

Biokonservierung von Fleischerzeugnissen

Bacteriocinogene Milchsäurebakterien können Pathogene hemmen

Lothar Kröckel (Kulmbach)

Fleisch verdirbt schnell. Wenn keine spezifischen Maßnahmen zur Verlängerung der Haltbarkeit und zur Kontrolle pathogener Mikroorganismen ergriffen werden, kann es rasch zu einem Gesundheitsrisiko für den Verbraucher werden. Eine verbesserte Lagerstabilität von Fleischerzeugnissen erreicht man häufig durch eine Kombination unterschiedlicher Konservierungsverfahren. Produkte, die ausreichend durch Trocknung, Salz und Säure stabilisiert sind, etwa langgereifte Rohwürste, können auch ohne Kühlung oder Erhitzung längere Zeit aufbewahrt werden. Erhitzte Fleischerzeugnisse verderben während der Kühlung weniger schnell, wenn sie zusätzlich durch Salze oder Genußsäuren stabilisiert sind. Die gezielte Kombination solcher Verfahren in der Produktentwicklung ist als „Hürdentechnologie“ bekannt geworden.

Typische „Hürden“ oder „Barrieren“ sind niedrige pH- und a_w -Werte (erhöhter Säuregrad und weniger mikrobiell verfügbares Wasser). Unter diesen Bedingungen können viele Verderbniserreger nicht wachsen. Mikrobiologisch gefährdet sind vor allem Erzeugnisse, die nur wenige Barrieren enthalten. So können zum Beispiel Kochschinken- und Brühwurstaufschnitt in Vakuumverpackung (Abb. 1) trotz Pasteurisierung und Kühlung leicht verderben, da ihre pH- und a_w -Hürden mit pH 6,2 und a_w 0,98 nur wenig ausgeprägt sind. Obwohl sich fast alle Nahrungsmittel heute leicht durch chemische Zusatzstoffe oder eine ausreichende physikalische Behandlung mikrobiologisch stabilisieren lassen, steigt die Nachfrage nach „gesünderen“, das heißt naturbelassenen, chemiefreien, salz- und fettarmen Nahrungsmitteln mit geringer Verarbeitungstiefe. Solche Erzeugnisse sind jedoch mikrobiologisch hochgradig instabil. Sie müssen entweder relativ schnell zum Verzehr gelangen oder

geeignete „natürliche“ Barrieren gegen unerwünschte Mikroorganismen (Krankheits- und Verderbniserreger) enthalten. Am Institut für Mikrobiologie und Toxikologie der Bundesanstalt für Fleischforschung in Kulmbach erforschen wir solche „natürlichen“ Barrieren für die Biokonservierung von Fleisch und Fleischerzeugnissen.

STARTER- UND SCHUTZKULTUREN

Speziell selektierte Milchsäurebakterien werden seit Jahrzehnten als Starterkulturen zur Herstellung der unterschiedlichsten fermentierten Lebensmittel eingesetzt. Bei der Herstellung langgereifter Rohwürste (Salami; Abb. 2) liefern diese Bakterien aber nicht nur einen wesentlichen technologischen Beitrag im Sinne einer erwünschten Veränderung des Rohmaterials, sondern sie verhindern als „Schutzkulturen“ gleichzeitig die Vermehrung von unerwünschten Mikroorganismen und bewirken so eine natürliche Konservierung.

Milchsäurebakterien können aber auch zur hygienischen Stabilisierung, zum Beispiel von vakuumverpacktem Brühwurst- und Kochschinken-

Abb. 1:
Vakuumverpackter Brühwurst- und Kochschinken-





Abb. 2:
Aufschnitt-
platte mit
Rohwurst

schnitt eingesetzt werden. Die mikrobiologische Sicherheit und Stabilität dieser Erzeugnisse hängt wesentlich von der Art und Menge der bakteriellen Kontamination der Produkte während des Aufschneidens und Verpackens und von der Bevorratungstemperatur der verkaufsfertigen Erzeugnisse ab. In Abwesenheit einer mikrobiellen Konkurrenzflora, zum Beispiel aus Milchsäurebakterien, kann bei 7 °C die humanpathogene Bakterienart *Listeria monocytogenes* noch gut wachsen und gesundheitlich bedenkliche Keimzahlen von 10³–10⁵ Mikroorganismen pro Gramm Produkt erreichen.

