

Rindfleischreifung unter Einsatz von Starterkulturen Beef maturation using starter cultures

L. KRÖCKEL

Zusammenfassung. Rindersteaks sollten im Idealfall zart, saftig und aromatisch sein. Durch eine ausreichende und geeignete Reifung des Fleisches lässt sich die gewünschte Qualität in gewissen Grenzen beeinflussen. Sogenannte Trocken- (unverpackt) und Nass- (im Reifebeutel) Reifeverfahren sind seit langem Stand der Technik. Welchen Beitrag Starter- und Schutzkulturen hierbei leisten können, ist dagegen noch relativ wenig bekannt. Solche Kulturen sollten die mikrobiologische Sicherheit und Qualität des Ausgangsmaterials erhalten bzw. verbessern sowie sensorisch erwünschte Veränderungen erzielen. Zur Verbesserung der Datenlage wurden in der vorliegenden Studie 5 unabhängige Reifeversuche durchgeführt. Färsenfleisch (Roastbeef) der Rasse Fleckvieh wurde zum einen im Vakuumbbeutel in Gegenwart zugesetzter Milchsäurebakterienkulturen (MSB) sowie unverpackt am Knochen hängend mit und ohne Edelschimmel bei 1 ± 1 °C und 82-90 % r.F. bis zu 42 Tage gereift. Zusätzlich wurde die antagonistische Wirkung der MSB gegen Listerien im Reifebeutel untersucht. Die klassische Trockenreifung verhinderte erwartungsgemäß eine übermäßige Vermehrung der nativen Oberflächenmikroflora. Bei der Trockenreifung mit Edelschimmel wurde ein zusammenhängender, ansprechender weißer Pilzmantel erhalten, und das Aufwachsen von Wildschimmeln wurde weitestgehend unterdrückt. Beide Verfahren lieferten sensorisch hervorragende Ergebnisse. Während der Reifung im Vakuumbbeutel wurden die eingepflichten Listerien in Anwesenheit zugesetzter MSB um eine Zehnerpotenz reduziert. Von den indigenen MSB erreichten in Abwesenheit der Schutzkulturen die Spezies *Leuconostoc (Leuc.) mesenteroides* ssp. *mesenteroides* und *Leuc. gelidum*, *Carnobacterium (Cb.) maltaromaticum* und *Lactobacillus (Lb.) sakei* sowie *Cb. divergens* höhere Keimzahlen (10^4 - 10^6 KBE/g). Im Grillversuch wurden die Versuchschargen mit MSB-Startern als „sensorisch zufriedenstellend“ bis „gut“ bewertet.

Summary. Ideally, beef steaks should be tender, juicy and tasty. The desired quality can be controlled to some extent by subjecting the meat to a sufficient and suitable aging process. So-called dry-aging (not packaged) and wet-aging (vacuum packaged) processes are state of the art since years. What kind of contribution, if any, starter and protective cultures can make to these processes is still relatively unknown. Such cultures should preserve or improve the microbiological safety and quality of the starting material and, if possible, provide a sensorily desired transformation. To obtain some answers to these questions, five independent aging trials were performed. Roast beef (*M. long. dorsi*) from heifers of Simmental breed was aged up to 42 days (i) in vacuum bags in the presence of added lactic acid bacteria (LAB) cultures and, in parallel, (ii) dry aged, suspended on the bone with or without added 'noble' mold culture. Temperature and relative humidity were maintained at 1 ± 1 °C and 82-90 %, respectively. In addition, the antagonistic action of added LAB towards listeria was studied in the vacuum bags. As expected, the traditional dry-aging process prevented an excessive proliferation of the native meat-surface microflora. Dry-aging with added 'noble' mold culture provided a uniform and appealing white fungal coating, and the outgrowth of 'wild' molds was largely suppressed. Both technologies provided excellent sensory results. During wet aging added LAB provided a tenfold reduction of inoculated listeria. In the absence of a protective LAB culture higher numbers of indigenous LAB (10^4 - 10^6 cfu/g) were attained by the species *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* and *Leuc. gelidum*, *Carnobacterium maltaromaticum* and *Lb. sakei* as well as *Cb. divergens*. Upon barbecueing, the steaks aged in the presence of a LAB culture delivered a score ranging from 'satisfactory' to 'good'.

