

Milchsäurebakterien als Schutzkulturen auf SB-vorverpacktem Brühwurstaufschnitt

Von Tina Hartmann, Wolfram Schnäkel und Lothar Kröckel

Vorverpackter Brühwurstaufschnitt ist ein mikrobiologisch hoch sensibles Produkt, auf dem sich bei längerer Kühlung neben Milchsäurebakterien (MSB) auch pathogene Listerien vermehren können. Geeignete Milchsäurebakterien können als Schutzkulturen einen wichtigen Beitrag zur Kontrolle der Listerien leisten, insbesondere wenn auf chemische Konservierungsstoffe verzichtet wird. Die vorliegende Arbeit vergleicht das Wachstum von *Listeria innocua* – als apathogenen Stellvertreter für *Listeria monocytogenes* – und verschiedenen MSB auf Würsten, die mit und ohne Nitrit hergestellt wurden (Lyoner und Gelbwurst), während der Lagerung bei 5 °C unter modifizierter Atmosphäre (100% N₂, N₂/CO₂ = 70/30). Gelbwurst unter N₂ ohne Schutzkultur bot den Listerien die besten Wachstumsmöglichkeiten, Lyoner unter N₂/CO₂ mit Schutzkultur die schlechtesten. MSB wurden durch 30% CO₂ nicht, Listerien auf Gelbwurst nur schwach gehemmt. Bacteriocinogene Kulturen verhinderten eine Vermehrung der Listerien besser als Kulturen ohne Bacteriocinbildung. Der Sakacin A-Bildner *Lactobacillus (Lb.) sakei* Lb706 zeigte dabei den stärksten Effekt und auch die günstigsten sensorischen Eigenschaften. Auf Gelbwurst unter N₂ bot der Stamm Lb706 aber nur bei Anfangskeimzahlen > 10⁶ KBE/g ausreichend Schutz. Von verschiedenen auf beiden Brühwurstsorten rein sensorisch überprüften MSB schnitten Stämme der Art *Lb. sakei* am besten ab.

Brühwurst ist mit mehr als 58% der Gesamtmenge das beliebteste und bedeutendste Fleischerzeugnis der Deutschen. Die Rohstoffe dafür sind im wesentlichen Rind-, Schweine- oder Geflügelfleisch, Speck, Salz und Gewürze. Die Zutaten werden mehr oder weniger fein gekuttert, in Natur-/Kunstdärme oder Formen abgefüllt und bei 72–76 °C gebrüht. Das fertige Produkt ist aufgrund seiner hohen pH- und a_w-Werte (pH 6,2, a_w 0,98) mikrobiologisch instabil und nur unter Kühlung lagerfähig (JAKOB, 2005; KROECKEL, 1999; LAUTENSCHLAEGER und TROEGER, 2007; RIMBACH et al., 2010). Industrielle Erzeugnisse kommen zudem überwiegend, dem hohen Convenience-Bedürfnis des Verbrauchers entsprechend, als vorverpackte Aufschnittware in den Handel. Beim Slicen und Verpacken der Würste kann eine Rekontamination mit Keimen aus dem Arbeitsumfeld (Bedarfsgegenstände, Personal, Raumluft) erfolgen. Psychrotrophe Milchsäurebakterien (MSB) und Listerien können sich dann während der Kühlung vermehren und zum Verderb oder zu lebensbedrohlichen Infektionen beim Verbraucher führen. Durch sorgfältige Gestaltung des Produktionsumfeldes müssen Kontaminationen daher bestmöglich ausgeschlossen werden (FARBER und PETERKIN, 2000; HARTUNG, 2005; LAUTENSCHLAEGER und TROEGER, 2007; RKI, 2010). In der Praxis lässt sich eine Rekontamination mit Listerien allerdings auch bei äußerster Aufschneide- und Verpackungshygiene nie völlig vermeiden. Moderne Brühwurstrezepturen enthalten daher oft chemische Zusätze, welche die Vermehrung der Listerien hemmen (z. B. Acetat/Lactat-Gemische). Alternativ wird nach dem Verpacken „nachpasteurisiert“ und das Produkt damit zusätzlich thermisch belastet. Die früher übliche Vakuumverpackung ist heute überwiegend der Schutzatmosphärenpackung (MAP, modified atmosphere packaging) mit 100% N₂ und/oder N₂/CO₂ = 70/30 gewichen. Aus dem Wunsch des Verbrauchers nach möglichst wenig „Chemie“ resultieren die modernen Bestrebungen zur Entwicklung natürlicher Konser-

Schlüsselwörter

- Vorverpackter Brühwurstaufschnitt
- Schutzkulturen
- Listerien
- Sensorik
- Modifizierte Atmosphäre
- *Lactobacillus sakei*

vierungsmethoden unter Einsatz kompetitiver Schutzkulturen. MSB sind für eine solche Anwendung prädestiniert. Sie besetzen den Lebensraum auf den Produkten, verbrauchen Nährstoffe und produzieren antagonistische Metaboliten (Milchsäure, u.a.), die unerwünschte Keime unterdrücken. Einige MSB bilden zusätzlich Bacteriocine, die Listerien abtöten oder im Wachstum hemmen, z.B. die von manchen *Lb. sakei* Stämmen gebildeten Sakacine A und P. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, unter Berücksichtigung moderner Verpackungstechnologien (modifizierte Atmosphäre mit 100% N₂ sowie 70% N₂/30% CO₂) sowie repräsentativer mit bzw. ohne Nitritzusatz hergestellter Wursttypen (Lyoner, Gelbwurst) aus einem Pool potenzieller Schutzkulturen für vorverpackten Brühwurstaufschnitt diejenigen mit der besten Schutzwirkung gegen Listerien und mit der günstigsten Sensorik herauszufinden.