Listeria monocytogenes ist in der Umwelt weit verbreitet und wurde in der Vergangenheit von vielen Lebensmitteln – auch von Fleisch und Fleischerzeugnissen – isoliert. In Frischfleisch wird dieses GRAM-positive, psychrotrophe (zum Wachstum bei Kühltemperaturen befähigte) Bakterium regelmäßig nachgewiesen. Der Keim wurde aber auch in fermentierten Rohwürsten gefunden. In fleischverarbeitenden Betrieben kann *L. monocytogenes* in Aufschneideräumen zur Herstellung von Aufschnittware vorkommen und pasteurisierte Fleischerzeugnisse während des Aufschneidens und Verpackens rekontaminieren. Erkrankungen des Menschen als Folge einer Infektion durch Listerien kommen vergleichsweise selten vor, sie dürfen aber aufgrund der häufig schweren Krankheitsverläufe (u. a. Hirnhautentzündung) nicht unterschätzt werden. Zu den von Milchsäurebakterien pro-

duzierten antagonistischen, das heißt andere Mikroorganismen hemmenden Substanzen gehören Milch- und Essigsäure, Kohlendioxid, Wasserstoffperoxid, Diacetyl und Bacteriocine. Für Fleisch und Fleischerzeugnisse ist die Milchsäure in dieser Beziehung am bedeutendsten, da sie mengenmäßig dominiert und die Vermehrung der meisten unerwünschten Mikroorganismen hemmt. Leider bleiben aber einige pathogene Bakterien, etwa Listerien, auch in Gegenwart von Milchsäure lange Zeit lebensfähig.

BACTERIOCINE

Bei der Suche nach weiteren nutzbaren antagonistischen Substanzen konzentrierten wir uns daher auf die sensorisch neutralen Bacteriocine. Dabei handelt es sich um eiweißartige Substanzen mit mehr oder weniger breiter Hemmwirkung gegen andere GRAM-positive Bakterien, die von manchen Milchsäurebakterien in das Außenmedium abgegeben werden. Einige dieser gesundheitlich unbedenklichen Bacteriocine sind hoch wirksam gegen Listerien.

Von den bei Fleisch und Fleischerzeugnissen „erwünschten“ Milchsäurebakterien sind die psychrotrophen Bakterien *Lactobacillus sakei* und *Lactobacillus curvatus* am besten an das Substrat Fleisch angepaßt (Abb. 3). Bestimmte Stämme dieser Arten produzieren Bacteriocine, die in der Lage sind, Listerien abzutöten bzw. deren Vermehrung zu hemmen. Einige dieser anti-listeriellen Bacteriocine, insbesondere Sakacin A und Sakacin P von *Lactobacillus sakei* Stamm Lb706 und Stamm Lb674 und Curvacin 1071 von *Lactobacillus curvatus* Stamm Lb1071, wurden von uns charakterisiert und in Fleischerzeugnissen getestet (Abb. 4).

Es handelt sich bei diesen Bacteriocinen um kleine, hitzestabile, ribosomal synthetisierte Peptide (= aus nur wenigen Aminosäuren bestehende „Mini-Eiweiße“), die nach Ab-

spaltung einer Präsequenz aus der Bakterienzelle ausgeschleust werden. Das Bacteriocin Sakacin P bleibt in Fleischsaft, Hackfleisch und Brühwurst biologisch aktiv und eignet sich daher auch als Zusatzstoff.

Das Gencluster für die Produktion des Sakacin P in *L. sakei* Lb674 wurde kloniert und sequenziert. Ein 7.600 Basenpaare großes chromosomales DNA-Fragment enthielt alle für die Expression von Sakacin P in Bacteriocin-negativen Stämmen von *L. sakei* erforderlichen Gene (Abb. 5). Das Gencluster umfaßt sechs aufeinanderfolgende Gene: *sppK*, *sppR*, *sppA*, *spiA*, *sppT* und *sppE*. Die beiden ersten Gene, *sppK* und *sppR*, sind für die Regulation der Bacteriocinproduktion von Bedeutung. Die Gene *sppA* und *spiA* kodieren ein Sakacin P Präprotein und ein Protein, das Immunität gegen Sakacin P verleiht. *SppT* und *SppE* zeigen starke Ähnlichkeiten mit den Transportproteinen anderer Bacteriocinsysteme.