Schlüsselwörter Rindfleischreifung – Starterkulturen – Listerien – Sensorik

Key Words beef aging – starter cultures – listeria – sensory aspects

Einleitung

Die Reifung ist eine lange etablierte Methode zur Verbesserung von Zartheit, Aroma und Gesamtakzeptanz von Rindfleisch. Üblicherweise wird bei möglichst niedrigen Kühltemperaturen gereift, bei längerer Reifung idealerweise bei $-0,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, um eine übermäßige Vermehrung der indigenen Fleischmikroflora zu verhindern. Bei kürzeren Reifezeiten von 1 bis 2 Wochen werden $2\text{ bis }3\text{ °C}$ als akzeptabel angesehen (ANONYM, 2010; PARRISH, 2012). Zu den Mikroorganismen, die unter diesen Bedingungen auf Fleisch wachsen können, gehören u. a. einige fleischassoziierte psychrotrophe Milchsäurebakterien (MSB), *Brochothrix thermosphacta*, psychrotrophe *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Listeria monocytogenes*, *Yersinia* spp., psychrophile *Clostridium* spp. wie *Cl. estertheticum* sowie Hefen (*Candida*, *Rhodotorula*) und Schimmelpilze (*Thamnidium*, *Mucor*) (SCHILLINGER und LÜCKE, 1987; KAJA und SCHMIDT, 1991; COLLINS *et al.*, 1992; DILLON, 1998; STANBRIDGE und DAVIES, 1998; KOTULA and KOTULA, 2000). Welche Mikroorganismen sich durchsetzen, hängt von der generellen Fleischbeschaffenheit und der Art der Lagerung ab. So vermehren sich etwa Listerien auf Fleisch mit normalem pH-Wert, d. h. $\text{pH} < 5,8$, bei 2 °C nicht. Pseudomonaden wachsen vor allem unter aeroben Bedingungen auf feuchten Fleischoberflächen („Kühlhaus-Flora“). Schimmel bildet sich vorzugsweise auf trockenem Fleisch mit saurem pH-Wert. Die weißen Myzelien von *Thamnidium* (*Th.*) auf „trocken gereiftem“ Rindfleisch (*'dry-aged beef'*) werden in bestimmten Kreisen als erwünscht angesehen, da Rindfleisch, das 2-4 Wochen bei 4 °C gereift wird, ein besonderes, „nussiges“ Aroma aufweist, sehr zart ist und von manchen Konsumenten bevorzugt wird. *Th. elegans* ist ein psychrophiler Schimmel, der auf kühl gelagertem Fleisch bei 1 °C einen dichten Bewuchs mit ausgeprägtem Luftmyzel („Bart“) ausbilden kann. Über eine Bildung von Mykotoxinen wurde bei diesem Pilz bislang nicht berichtet (BROOKS und HANSFORD, 1923; GLEASON, 1971; zit. in PITT und HOCKING, 2009; KOTULA und KOTULA, 2000). Als dominante MSB in

Reifebeutelfleisch (*'wet-aged beef'*) wurden *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Cb. divergens*, *Cb. maltaromaticum*, *Leuconostoc* spp. und *Lactococcus raffinolactis* identifiziert (SCHILLINGER und LÜCKE, 1987). Fleisch mit normalem pH-Wert ($5,4\text{-}5,7$) eignet sich auch unter biochemischen Gesichtspunkten besser für die Reifung als Fleisch mit einem mittleren pH-Wert ($5,8\text{-}6,1$) (ANONYM, 2010). Eine Rindfleischreifung unter Einsatz von Starterkulturen (Milchsäurebakterien, Edelschimmel) kann dazu dienen, die mikrobiologische Sicherheit und Qualität des Ausgangsmaterials zu erhalten bzw. zu verbessern sowie sensorisch erwünschte Veränderungen zu erzielen. Der Einsatz von Milchsäurebakterien (MSB) bei der Reifung von Rindfleisch im Vakuumbbeutel wurde erstmals von SCHILLINGER und LÜCKE (1987) erprobt. Bei 2 °C setzten sich Stämme der Arten *Lactobacillus sakei* und *Lactococcus raffinolactis* am besten durch. Obwohl die Trockenreifung mit ‚Naturschimmel‘ als Nischentechnologie erfolgreich praktiziert wird, fehlt es bisher an Veröffentlichungen zur Trockenreifung mit Edelschimmel/Kulturschimmel. Letzterer könnte die Akzeptanz für diese Technologie auch einem breiteren Publikum erschließen. Eine kleine Schweizer Firma hat diese Idee bereits in die Tat umgesetzt (ANONYM, 2012). Für die traditionelle Trockenreifung wurde eine Lufttemperatur von $-0,5\text{ bis }1,0\text{ °C}$ (bei Reifezeiten >3 Wochen $< 0\text{ °C}$), eine relative Feuchte von $75\text{ bis }80\%$ und eine konstante niedrige Luftgeschwindigkeit von $0,2\text{ bis }0,5\text{ m/s}$ empfohlen (ANONYM, 2010).