Material und Methoden

Es wurden vier voneinander unabhängige, aufeinander aufbauende Versuche (V1–V4) durchgeführt. Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss eine Bacteriocin-negative MSB-Konkurrenzflora auf das Listerienwachstum auf Brühwurstaufschnitt hat (V1). Im Vordergrund stand hier das antagonistische Prinzip der Besetzung des Lebensraums und der Produktion von Milchsäure. Dazu wurde eine kommerzielle Schutzkultur der Art *Lactobacillus (Lb.) sakei* (Fa. Chr. Hansen, B-2 SafePro[®]) eingesetzt (Tab. 1). Dieser Versuch war Grundlage für den Vergleich mit den Bacteriocin-positiven Stämmen *Lb. sakei* Lb706 (Sakacin A⁺) und Lb674 (Sakacin P⁺) aus der Sammlung des Instituts für Sicherheit und Qualität bei Fleisch am MRI Kulmbach (V2 und V3) (Tab. 1). Von MSB, die anti-listerielle Bacteriocine bilden, wird erwartet, dass sie eine ausgeprägtere antagonistische Wirkung gegen Listerien zeigen als Bacteriocin-negative Kulturen. Beide wurden bereits früher auf vakuumverpacktem Brühwurstaufschnitt (Lyoner) mit Erfolg getestet (KROECKEL, 1999). Es war daher von grundsätzlichem Interesse, die Wirkung beider Kulturen auch bei MAP-verpackter Ware zu testen (V2). In V3 wurde der Stamm, der in V2 am besten abschnitt, mit zwei unterschiedlichen Inokulationsdichten eingesetzt. Aus einer Auswahl weiterer potenzieller Schutzkulturen (Tab. 1) sollten schließlich diejenigen herausgefunden werden, die aus sensorischer Sicht für den Einsatz auf Brühwurstaufschnitt geeignet sind (V4). Aufgrund praktischer Erwägungen wurde jeder Versuch nur einmal durchgeführt.

Tab. 1: Verwendete MSB-Kulturen

Tab. 1: LAB cultures used

MSB-Art	MSB-Stamm	Quelle
<i>L. sakei</i>	B-2 Safe Pro®	kSK für gekochte oder gepökelte Fleischwaren (*)
	Lb706 (SakA ⁺)	Schweinefleisch, vakuumiert (D, 1985)
	Lb674 (SakP ⁺)	Lammfleisch, vakuumiert (NZ, 1982)
	Lb85 (SakP ⁺)	Rohwurst (D, 1986)
	Lb1043 (SakP ⁺)	gemischtes Hackfleisch (D, 1991)
<i>L. curvatus</i>	SafePro®	kSK für Rohwurst, Brühwurst und Fleischzubereitungen (*)
	B-Lc-48	
<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>	Rubis®	kSK, sauerstoffzehend (*)
<i>Leuconostoc carnosum</i>	B-SF-43 Bactoferm™ (Lb1259)	kSK für gekochte oder gepökelte Fleischwaren (*)
<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	FD-DVS L.casei-01-nutrish®	kPK zur Herstellung mild-säuerlicher Produkte (*)

kSK / kPK, kommerzielle Schutzkultur / probiotische Kultur (Chr. Hansen, DK); (*) nach Angaben des Herstellers; D, Deutschland; NZ, Neuseeland; SakA⁺, Sakacin A-positiv; SakP⁺, Sakacin P-positiv.

Quelle: HARTMANN, SCHNÄCKEL und KRÖCKEL

FLEISCHWIRTSCHAFT 7/2013

lichen MSB über das Messer auf die gesamte Anschnittfläche. Diese Technik gewährleistete eine gleichmäßige Beimpfung mit definierten Keimzahlen. Die Keimzahlen auf der Wurst (KbE/g) lagen um den Faktor 100 niedriger als die der voreingestellten Keimsuspensionen (KbE/ml). Zur Verpackung wurden die Wurstscheiben (à 200 g) in einer Siegelchale fächerartig ausgelegt. Chargen bei denen das Listerienwachstum getestet wurde, wurden pro Scheibe mit 10 µl einer definierten *L. innocua* Mischung (Pool aus den drei verschiedenen, bacteriocinsensitiven Stämmen DSM20649, BAFF-Li1 und BAFF-Li94) beimpft, so dass die Ausgangskeimzahl der Listerien immer bei 10³-10⁴ KbE/g lag (HARTMANN, 2012). Die Listerien wurden über Nacht bei 30 °C in Std-I Bouillon (Merck), angezogen und in 0,9% NaCl verdünnt.

Verpackung und Bedingungen während des Lagerversuchs

Zur Verpackung wurden die Proben mit reinem Stickstoff bzw. einer Atmosphäre aus 70% Stickstoff und 30% CO₂ beaufschlagt und mit der Siegelmaschine (Modell TS500, Fa. VC999 Verpackungssysteme AG) verschlossen. Direkt im Anschluss erfolgte die Lagerung bei 5 °C (angenommene durchschnittliche Temperatur von Kühlmöbeln im Einzelhandel und beim Verbraucher).