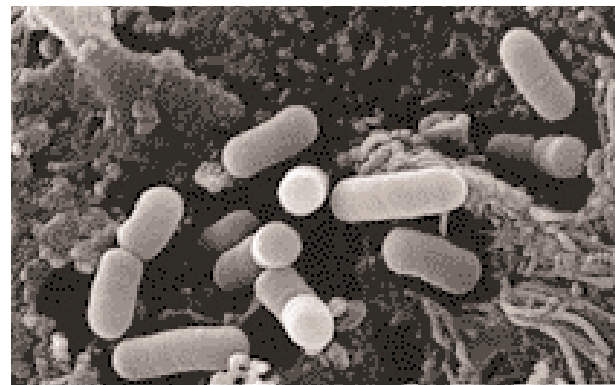


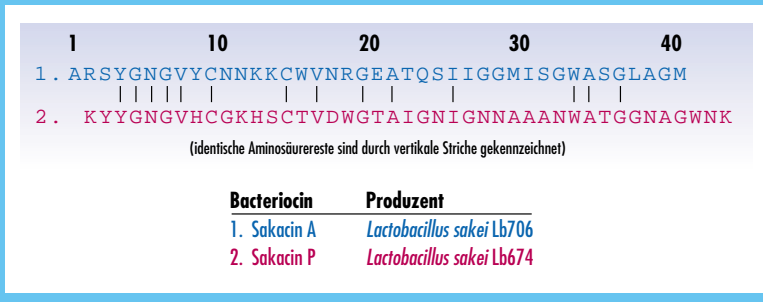
Abb. 3:
Laktobazillen
(Milchsäure-
Stäbchen) in
Salami unter
dem Elektro-
nenmikroskop

me. Diese Proteine dürften dafür zuständig sein, das Sakacin P aus der Zelle in das Außenmedium zu transportieren. Die Bacteriocinproduktion ist somit ein sehr komplexer Vorgang, der aufwendigen Regulations-, Prozessierungs- und Exportmechanismen unterliegt.

EINSATZPOTENTIALE

Für die Biokonservierung von Fleischerzeugnissen ist die Einführung einer konkurrenzstarken Milchsäure-

Abb. 4: Primärsequenz (Abfolge der Aminosäuren) von Sakacin A und P



bakterien-Mikroflora aus *L. sakei* oder *L. curvatus* – vorzugsweise mit der Fähigkeit zur Bacteriocinbildung – oder der direkte Einsatz von gereinigtem anti-listeriellen Bacteriocin als Lebensmittelzusatzstoff für kühlgelagerte, verzehrfertige Fleischerzeugnisse denkbar.

Neben den „nützlichen“ Lactobazillen können auch andere Milchsäurebakterien verpackten Kochschinken- und Brühwurstaufschnitt besiedeln. Sie sind meist unerwünscht, da sie zu einem vorzeitigen Verderb der Ware etwa durch Schleimbildung, einer zu starken Säuerung oder anderen Geschmacksabweichungen führen können.

Da eine keimfreie Aufschneidetechnik in der Praxis nicht möglich ist, gelangen regelmäßig verschiedene Mikroorganismen – harmlose, pathogene und verderbniserregende – auf die pasteurisierten Erzeugnisse. Bei 7°C und in Abwesenheit von Sauerstoff vermehren sich dann vor allem psychrotrophe Milchsäurebakterien und Listerien. Eine „gezielte“ Rekontamination mit sensorisch akzeptablen Milchsäurebakterien-Stämmen, die sowohl Listerien als auch unerwünschte Milchsäurebakterien in Schach halten, würde daher zu einer besseren mikrobiologischen Sicherheit und sensorischen Stabilität der Produkte beitragen und möglicherweise auch die Herstellung salz- und nitritreduzierter Ware erlauben. Bei der Herstellung von Rohwurst können Bacteriocinbildner gleichzeitig als Starter- und Schutzkultur von Nutzen sein.