Anlässlich der 1st International Summer School des Internationalen Kompetenzzentrums für Fleischqualität am MRI Standort Kulmbach in 2011 wurde der Gedanke der Reifung mit Starter- bzw. Schutzkulturen wieder aufgegriffen. Dabei wurde zum einen die Trockenreifung, mit und ohne Kulturschimmel, und zum anderen die Reifung im Vakuumbbeutel (Nassreifung), mit und ohne zugesetzte MSB und/oder Listerien, mikrobiologisch und sensorisch verfolgt. Insgesamt wurden fünf unabhängige Reifeversuche (V1-V5) durchgeführt.

Material und Methoden

Herkunft, Behandlung und Lagerung des Fleisches

Durchgekühltes Rindfleisch (*M. long. dorsi*) von Färsen der Rasse Fleckvieh wurde 2 Tage nach dem Schlachten von einem lokalen Schlachthof bezogen. Der pH-Wert des Fleisches lag in allen 5 Versuchen bei $\text{pH} = 5,5 \pm 0,1$. Von den beiden Roastbeef-Strängen eines Tieres wurde jeweils die rechte Hälfte für die Trockenreifung (am Knochen, hängend; 1 °C und 82-90 % r.F.) verwendet.

Der *median-cranial*-Teil wurde vor der Reifung in eine Sporensuspension eines Kulturschimmels (*Penicillium nalgiovense*) getaucht, der *median-caudal*-Teil wurde unbehandelt gelagert. Das linke Roastbeef wurde entbeint, und für die Nassreifung wurden 2,5 cm starke Scheiben ($n=26$, à 160-200 g) geschnitten. Von den ersten beiden Scheiben *caudal* wurden die mikrobiologischen Ausgangsparameter ermittelt. Die Scheiben S3-10 (ohne MSB-Zusatz) und 11-18 (mit MSB-Zusatz) wurden alternierend für Sensorik und Instron-Messung verwendet (LAUTENSCHLÄGER, 2012). Die Scheiben S19-26 wurden für mikrobiologische Analysen reserviert: (a) Scheiben S19-20 nicht inokulierte Kontrollen, (b) S21-22 mit MSB, (c) S23-24 mit Listerien, (d) S25-26 mit MSB und Liste-

rien (je eine halbe Scheibe für die Analyse an Tag 1, 14, 28 und 42 der Lagerung).

Die Inokulation erfolgte durch Tauchen der Fleisch-Scheiben in geeignete Keimsuspensionen. Unbeimpfte Kontrollen wurden in 0,9 % NaCl getaucht (SCHILLINGER und LÜCKE, 1987). Als Verpackungsmaterial wurden in Versuch 1-3 kostengünstige PA/PE-Beutel (90 μm , 20/70, O₂-Durchlässigkeit: 50 ml O₂/m²/Tag) verwendet, in Versuch 4-5 O₂-undurchlässige, Aluminium kaschierte Folienbeutel.

Als MSB-Kulturen wurden die bacteriocinogene Schutzkultur *Lb. curvatus* B-LC-48TM in V1, eine Mischkultur aus *Lb. sakei* B-2 SafeProTM (Bac-), *Lb. sakei* Lb706 (SakA+) und *Lb. sakei* Lb674 (SakP+) in V2, eine Mischkultur aus *Lb. sakei* B-2 SafeProTM und *Lb. sakei* Lb706 in V3-V4 und *Lb. sakei* B-2 SafeProTM in V5 ausgewählt. Die lyophilisierten kommerziellen Kulturen wurden praxisnah, zumeist ohne weiteren Kultivierungsschritt, direkt in Tauchlösung resuspendiert. Außer B-2 SafeProTM produzierten alle MSB-Kulturen anti-listerielle Bacteriocine, deren relative Aktivität *in vitro* in der Reihenfolge Lb706, LB674, B-LC-48TM zunahm. Als Surrogat für *Listeria monocytogenes* wurde ein Pool aus drei verschiedenen *Listeria innocua* Stämmen (Li1, Nr. 94, DSM 20649) eingesetzt. Alle Listerien des Pools wurden im