Wurstherstellung

Die Würste wurden im Magerbrätverfahren unter Verwendung einzelner, reiner Naturgewürze hergestellt. Weitere Inhaltsstoffe, z. B. Zuckerstoffe, wie sie in fertigen Würzmischungen enthalten sind, wurden als unkalkulierbare Einflussfaktoren auf das Wachstum der Keime ausgeschlossen. Für Lyoner wurde ein NPS-Gehalt von 1,8%, für Gelbwurst die gleiche Menge an Kochsalz verwendet. Das Brät wurde unmittelbar nach dem Kuttern in Kunstdärme (60 mm) abgefüllt. Lyoner wurde zunächst umgerötet, anschließend wurden beide Wurstsorten für 90 Minuten bei 76 °C im Brühschrank gebrüht und danach bis zum Aufschneiden bei 2 °C gelagert.

Beimpfung mit MSB und Listerien

Als Schutzkulturen wurden sowohl kommerziell verfügbare als auch institutseigene MSB eingesetzt. Als apathogenes Surrogat für *L. monocytogenes* diente die genetisch verwandte Art *Listeria innocua*. Sie ist wie *L. monocytogenes* regelmäßig auf vorverpackten Aufschnittwaren zu finden und verhält sich auf diesen ähnlich wie *L. monocytogenes* (CORNELIUS et al., 2008). Die MSB wurden nach Reinheitsprüfung und Vorkultivierung über Nacht bei 30 °C in MRS-Bouillon (pH 6,5) angezogen. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugieren geerntet, gewaschen und in 0,9% NaCl resuspendiert. Die Inokulation der Wurstrohlinge mit MSB erfolgte nach Entfernen der Wursthaut durch manuelles Schwenken in definierten Keimsuspensionen in einem großen PET-Beutel (40 x 60 cm) für 10 Sekunden. Anschließend wurden die Wurststangen mit einer desinfizierten Aufschnittmaschine in Scheiben (2 mm) geschnitten. Dabei verteilten sich die auf der Oberfläche befind-

Mikrobiologische Untersuchungen

Die Bestimmung der Keimzahlen erfolgte in Anlehnung an die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB. Die Keimzahlen der Listerien wurden auf PALCAM-Agar (Merck) nach 96 h Inkubation bei 30 °C ermittelt, die der MSB auf MRS-Agar (pH 6,5) nach 96 h Inkubation bei 25 °C (Kröckel, 2000 und 2008). Von jeder Fächerpackung wurden je 3 Scheiben aus unterschiedlichen Positionen (oben, mitte, unten) steril entnommen, in Stomacher-Beutel überführt, mit 9 Gewichtsteilen 0,9% NaCl-Lösung versetzt und für 2 min im Stomacher (AES Laboratories, Mix 1) homogenisiert. Serielle dezimale Verdünnungen des Homogenats wurden auf die jeweiligen Nährböden ausplattiert. Von den koloniebildenden Einheiten der beiden höchsten Verdünnungsstufen wurden die gewichteten arithmetischen Mittel gebildet. Die Probennahme erfolgte in regelmäßigen Abständen über eine Lagerdauer von 22-28 Tagen.

Sensorische Untersuchungen

Bei allen Versuchen wurde eine beschreibende Sensorik durch ein erfahrenes Prüfer-Panel vorgenommen. In V3 wurde zusätzlich eine Verbraucherbefragung (Vier-Kategorien-Beliebtheitstest) durch-

Tab. 2: Wirkung der nicht-bacteriocinogenen *Lb. sakei*-Schutzkultur B-2 SafePro™ auf die Entwicklung von *Listeria innocua* auf Lyoner- und Gelbwurst-Aufschnitt unter modifizierter Atmosphäre mit und ohne 30% CO₂ während der Lagerung bei 5 °C

Tab. 2: Effect of the non-bacteriocinogenic protective culture *Lb. sakei* B-2 SafePro™ on the development of *Listeria innocua* on sliced cooked sausages produced with ('lyoner') and without ('gelbwurst') nitrite and packaged under modified atmosphere with and without 30% CO₂ during storage at 5 °C

Tag	Lyoner N ₂		Gelbwurst N ₂		Lyoner N ₂ /CO ₂		Gelbwurst N ₂ /CO ₂	
	- SK	B-2 SafePro	- SK	B-2 SafePro	- SK	B-2 SafePro	- SK	B-2 SafePro
1	3,6	3,7	3,6	3,7	3,6	3,7	3,7	3,8
8	3,7	3,8	5,1	4,7	3,6	3,7	4,4	4,3
15	4,2	3,7	7	4,8	3,7	3,5	6,9	4,4
22	4,7	3,4	8	6,3	5,5	3,3	7,6	4,7

-SK, ohne Schutzkultur

Quelle: HARTMANN, SCHNÄCKEL und KRÖCKEL

FLEISCHWIRTSCHAFT 7/2013

Tab. 3: Wirkung der bacteriocinogenen *Lb. sakei*-Schutzkulturen Lb674 und Lb706 auf die Entwicklung von *Listeria innocua* auf Lyoner- und Gelbwurst-Aufschnitt unter modifizierter Atmosphäre mit und ohne 30% CO₂ während der Lagerung bei 5 °C