VAKUUMVERPACKTER BRÜHWURSTAUFSCHNITT

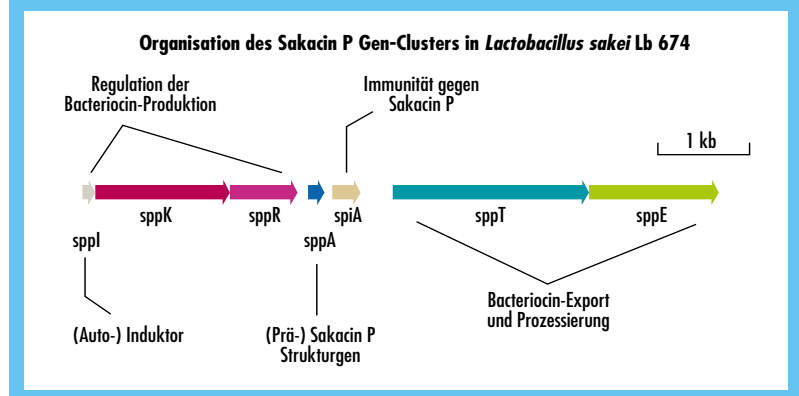
Während der Kühlung von vakuumverpacktem Brühwurstaufschnitt produzierte *L. sakei* Lb674 (Sakacin P) ab einer Einsaatdichte von 10^5 - 10^6 Bakterien/g Wurst ausreichende Konzentrationen von Bacteriocin. Das Wachstum von *Listeria monocytogenes* wurde verzögert und in einigen Fällen vollständig gehemmt (Abb. 6). Ähnliche Ergebnisse wurden mit *L. sakei* Lb706 (Sakacin A) erhalten. Bacteriocin-negative Varianten dieser Stämme oder andere aus Fleisch isolierte, Bacteriocin-negative Milchsäurebakterien verhinderten das Wachstum der Listerien nicht. Die Inokulation von Schutzkulturen in Anfangskeimzahlen von 10^5 - 10^6 /g führte erwartungsgemäß nach wenigen Tagen zu einer Keimzahl von circa 10^8 Milchsäurebakterien/g. Die damit einhergehende Milchsäureprodukti-

on und relativ geringe pH-Abnahme zeigten keine sensorisch nachteiligen Auswirkungen auf das Produkt.

Als Zusatzstoff zeigte gereinigtes Bacteriocin (Sakacin P) in Abwesenheit einer Schutzkultur einen deutlichen Anfangseffekt auf *L. monocytogenes* und reduzierte das Wachstum während der Lagerung (Abb. 7). Allerdings wurden die zu Beginn des Versuchs eingebrachten Listerien nicht völlig abgetötet. Nach einer vollständigen Wachstumshemmung in den ersten 3 Tagen konnten sich überlebende Listerien auch in Anwesenheit des Bacteriocins vermehren, aber mit deutlich geringerer Rate als in bacteriocinfreier Wurst. Wurden Sakacin P-haltige Produkte zusätzlich mit *L. sakei* Lb674 als Schutzkultur in niedrigen Anfangskeimzahlen (10^2 Bakterien/g) beimpft, so wurde die Vermehrung der Listerien noch stärker gehemmt (Abb. 7). Innerhalb weniger Tage erreichten die Milchsäurebakterien genügend hohe Zellzahlen, um den Bacteriocin-Effekt zu unterstützen. Im weiteren Verlauf hemmten sie die Listerien, die in Anwesenheit des Bacteriocins überlebten und vermehrungsfähig blieben.

Bacteriocinbildende Milchsäurebakterien können also das Wachstum von *Listeria monocytogenes* auf „sensiblen“ Fleischerzeugnissen verhindern, wenn sie als Schutzkulturen während des Aufschneidens in ausreichend hohen Keimzahlen zugegeben werden.

Abb. 5: Genkarte des Sakacin P Clusters



In der industriellen Praxis könnten zum Beispiel die Aufschneidemaschinen (Slicer) mit einer automatischen Sprühhvorrichtung für Schutzkulturen nachgerüstet werden.

Bacteriocin-negative Milchsäurebakterien sind unter gleichen Bedingungen deutlich weniger wirksam. Als Zusatzstoff zeigt Sakacin P zwar Wirkung, kann aber das Wachstum von *Listeria monocytogenes* nicht im erwünschten Umfang verhindern.

ROHWURST

Die Stämme *L. sakei* Lb674 und *L. curvatus* Lb1071 eignen sich auch als Starterkulturen für Salami. Beide Stämme führten bei 23 °C und den üblichen Einimpfmengen (10⁶ Bakterien/g) zu einer schnellen Umrötung und Säuerung der Produkte. Farbe und Bindung der Erzeugnisse waren ausgezeichnet. Geschmacklich waren die Würste gut und leicht säurebetont. Die Bacteriocinbildner blieben im gesamten Reifeverlauf dominant und zeigten auch sonst keine für die Rohwurstherstellung ungünstigen Eigenschaften.

Auch eine wesentlich geringere Einsaatdichte von 10³/g *L. sakei* Lb674 oder *L. curvatus* Lb1071 führte im Laufe der Reifung schon zu ähnlich positiven Ergebnissen. Die niedrigere Anfangskeimzahl der zugesetzten Milchsäurebakterien hatte eine langsamere Abnahme des pH-Wertes zur Folge. Dadurch wurde eine mildere Säuerung der Würste erreicht, die sensorisch häufig bevorzugt wird.