Tab. 1: Verwendete Starter-/Schutzkulturen und Listerien

Mikroorganismen	Quelle	relevante Merkmale	Herkunft
<i>Lactobacillus curvatus</i> B-LC-48 TM		Bac+; Per ((+))	Chr. Hansen
<i>Lactobacillus sakei</i> B-2 SafePro TM		TRE+, XYL+; Bac-; Per (+)	Chr. Hansen
Lb706	VP_Schwein	TRE+, XYL-; SakA+; Per (+)	
Lb674	VP_Lamm	TRE-, XYL-; SakP+; Per +	
<i>Penicillium nalgiovense</i> Mold-600 TM			Chr. Hansen
<i>Listeria innocua</i> Li1		Bac_sens +	
Nr. 94	VP_Rohschinken	Bac_sens +++	MRI Kulmbach
DSM 20649		Bac_sens ++	DSMZ

TRE, Trehalose; XYL, Xylose; Bac, Bacteriocin; SakA, Sakacin A; SakP, Sakacin P; Per, Peroxidbildung; Bac_sens, Sensitivität gegen Bacteriocin; VP, vorverpackt; +, positive Reaktion; -, negative Reaktion

Agar-Diffusionstest von den Bacteriocinen der Bac-positiven MSB gehemmt, wobei die größte Sensitivität bei Stamm Nr. 94 vorlag (Tab. 1).

Mikrobiologische Untersuchungen

Potentielle MSB-Starter wurden auf Peroxidbildung getestet (KRÖCKEL, 2011a); nur MSB ohne bzw. mit schwacher Peroxidbildung wurden ausgewählt. Die biochemische Differenzierung der *Lb. sakei* Stämme B-2 SafePro™, Lb706 und Lb674 aus den Reifebeutel-Versuchen V2-4 erfolgte durch Prüfung mehrerer Isolate geeigneter Verdünnungen von MRS-Agar auf Fermentation von Trehalose und Xylose in Mikrotiterplatten (KRÖCKEL, 2008).

Keimzahlbestimmungen erfolgten nach Standardmethoden in Anlehnung an § 64 LFGB. Als Nährböden zur Erfassung der Lebendkeimzahlen von aeroben mesophilen Keimen, MSB, Listerien, Pseudomonaden/*Enterobacteriaceae* und Hefen wurden Standard-I (30 °C), MRSpH6.5 (25 °C), Palcam (37 °C), VRBG (30 °C, aerob/anaerob) und MEA+ (25 °C) eingesetzt (KRÖCKEL, 2008, 2009, 2011b).

Die Identifizierung von Bakterien erfolgte mittels polyphasischer Methoden mittels vergleichender Phänotypisierung (morphologisch, biochemisch), vergleichender Genotypisierung (BOX-PCR, Sequenzierung) und spezifischer PCR (WIDMER *et al.*, 1998; SCARPELLINI *et al.*, 2004; KRÖCKEL, 2008, 2009, 2011b; MARCHAND *et al.*, 2009; ERCOLINI *et al.*, 2010; DE JONGHE *et al.*, 2011). Schimmelpilze wurden phänotypisch (Konidienmorphologie) identifiziert (PITT und HOCKING, 2009).

Sensorische und chemisch-physikalische Untersuchungen

Eine ausführliche Darstellung der Methoden findet sich an anderer Stelle (LAUTENSCHLÄGER, 2012). Die Messung des pH-Wertes an Fleisch-Scheiben erfolgte elektrochemisch mittels Einstichelektrode. Der Oberflächen-pH-Wert bei trocken gereiftem Fleisch wurde im Homogenisat von Fleischabschnitten gemessen (1:10 verdünnt in 0,9 % NaCl).