Tab. 3: Effect of the bacteriocinogenic protective cultures *Lb. sakei* Lb674 and Lb706 on the development of *Listeria innocua* on sliced cooked sausages produced with ('lyoner') and without ('gelbwurst') nitrite and packaged under modified atmosphere with and without 30% CO₂ during storage at 5 °C

Tag	Lyoner N ₂			Gelbwurst N ₂			Lyoner N ₂ /CO ₂			Gelbwurst N ₂ /CO ₂		
	-SK	+ SK		- SK	+ SK		- SK	+ SK		- SK	+ SK	
		674	706		674	706		674	706		674	706
1	3,5	3,3	3,2	3,5	3,3	3,4	3,3	3,3	3,1	3,3	3,3	3,4
8	3,4	3,3	2,8	5,7	4,4	3,5	3,2	3,3	2,7	4,6	3,9	2,5
15	4,4	3,4	3	8	4,5	4,1	4,7	3,1	2,3	6,6	4	3,4
22	5,4	3	2,6	8,5	4,4	4,2	4	2,9	2,6	7,8	3,5	3,4
28	6,2	3,2	2,5	8,4	4,9	4,8	3	2,4	2	8,4	3,5	3,5

- SK, ohne Schutzkultur; +SK, mit Schutzkultur

Quelle: HARTMANN, SCHNÄCKEL und KRÖCKEL

FLEISCHWIRTSCHAFT 7/2013

geführt (HARTMANN, 2012). Aufgrund der begrenzten Anzahl der Prüfungen erfolgte keine statistische Auswertung. In beiden Fällen konnten jeweils nur Tendenzen abgeleitet werden.

Ergebnisse

Die Entwicklung der Listerien-Keimzahlen auf Lyoner und Gelbwurst unter N₂ und N₂/CO₂ in V1 bis V3 ist in Tab. 2 bis 4 dargestellt. Der Verlauf der Listerien-Keimzahlen in Gegenwart und Abwesenheit von Schutzkulturen zeigt, in welchem Ausmaß sich Listerien von der jeweiligen Schutzkultur auf Lyoner und Gelbwurst unter N₂ bzw. N₂/CO₂ hemmen lassen und welchen Beitrag die Faktoren Nitrit und CO₂ alleine liefern. Die Keimzahlentwicklung der MSB (Schutzkulturen bzw. Kontaminationsflora) ist nicht tabellarisch dargestellt. In keiner der Chargen ohne gezielten Zusatz von Listerien waren im Laufe der Lagerung Listerien-Kontaminationen nachweisbar (Nachweiskgrenze < 10 KbE/g). In den Kontrollchargen mit Listerien aber ohne Schutzkultur lag die Keimzahl der natürlichen MSB-Kontaminationsflora an Tag 1 der Lagerung in allen Fällen bei < 10 KbE/g und entwickelte sich bis Tag 22 auf Werte von 5,6-7,0 log₁₀ (KbE/g) in V1, 6,2-7,6 log₁₀ (KbE/g) in V2 und 4,0-4,7 log₁₀ (KbE/g) in V3. Einflüsse von Wursttyp und Schutzatmosphäre hierauf waren nicht eindeutig erkennbar.

Die in V1 eingesetzte Bacteriocin-negative Schutzkultur *Lb. sakei* B-2 SafePro® bewirkte bei beiden Wurstarten und unter beiden Schutzatmosphären eine deutliche Hemmung des Listerienwachstums (Tab. 2). Eine Hemmwirkung von CO₂ war nur bei Gelbwurst erkennbar, insbesondere in Kombination mit der Schutzkultur. In der Kombination mit Nitrit, also auf Lyoner, war sogar eine Abnahme der Listerienzahlen zu beobachten. Die Keimzahlverläufe der Schutz-

kulturen wurden dagegen von Nitrit und CO₂ nicht beeinflusst. Sie vermehrten sich innerhalb einer Woche von > 10⁶ KbE/g ([log₁₀ (KbE/g)]_{Tag1} = 6,5 ± 0,2; n=8) auf > 10⁸ KbE/g (log₁₀ (KbE/g) = 8,6 ± 0,1; n=8) und verblieben auf diesem Niveau bis zum Ende der Lagerung. Aus sensorischer Sicht bewirkten die Schutzkulturen gegen Ende der Lagerung einen leicht milchsauerem Geschmack, der aber nicht unbedingt unangenehm war, sondern durchaus auch mit einer gewissen Frische assoziiert wurde. Fremdaromen bakteriellen Ursprungs wurden nicht festgestellt (Tab. 5).

