arten wegen ihrer Säure-Toleranz gut entwickeln. Auch sind die meisten der Schimmelpilze Fettspalter, wodurch der Verderb der Margarine von Ranzigwerden und Entfärbung begleitet ist.

Eine große Gefahr für die Margarine bilden einige wilde\* Hefen. Diese Mikroorganismen können durch ihre Anwesenheit in den verwendeten pflanzlichen Ölen als primäre Infektion bezeichnet werden; als sekundäre Infektion können sie durch die Luft in die Margarine gelangen. Die Hefen besitzen meistens eine sehr hohe Toleranz gegenüber dem Säure- und Salzgehalt. Deshalb können sie auch in einer alten Margarine zur Entwicklung kommen. Als Energiequelle verwenden sie Milchsäure und andere organische Säuren sowie Aromastoffe, die in der Margarine vorkommen; dabei wird die saure Reaktion der Margarine vermindert und Gelegenheit zur Entwicklung der „wilden“ unerwünschten Bakterien in der Margarine geschaffen. Deshalb müssen die Hefen als eine besonders gefährliche Infektion der Margarine betrachtet werden.

Von den Bakterien, die in Margarine vorkommen und einen Verderb hervorrufen können, müssen hauptsächlich 2 Gruppen in Betracht gezogen werden: 1. die fettspaltende und 2. die proteolytische. Da die Reaktion einer guten Margarine ziemlich sauer ist (der pH-Wert beträgt ca. 4.5 bis 5.0) und den Bedürfnissen der proteolytischen Bakterien nicht entspricht, können sie sich nicht entwickeln. Ein Verderb der Margarine durch Zersetzung der vorhandenen Eiweißstoffe ist nicht zu erwarten, wenn bei der Margarine-Produktion Kulturen von bestimmten milchsäurebildenden Bakterien (*Streptococcus lactis* und *Str. cremoris*) mit dem sog. „Säurewecker“<sup>15</sup> zugefügt werden. Durch die Milchsäure-Bildung werden die proteolytischen Bakterien in ihrer Entwicklung gehemmt und sogar vernichtet. Was überhaupt die Möglichkeit eines Auftretens der eiweißabbauenden Mikroben in Margarine betrifft, so können sie in der Emulsion (primäre Infektion) vorhanden sein und durch die Luft (sekundäre Infektion) in die Margarine gelangen.

Die fettspaltenden Bakterien dagegen verursachen öfters den Verderb von Margarine durch Ranzigwerden. Zu dieser Gruppe gehören verschiedene Arten, die eine ganz unterschiedliche Toleranz gegenüber dem Salzgehalt (6% und höher) und dem Säuregehalt besitzen. Obwohl einige sehr stark säure- und salzempfindlich sind, können solche Bakterien doch in der kurzen Zeit, bevor sie absterben, das Fett hydrolysieren. Am stärksten kann das Margarinefett durch die gegen Salz und Säure unempfindlichen, fettspaltenden Bakterien gespalten werden. Wenn die saure Reaktion der Margarine infolge der Tätigkeit anderer Mikroben-Gruppen zurückgeht, können sich auch die säureempfindlichen lipolytischen Formen entwickeln und ein „Seifigwerden“ der Margarine hervorrufen.

Die Milchsäure-Streptococci, die in die Margarine als Schutzmaßnahme gegen die unerwünschten, schädlichen Bakterien eingebracht werden, vermehren sich anfangs sehr gut und sind virulent. Jedoch wird ihre Virulenz durch die Anhäufung von Säuren und durch den Salzgehalt allmählich geschwächt, und die Kulturen können eingehen.

Die pathogenen Bakterien kommen in der Margarine nur ausnahmsweise vor, und ihr Auftreten würde auf ein sehr unhygienisches Arbeitsverfahren hinweisen. Gewöhnlich können sich die pathogenen Bakterien in Margarine nicht entwickeln, weil sie ein sehr ungünstiges Substrat für diese Gruppe darstellt. Deshalb werden auch Coli-Bakterien in der Margarine nur sehr selten gefunden.

Auf Grund der vorliegenden Versuchsergebnisse und der mikrobiologischen Erfahrungen läßt sich folgern, daß die Gefahr des mikrobiellen Verderbs der Margarine u. a. auf folgenden drei Wegen weitgehend vermieden werden kann: 1. durch einen hygienisch einwandfrei geführten Betriebsprozeß, 2. durch Anwendung bestimmter Mikroben-Kulturen, die die Entwicklung der in Margarine unerwünschten Mikroben verhindern können und 3. durch Zusatz von microbiciden Mitteln.

<sup>20</sup> Mikrobiologie (russ.) 24, 215 [1955].

\* Lactosefermentierende und fettspaltende *Torulaceae*.