Ergebnisse

Während der Reifung im Vakuumbbeutel nahmen die eingepfropften Listerien in Abwesenheit zugesetzter MSB um etwa 1-2 Zehnerpotenzen ab, in Gegenwart geeigneter MSB noch um eine zusätzliche Größenordnung (Abb. 1). Der kommerzielle B-2 SafePro™-Starter erwies sich hier als weniger effektiv. In den O₂-durchlässigen Reifebeuteln kam es in zwei von drei Fällen auch in Gegenwart der Schutzkulturen zu einer signifikanten Vermehrung von Pseudomonaden (vor allem *Ps. fluorescens* und *Ps. lundensis*) und Hefen mit Keimzahlen von 10⁴-10⁶ KBE/g (Abb. 2, Abb. 3). In den Aluminium kaschierten Folienbeuteln erfolgte keine Vermehrung dieser Keimgruppen. Von den indigenen MSB erreichten in Abwesenheit der Schutzkulturen die Spezies *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* und *Leuc. gelidum*, *Carnobacterium maltaromaticum* und *Lb. sakei* sowie *Cb. divergens* höhere Keimzahlen (10⁴-10⁶ KBE/g). Im Gegensatz zu *Lb. curvatus* B-LC-48™ vermehrten sich alle *Lb. sakei* Starter auf Keimzahlen von 10⁷-10⁸ KBE/g. Der Bacteriocin-negative *Lb. sakei* Stamm B-2 SafePro™ wurde von den beiden Sakacinbildnern in den Versuchen V2-4 nicht gehemmt und erwies sich sogar etwas konkurrenzstärker als der Sakacin A-Bildner Lb706. Der Sakacin P-Bildner Lb674 erreichte in Versuch V2 ebenfalls höhere Keimzahlen als der Sakacin A-Bildner Lb706. Während sich der pH-Wert der Fleisch-Scheiben während der Lagerung nicht wesentlich änderte, nahm der pH-Wert in der Peripherie (Fleischsaft) in Gegenwart aktiver MSB-Kulturen von pH 5,5 auf Werte von pH 5,2-5,3 ab. Im Grillversuch wurden die Versuchschargen mit MSB-Startern als sensorisch zufriedenstellend bis gut bewertet (LAUTENSCHLÄGER, 2012). Sensorische Unterschiede zu den Kontrollchargen ohne Starterkulturen waren nicht erkennbar.

Die klassische Trockenreifung verhinderte erwartungsgemäß eine übermäßige Vermehrung der nativen Oberflächenmikroflora. Nach 6 Wochen enthielt die Fleischoberfläche 10⁴-10⁶ Pseudomonaden/cm² (*Ps. fragi*) und 10²-10⁴ Hefen/cm² (Abb. 4).

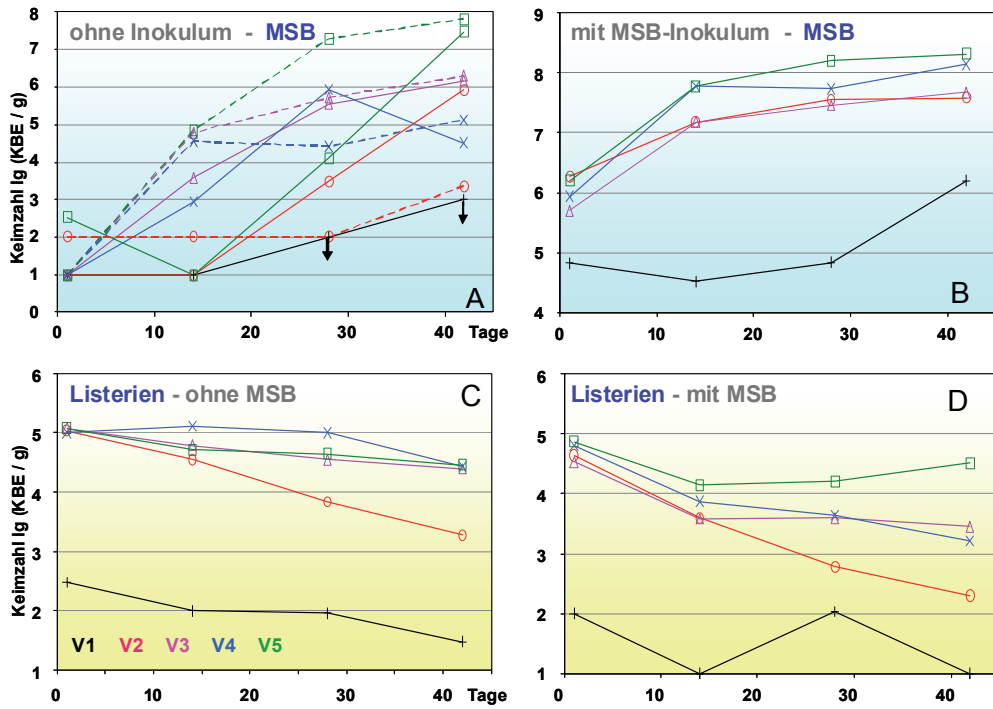


Abb. 1: Entwicklung der Keimzahlen der Milchsäurebakterien (MSB) und Listerien in den verschiedenen Chargen der Reifebeutel-Versuche V1 bis V5. A, native MSB in der unbeimpften Kontrolle (durchgezogene Linien) und in der nur mit Listerien inokulierten Charge C (unterbrochene Linien); B, MSB-Keimzahlen in der nur mit Starterkulturen inokulierten Charge; C, Listerien-Keimzahlen in der nur mit Listerien inokulierten Charge; D, Listerien-Keimzahlen in der mit Listerien und Starterkulturen inokulierten Charge. V1, +; V2, o; V3, Δ; V4, x; V5, □