Die in V2 eingesetzten Bacteriocin-positiven Schutzkulturen *Lb. sakei* Lb706 ([log₁₀ (KbE/g)]_{Tag1} = 6,7 ± 0,2; n=8) und Lb674 ([log₁₀ (KbE/g)]_{Tag1} = 6,4 ± 0,2; n=8) zeigten erwartungsgemäß eine wesentlich stärkere Hemmwirkung gegen Listerien als der MSB-Stamm in V1 (Tab. 3). Zusätzlich setzte diese Wirkung auch schon am ersten Tag der Lagerung ein. Im Vergleich dazu war bei V1 frühestens nach einer Woche ein unterschiedlicher Verlauf der Listerien mit bzw. ohne Konkurrenzflora zu erkennen. Auch in V2 zeigte sich eine stärkere Hemmung der Listerien auf Lyoner sowie unter CO₂-Einfluss im Vergleich zu Gelbwurst und einer reinen Stickstoffatmosphäre. Es wird auch deutlich, dass der *Lb. sakei* Stamm Lb706 eine stärkere Wirkung gegen Listerien zeigt und diese auch früher einsetzt als bei Stamm Lb674 (Tab. 3). Die Keimzahlen der Schutzkulturen entwickelten sich ähnlich wie in V1 und lagen nach einer Woche bei log₁₀ (KbE/g) = 8,3 ± 0,1 (n=8) (Stamm Lb706) und log₁₀ (KbE/g) = 8,5 ± 0,1 (n=8) (Stamm Lb674). Im Hinblick auf die Sensorik wurde Wurstaufschnitt mit Stamm Lb674 eher mit negativen Attributen bedacht („faulig“, „essigsauer“). Stamm Lb706 zeigte dagegen keine Fremdaromen (Tab. 5). Der Stamm Lb706 eignet sich daher aus sensorischer Sicht für den Einsatz auf Brühwurstaufschnitt besser als der Stamm Lb674.

Tab. 4: Einfluss reduzierter Inokulationsdichten der *Lb. sakei*-Schutzkultur Lb706 auf die Entwicklung von *Listeria innocua* auf Lyoner- und Gelbwurst-Aufschnitt unter modifizierter Atmosphäre mit und ohne 30% CO₂ während der Lagerung bei 5 °C

Tab. 4: Effect of reduced inoculation densities of the protective culture *Lb. sakei* Lb706 on the development of *Listeria innocua* on sliced emulsion-type sausages produced with ('lyoner') and without ('gelbwurst') nitrite and packaged under modified atmosphere with and without 30% CO₂ during storage at 5 °C

Tag	Lyoner N ₂			Gelbwurst N ₂			Lyoner N ₂ /CO ₂			Gelbwurst N ₂ /CO ₂		
	-SK	+ Lb706		- SK	+ Lb706		- SK	+ Lb706		- SK	+ Lb706	
		nKz	hKz		nKz	hKz		nKz	hKz		nKz	hKz
1	3,2	3,3	3,2	3,8	3,5	3,2	3,3	3,2	3,1	3,4	3,3	3,4
8	4,6	4,4	4,1	5,9	5,8	4,9	3,9	3,3	3,3	5,4	4,7	4,5
15	5,6	4,4	3,6	7,9	6,4	6,2	4,4	3,2	2,9	8,3	4,8	4,1
22	6,1	4,5	3,6	9,3	7,1	7,1	5,2	3,5	3,3	8,4	5,9	4,6
28	8,2	4,2	3,2	9,1	7,2	7,3	5,2	3,1	2,6	8,8	6,7	4,4

SK, ohne Schutzkultur; nKz, niedrige Inokulationsdichte (> 4 log₁₀ KbE/g); hKz, hohe Inokulationsdichte (> 5 log₁₀ KbE/g).

Quelle: HARTMANN, SCHNÄCKEL und KRÖCKEL

FLEISCHWIRTSCHAFT 7/2013

Tab. 5: Sensorische Bewertung von vorverpacktem Brühwurstaufschnitt mit verschiedenen MSB-Kulturen nach Lagerung bei 5 °C

Tab. 5: Sensory evaluation of prepackaged sliced emulsion-type sausages with various LAB cultures after storage at 5 °C

MSB-Stamm	Bewertung der beimpften Proben	
	Tage	Sensorischer Eindruck
B-2 Safe Pro®	22	s / S Geruch und Geschmack, A, kFA
Lb706	29	s / S Geruch und Geschmack, A, kFA
Lb674	28	cS Geschmack, faulig, E, A
Lb85	18	s, E, brotig
Lb1043	18	s, kFA
SafePro® B-Lc-48	18	s, S Geruch, etwas seifig, alt
Rubis®	18	s, S Geruch, etwas seifig, alt
B-SF-43 BactofermTM (Lb1259)	18	S Geschmack, schwefelartig, faulig
FD-DVS <i>L. casei</i> -01-nutrish®	18	s, E, schwefelartig, brotig / hefig,

s: säuerlich; S: saurer; cS: chemisch sauer; E: Essigsäure; A: Altgeschmack; kFA: keine Fremdaromen