L. sakei Lb674 produzierte kaum Bacteriocin in Rohwurst, obwohl dieser Stamm sonst alle wichtigen Selektionskriterien für eine Starterkultur erfüllt. *L. curvatus* Lb1071 war dagegen in Rohwurst ein hervorragender Bacteriocinproduzent. *Listeria monocytogenes* konnte sich unter den gewählten Versuchsbedingungen in der Rohwurst nicht vermehren und nahm im Laufe der Reifung in allen Versuchschargen ab. Im Vergleich zu

einem kommerziellen *L. curvatus*-Starter bewirkte *L. curvatus* Lb1071 eine deutlich größere Reduktion der Listerien. (Abb. 8).

AUSBLICK

Milchsäurebakterien spielen bei der Herstellung von Rohwürsten eine große Rolle. Starterkulturen werden daher regelmäßig neu bewertet und neuen Anforderungen angepaßt. Die zunehmende Nachfrage nach schonend verarbeiteten, verzehrfertigen Convenience-Produkten, die durch Kühlung alleine nicht ausreichend hygienisch stabilisiert werden können, eröffnet zusätzliche Einsatzmöglichkeiten für diese Bakterien als Schutzkulturen. Ziel unserer Arbeiten ist es, unter den vielen natürlich vorkommenden Milchsäurebakterien diejenigen zu finden, die über eine möglichst optimale Kombination erwünschter Eigenschaften verfügen, diese Bakterien möglichst genau zu charakterisieren und die Eignung dieser Kulturen für traditionelle und neue Anwendungsfelder zu demonstrieren.

Schutzkulturen mit der Fähigkeit zur Bacteriocinbildung bieten neue Möglichkeiten zur Verbesserung der Sicherheit und Haltbarkeit konventioneller Fleischerzeugnisse. Mit ihrer Hilfe könnten neue Produkte entwickelt werden, die milder und aufgrund einer effektiven Unterdrückung der Begleitflora „reiner“ im Geschmack sind.

Die meisten anti-listeriellen Bacteriocine weisen in ihrem N-terminalen Bereich die Aminosäure-Sequenz 'YGNNGV' auf (vgl. Abb. 1). Die Rolle weiterer Sequenzelemente ist noch nicht ausreichend bekannt, so daß die Suche nach weiteren natürlichen – möglicherweise besseren – Varianten interessant bleibt.

Dr. Lothar Kröckel, Bundesanstalt für Fleischforschung, Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, E.-C.-Bauermann-Str. 20, 95326 Kulmbach

Abb. 6: Vakuumverpackter Brühwurstaufschnitt (1)

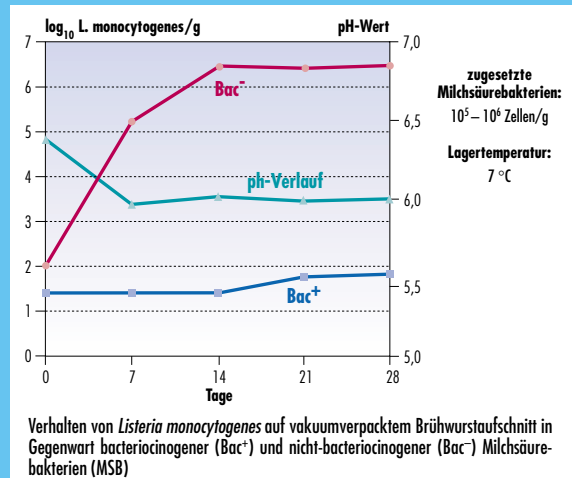


Abb. 7: Vakuumverpackter Brühwurstaufschnitt (2)

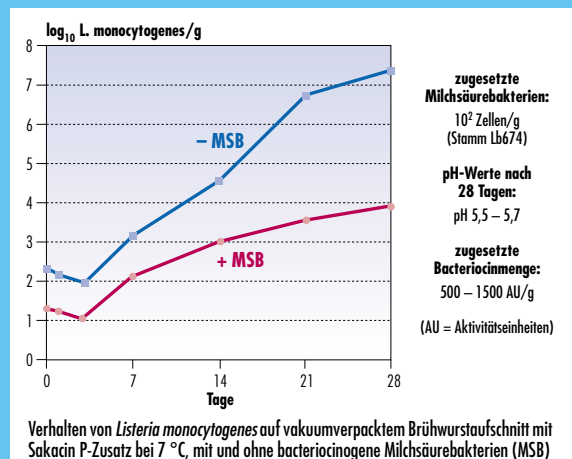


Abb. 8: Reifung von Salami