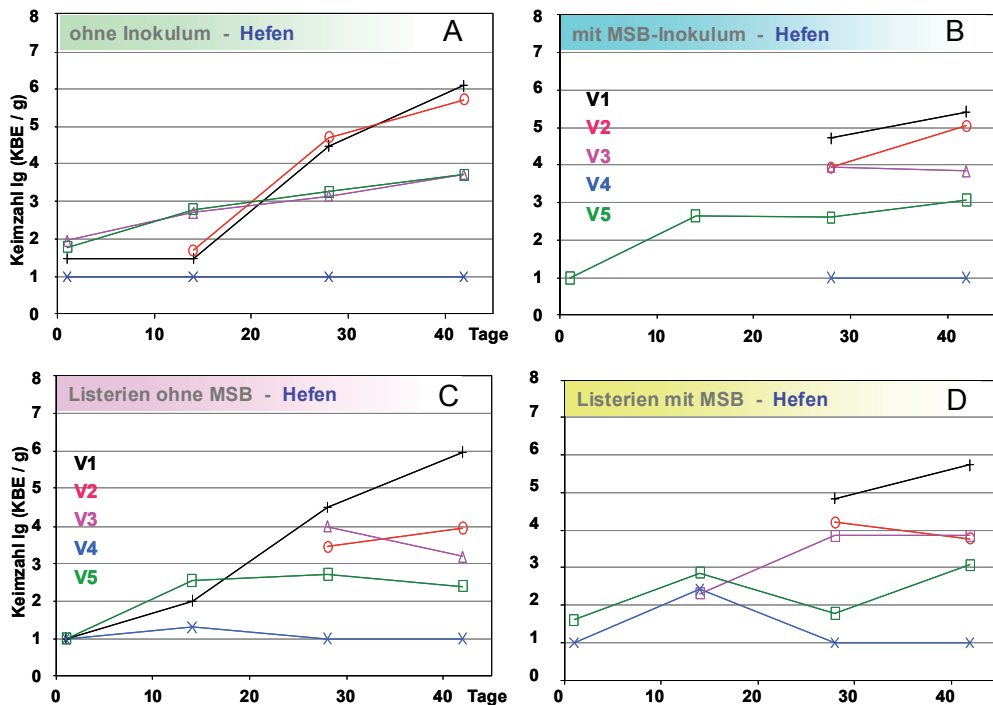


Abb. 2: Entwicklung der Keimzahlen der Hefen in den verschiedenen Chargen der Reifebeutel-Versuche V1 bis V5. A, unbeimpfte Kontrolle; B, nur mit Starterkulturen inokulierte Charge; C, nur mit Listerien inokulierte Charge; D, mit Listerien und Starterkulturen inokulierte Charge