Quelle: HARTMANN, SCHNÄCKEL und KRÖCKEL

FLEISCHWIRTSCHAFT 7/2013

Obwohl *Lb. sakei* Lb706 in V2 sensorisch besser abschnitt als Stamm Lb674, wurden alle Proben nach etwa der Hälfte, spätestens aber zum Ende der Lagerzeit, als deutlich sauer bewertet. Da diese saure Note aus Sicht der Prüfer bei einer Brühwurst nicht akzeptabel war, wurden in V3 zwei niedrigere Ausgangskeimzahlen getestet, und zwar $> 10^4$ KbE/g (nKz: $[\log_{10} (\text{KbE/g})]_{\text{Tag1}} = 4,8 \pm 0,2$; n=8) und $> 10^5$ KbE/g (hKz: $[\log_{10} (\text{KbE/g})]_{\text{Tag 1}} = 5,5 \pm 0,3$; n=8). Auf diese Weise sollten die sensorisch wirksamen Stoffwechselaktivitäten der Kultur am Anfang der Lagerzeit gering bleiben, d. h. weniger Säure produziert und die annehmbare Haltbarkeitsdauer verlängert werden. Die Schutzkulturen wuchsen trotz der niedrigeren Ausgangskeimzahlen ähnlich wie in V1 und V2 innerhalb einer Woche auf $> 10^8$ KbE/g ($\log_{10} (\text{KbE/g}) = 8,0 \pm 0,1$; n=16). Im Vergleich zu V2 erreichten die Listerien in Gegenwart der Schutzkultur höhere Keimzahlen. Die niedrigere Ausgangskeimzahl der MSB erlaubte dabei zunächst eine stärkere Vermehrung der Listerien, zeigte aber noch eine ausreichende Hemmwirkung, um ein unkontrolliertes Wachstum zu verhindern (Tab. 4). Wie bei den vorherigen Versuchen wurden die stärksten antilisteriellen Effekte bei Lyoner unter N_2/CO_2 erzielt. CO_2 wirkte sich alleine nur in einem geringen Maß auf das Listerienwachstum aus (vgl. Gelbwurst –SK in Tab. 4). Die sensorische Prüfung ergab keine Unterschiede zwischen den Proben mit und ohne Schutzkultur, weder bei der niedrigen (nKZ) noch bei der hohen (hKZ) Inokulationsdichte. Das Verbraucherpanel erkannte dagegen meist einen Unterschied zwischen den beimpften und unbeimpften Proben und bewertete die beimpften Proben schlechter als die Kontrollen. Ein Unterschied zwischen der höheren und niedrigeren Keimzahl wurde nicht erkannt.

Das Angebot an kommerziellen Mikroorganismenkulturen für Lebensmittel umfasst inzwischen auch probiotische Keime, deren Einsatz als Schutzkultur von besonderem Interesse ist. Auch O_2 -zehrende MSB, die das Produkt (zusätzlich) vor oxidativen Veränderungen (Ranzigwerden, Farbabweichungen) während der Lagerung schützen, sind heute verfügbar. Die sensorischen Einflüsse solcher Kulturen bei Brühwurstaufschnitt sind bisher allerdings relativ unbekannt. In V4 wurden Lyoner und Gelbwurst mit fünf verschiedenen Kulturen oder Keimkombinationen beimpft und gelagert. Die Inokulationsdichten und Keimzahlverläufe waren vergleichbar mit jenen in V1 und V2. Unter den Keimen befand sich die probiotische Kultur „FD-DVS *L. casei*-01-nutrish®“, eine Mischkultur aus dem als O_2 -zehrend beworbenen Keim „Rubis®“, zur Vermeidung oxidativer Fremdaromen und der Schutzkultur „SafePro B-Lc-48®“, die für gepökelte Fleischwaren kommerziell erhältliche Schutzkultur „B-SF-43 Bactoferm®“, und die Sakacin P-bildenden *Lb. sakei* Stämme Lb1043 und Lb85 aus der hauseigenen Stammsammlung (Tab. 1). Es wurde deutlich, dass

Lb. sakei Stämme aus sensorischer Sicht am besten für den Einsatz auf Brühwurst (unabhängig vom Wursttyp) geeignet sind. Sie erzeugten gegenüber der Kontrolle keine negativen Auffälligkeiten und überdeckten sogar Produktfehler (Tab. 5). Auch weitere Versuche mit der Kombination Rubis® und B-Lc-48® sind aus sensorischer Sicht Erfolg versprechend.

Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, wie sich Milchsäurebakterien und Listerien in MAP-verpackter Brühwurst in Abhängigkeit der Einflussfaktoren Nitrit (Lyoner vs. Gelbwurst) und CO_2 während der Kühlagerung verhalten und wie verschiedene Schutzkulturen die Vermehrung von Listerien und die Sensorik der gelagerten Wurstaufschnitte beeinflussen. Die apathogene Listerienart *L. innocua* wird aufgrund der nahen Verwand-

schaft zu *L. monocytogenes* sowie weitreichender ökophysiologischer Ähnlichkeiten in praxisnahen Untersuchungen aus Sicherheitsgründen regelmäßig als Surrogat/Indikator für *L. monocytogenes* eingesetzt (LADO und YOUSEF, 2007; MILILLO et al., 2012). Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lassen sich daher prinzipiell auch auf *L. monocytogenes* übertragen.

Alle untersuchten Einflussfaktoren zeigten einen Effekt auf das Listerienverhalten. Der wirksamste Einzelfaktor war dabei Nitrit. Listerien wuchsen auf Gelbwurst um vieles besser als auf Lyoner. Bacteriocinogene Schutzkulturen können dieses Wachstum auf beiden Wursttypen sehr gut in Schach halten. Dabei gilt: Je höher die MSB-Keimzahl, desto besser die anti-listerielle Wirkung. Auch Bacteriocin-negative MSB können eine noch akzeptable Wirkung zeigen. CO_2 zeigte in den hier verwendeten Konzentrationen einen vergleichsweise geringen Effekt. Am wirksamsten war die Kombination der Schutzkultur mit zusätzlichen Hürden (Nitrit, CO_2). Die hemmende Wirkung von CO_2 gegen Listerien wurde vor allem bei nitritfreier Ware deutlich. Der industrielle Einsatz von CO_2 ist somit nicht ganz unbegründet, sollte aber auch nicht überbewertet werden. Im Gegensatz zu Rohwurst sollten Schutzkulturen bei Brühwurst die Sensorik möglichst nicht verändern. Wie die Versuche zeigten, lässt sich diese Forderung nicht zu 100% erfüllen. Mit Schutzkulturen behandelte Produkte entwickeln während der Lagerung im günstigsten Fall ein leicht mildsaureres Aroma. Weniger geeignete Kulturen führen zu einer übermäßig starken Säuerung oder anderen nicht hinnehmbaren Geschmacksabweichungen.