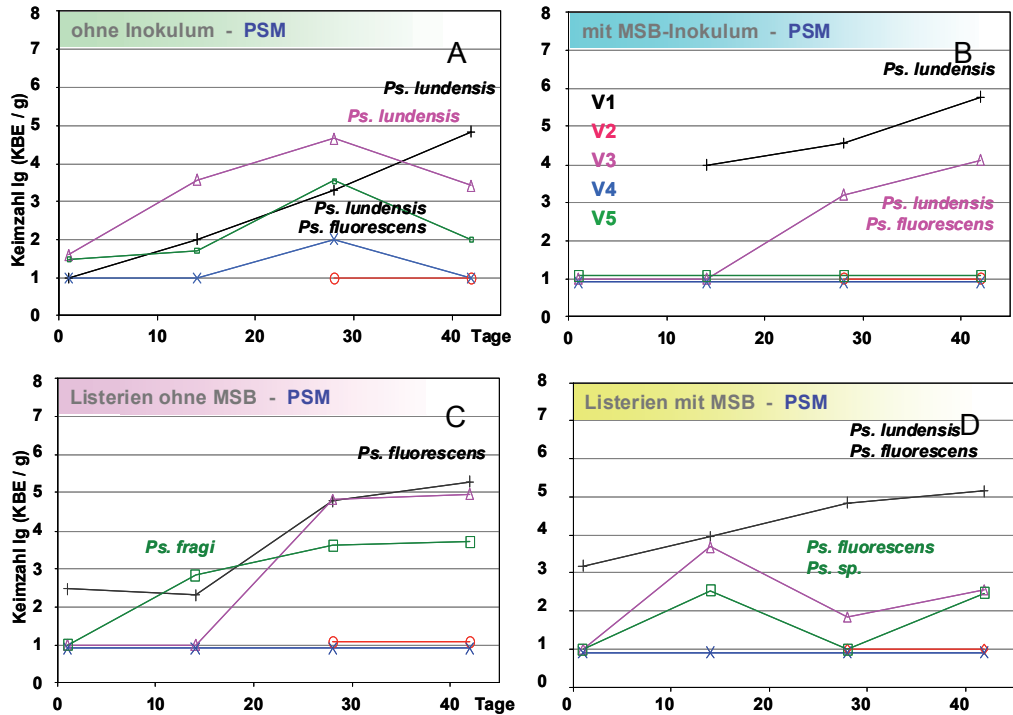


Abb. 3: Entwicklung der Keimzahlen der Pseudomonaden in den verschiedenen Chargen der Reifebeutel-Versuche V1 bis V5. A, unbeimpfte Kontrolle; B, mit Starterkulturen inokulierte Charge; C, mit>Listerien inokulierte Charge; D, mit>Listerien und Starterkulturen inokulierte Charge

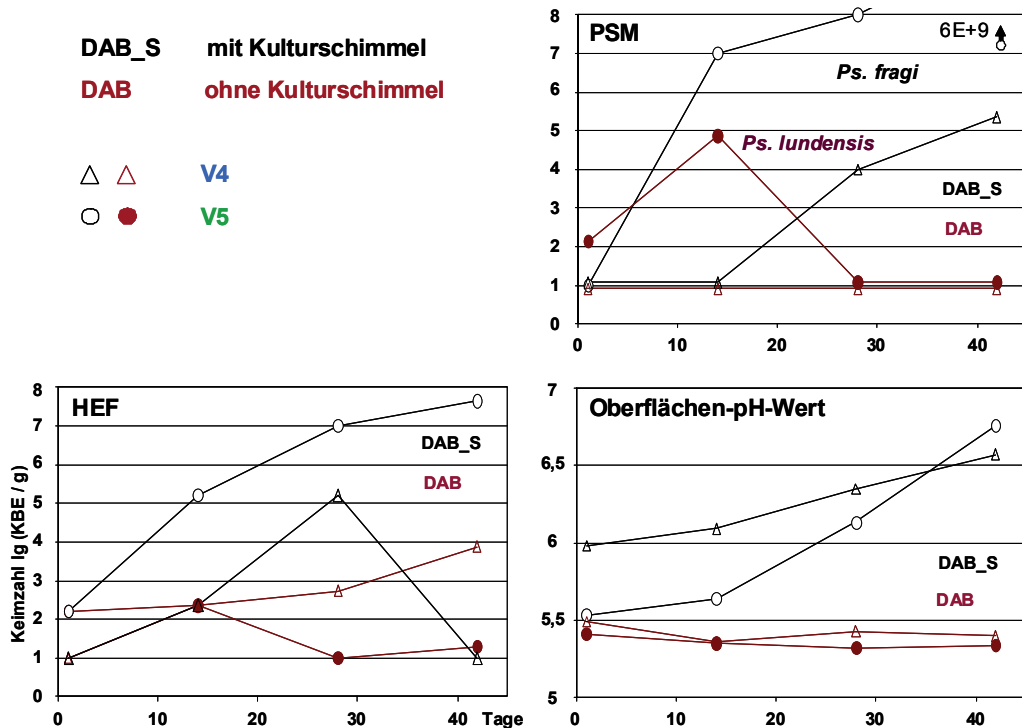


Abb. 4: Entwicklung der Keimzahlen der Pseudomonaden (PSM) und Hefen (HEF) sowie des Oberflächen-pH-Wertes bei Trockenreifung mit und ohne Edelschimmel in den Reifebeutel-Versuchen V4 und V5