Das Wachstum einer aktiven Konkurrenzflora ist notwendig, damit bei Abwesenheit chemischer Konservierungsstoffe eine ausreichende Kontrolle der Listerien überhaupt erzielt werden kann. Auch BREDHOLT et al. (2001) fanden eine hohe Wirksamkeit eines Bacteriocin-negativen *Lb. sakei* Stammes auf einem brühwurstähnlichen Fleischzerzeugnis. Sie konnten mit ihrer Schutzkultur bei einem Salzgehalt der Wurst von 2,5–3% das Listerienwachstum komplett verhindern. Bei moderateren Salzgehalten sind bacteriocinogene Schutzkulturen interessanter. Die bei V2 im Vergleich zu V1 bereits zu Beginn der Lagerung einsetzende Hemmung der Listerien zeigt, dass die produzierten Bacteriocine wesentlich spezifischer und deshalb schon bei einer sehr viel geringeren Konzentration wirken können als die Milchsäure, die erst über einen Zeitraum von mehreren Tagen gebildet werden muss. Im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen fanden KATLA et al. (2001, 2002) keinen Unterschied in der anti-listeriellen Wirkung Bacteriocin-positiver und -negativer Schutzkulturen der gleichen MSB-Art. Aufschnittwaren mit Schutzkulturen, die auch nach längerer Lagerung sensorisch

akzeptabel bleiben, sind prinzipiell herstellbar. BREDHOLT et al. fanden bei Brühwurstaufschnitt mit niedrigeren Anfangskeimzahlen einer *Lb. sakei* Kultur, vergleichbar mit dem hier gezeigten „hKZ“-Ansatz in V3, auch nach 28 Tagen keine von unbeimpften Kontrollen unterscheidbaren sensorischen Abweichungen (BREDHOLT et al., 2001). Bei einer grundsätzlichen Eignung der Schutzkultur hat offenbar die Ausgangsqualität der Wurst den größeren Einfluss auf die Sensorik.

Sensorisch geeignete Schutzkulturen, die ihre Wirkung gegen unerwünschte Bakterien mit weiteren positiven oder werbewirksamen Eigenschaften kombinieren, wie probiotische Keime oder Kulturen, die gewürzeigene Nitrate reduzieren können und somit einen Einsatz von Nitritpökelsalz überflüssig machen, oder solche, die eine Farbverbesserung der Produkte bewirken, besitzen ein hohes Innovationspotential und sind zunehmend Gegenstand aktueller Forschung und Entwicklung (FISCHER et al., 2005; SCHLAFMANN et al., 2002). Unseren Untersuchungen zufolge eignen sich für Brühwurst aus sensorischer Sicht *Lb. sakei* Stämme am besten. Probiotische Kulturen lassen sich derzeit nicht als Schutzkulturen mit vertretbarer Sensorik einsetzen.

Schlussfolgerungen für die Praxis

Bakterielle Schutzkulturen können, alternativ zu chemischen Konservierungsstoffen, einen wichtigen Beitrag zur mikrobiologischen Sicherheit und Qualität von MAP-verpackten Aufschnittwaren leisten. MSB der Art *Lb. sakei* eignen sich unter sensorischen Gesichtspunkten am ehesten. Bacteriocinbildner zeigen dabei eine besondere anti-listerielle Wirkung. Problematisch für einen breiten Einsatz von Schutzkulturen bei vorverpackten Brühwurstherzeugnissen ist nach wie vor, dass alle bisher getesteten Stämme im Laufe der Lagerung zu merklichen, meist säuerlichen Geschmacksabweichungen führen, die bei direktem Verzehr nicht ohne weiteres akzeptiert werden. Bei der Verwendung in Wurstsalaten und Sandwiches wären die säuerlichen Noten aber vermutlich weniger auffällig.

Danksagung

Für die technische Assistenz bei der Herstellung und Verpackung sowie bei der mikrobiologischen Untersuchung und sensorischen Bewertung der Würste/Wurstaufschnitte danken wir allen beteiligten Mitarbeitern des Instituts für Sicherheit und Qualität bei Fleisch des MRI Kulmbach. Herrn Jürgen Schwing (Fa. Chr. Hansen) danken wir für die Überlassung von MSB-Kulturen zu Testzwecken.

Literatur

1. BREDHOLT, S., T. NESBAKKEN und A. HOLCK (2001): Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. *International Journal of Food Microbiology* 66, 191–196. – 2. CORNELIUS, A.J., J.A. HUDSON und T.L. WONG, T.L. (2008): Enumeration and growth of naturally occurring *Listeria spp.* in unpackaged ham. *Food Microbiology* 25, 407–412. – 3. FARBER, J. M. und P.I. PETERKIN (2000): *Listeria monocytogenes*. Aus: Lund, B. M. et al.: *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Volume II, Springer Verlag 2000. – 4. FISCHER, A. et al. (2005): Umrötung von Brühwurst ohne Nitritpökelsalz. *Fleischwirtschaft* 85 (5), 106 – 109. – 5. HARTMANN, T. (2012) *Milchsäurebakterien als Schutzkulturen auf SB-vorverpacktem Brühwurstaufschnitt*. Master Thesis, Hochschule Anhalt-Bernburg. – 6. HARTUNG, M. (2005): Ergebnisse der Zoonoseerhebung 2003 in Deutschland bei Lebensmitteln. *Fleischwirtschaft* 85 (4), 116 –122. – 7. JAKOB, H. (2005): Brühwurst – Erläuterungen zu Brühen, Kerntemperatur, Hitzeschädigung. http://www.oekolandbau.de/fileadmin/redaktion/oeko_lehrmittel/Ernaehrungswirtschaft/Fleischerhandwerk/fl_modul_c/fl_c_02/flmc02_23_2010.pdf – 8. KATLA, T., T. MØRETRØ, I. SVEEN, I.M. AASEN, L. AXELSSON, L.M. RØRVIK und K. NATERSTAD (2001): Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of Sakacin P and / or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiology* 18, 431 – 439. – 9. KATLA, T., T. MØRETRØ, I. SVEEN, I.M. AASEN, L. AXELSSON,

L.M. RØRVIK und K. NATERSTAD (2002): Inhibition of *Listeria monocytogenes* in chicken cold cuts by addition of Sakacin P and Sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*. *Journal of Applied Microbiology* 93, 191 – 196. – 10. KROECKEL, L. (1999): Natürliche Barrieren für die Biokonservierung. *Fleischwirtschaft* 99 (1), 67–70. – 11. KROECKEL, L. (2000) Aktuelle Untersuchungen zum Vorkommen von *Listeria monocytogenes* und Milchsäurebakterien in vorverpackten, kühlgelagerten Fleischerzeugnissen. *Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach* 39 (Nr. 149), 783–792. – 12. KROECKEL, L. (2008) Mikrobiologische Qualität vorverpackter Aufschnittware. *Fleischwirtschaft* 88 (11), 112–116. – 13. LADO, B.H. und A.E. YOUSEF (2007): Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In E.T. Ryser und E.J. Marth (Hrsg.) *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Third Edition. CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, Florida. – 14. LAUTENSCHLAEGER, R. und TROEGER K. (2007): Brühwurst. Aus: BRANSCHIED, W. et al.: *Qualität von Fleisch und Fleischwaren*. Deutscher Fachverlag 2007, 2. Auflage, 938 – 973. – 15. MILILLO, S.R. et al. (2012): A review of the ecology, genomics, and stress response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Crit. Rev. Food Sci, Nutr.*, 52, 712–725. – 16. Rimbach, G. et al. (2010): *Lebensmittelwarenkunde für Einsteiger*. Springer Verlag 2010. – 17. RKI (2010): *Epidemiologisches Bulletin*. Robert Koch-Institut 34, 341 – 346. – 18. SCHLAFMANN, K., A.P. MEUSBURGER, W.P. HAMMES, C. BRAUN, A. FISCHER und C. HERTEL (2002): Starterkulturen zur Verbesserung der Qualität von Rohschinken. *Fleischwirtschaft* 82 (11), 108–114.

Anschriften der Verfasser

Ökotoptologin (M. Sc.) Tina Hartmann, Ahornstrasse 6, 96146 Altendorf; Wissenschaftlicher Direktor Dr. Lothar Kröckel, Max-Rubner-Institut (MRI), Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, E.-C.-Baumann-Straße 20, 95326 Kulmbach; Prof. Dr. Wolfram Schnäkel, Hochschule Anhalt, Fachbereich LOEL, Strenzfelder Allee 28, 06406 Bernburg

Summary

Lactic acid bacteria as protective cultures on prepackaged sliced emulsion-type sausage

Hartmann, T. – Altendorf, W. Schnäkel – Bernburg and L. Kröckel – Kulmbach, Germany

Prepackaged sliced Bologna-type sausage | Protective cultures | *Listeria* | Sensory evaluation | Modified atmosphere | *Lactobacillus sakei*

Prepackaged deli-meats such as sliced emulsion-type sausages are microbiologically highly sensitive foods on which, during prolonged cold storage, besides lactic acid bacteria (LAB) also pathogenic listeria are able to multiply. Suitable LAB can make an important contribution to control listeria in these products, especially when chemical preservatives are omitted. The present study provides data on the growth of *Listeria innocua* – as a non-pathogenic surrogate for *Listeria monocytogenes* – and different LAB on sausages produced with and without nitrite (Bologna-type sausage and 'Gelbwurst') during packaged storage at 5 °C under modified atmosphere (100 % N₂, N₂/CO₂ = 70/30). 'Gelbwurst' under N₂ without protective culture provided the most favourable growth environment for listeria while the opposite was true for Bologna-type sausage under N₂/CO₂ with protective culture. LAB were not inhibited by 30 % CO₂ and, a relatively weak effect was seen with listeria on 'Gelbwurst'. A better control of listerial growth was seen with bacteriocinogenic cultures as compared to cultures devoid of bacteriocin production. The sakacin A producer *Lactobacillus (Lb.) sakei* Lb706 displayed the strongest anti-listerial effect and, also the most favourable sensory characteristics. On 'Gelbwurst' under N₂, however, strain Lb706 provided sufficient protection only when inoculated at > 10⁶ cfu/g. Of several LAB tested for their sensory effects on both sausage types only, strains of *Lb. sakei* performed best.