Die Keimzahlen anderer Keimgruppen bewegten sich im Bereich der Nachweisgrenze ($\leq 10^2$ KBE/cm²). Bei der Trockenreifung mit Edelschimmel wurde ein Aufwachsen von Wildschimmeln weitestgehend unterdrückt. Nach 4-5 Wochen Reifung bildete der Starterschimmel ein ansprechendes weißes und zusammenhängendes Myzel. Die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Bakterienflora nach 6 Wochen war meist ähnlich wie bei der Trockenreifung ohne Schimmel. In einem Fall erreichte die Keimzahl der Hefen und Pseudomonaden Werte $> 10^7$ bzw. $> 10^9$ KBE/cm² (Abb. 4). Der Oberflächen-pH-Wert stieg während der Reifung um eine Einheit an (Abb. 4). Beide Verfahren, klassische Trockenreifung und Trockenreifung mit Edelschimmel, lieferten sensorisch hervorragende Ergebnisse. Sensorische Unterschiede zwischen Trockenreifung mit und ohne Edelschimmel waren nicht erkennbar. Eine detailliertere Betrachtung der sensorischen Ergebnisse bei den verschiedenen Reifeverfahren findet sich an anderer Stelle (LAUTENSCHLÄGER, 2012).

Diskussion

Ausgewählte MSB wurden erstmals vor 25 Jahren bei Rindfleisch im Reifebeutel als Schutzkulturen gegen Fleischverderber eingesetzt (SCHILLINGER und LÜCKE, 1987). Die Autoren fanden damals keinen offensichtlichen Einfluss der Zusammensetzung der MSB-Flora auf die Haltbarkeit von bei 2 °C gereiftem Rindfleisch. Erste Veränderungen in Aroma und Farbe wurden nach 30 Tagen bei 2 °C wahrgenommen. Die aktuellen sensorischen Ergebnisse mit Färsenfleisch zeigen, dass selbst nach 42 Tagen im Reifebeutel in Gegenwart geeigneter MSB-Starter-/Schutzkulturen zufriedenstellende bis gute sensorische Ergebnisse erhalten werden.

Listerien vermehren sich bei Rindfleisch mit normalem pH-Wert (pH < 5,8) nicht. Bei Rindfleisch mit DFD-Charakter pH > 6,0 wurde bei 2 und 4 °C dagegen eine Zunahme um den Faktor 10 innerhalb einer Woche beobachtet (KAYA und SCHMIDT, 1991). Auch in den aktuellen

Versuchen erfolgte auf Grund des niedrigen Fleisch-pH-Wertes kein Wachstum der eingepflichten Listerien, sondern vielmehr eine Abnahme der Listerien-Keimzahlen. Wie die vorliegende Studie zeigte, können geeignete MSB-Kulturen zu einer weiteren Reduktion beitragen. Bacteriocin bildende Stämme von *Lb. sakei* (V2-4 in Abb. 1) sind hierbei deutlich effektiver als Bacteriocin-negative Stämme (V5 in Abb. 1). Die in V1 eingesetzte bacteriocinogene *Lb. curvatus* Kultur erwies sich auf Grund ihres höheren Temperaturminimums (≥ 2 °C) und dadurch stark eingeschränkten Wachstums bei 1 ± 1 °C weniger gut als Reifebeutel-Starter geeignet. *Lb. sakei* Schutzkulturen wurden auch in Neuseeland mit Erfolg bei vakuumverpacktem Lamm- und Rindfleisch gegen *Li. monocytogenes*, *Cl. estertheticum* und *Campylobacter jejuni* eingesetzt (JONES *et al.*, 2009). Aber auch *Lb. curvatus* Kulturen können als Reifekulturen interessant sein. Der Bacteriocinbildner *Lb. curvatus* CRL705 wurde als Schutzkultur bei verpacktem argentinischem Rindfleisch mit einer Keimzahl von 10^6 KBE/g inokuliert und bei 2 °C über 60 Tage getestet. Der Keim blieb während der gesamten Lagerung dominant und hielt *Brochothrix* und unerwünschte indigene Fleisch-MSB in Schach. Die strukturelle Desintegration des Muskelgewebes wurde in Gegenwart der Schutzkultur deutlich verzögert. Sensorisch machte sich die Schutzkultur nach 60 Tagen lediglich durch eine „saure“ Geschmacksabweichung (keine unerwünschte Geruchsabweichung) bemerkbar. Der Stamm CRL705 eignet sich nach Auffassung der Autoren als zusätzliche Hürde zur Verlängerung der Haltbarkeit von vakuumverpacktem Rindfleisch (CASTELLANO *et al.*, 2010).

In den Fällen, in welchen sich die MSB-Starter durchsetzten (V2-V5), erreichten die fleischeigenen MSB keine relevanten Keimzahlen. Der günstige Ausgangs-pH-Wert des Färsenfleisches (pH = $5,5 \pm 0,1$) erklärt das fehlende Wachstum der inokulierten Listerien sowie anderer neutrophiler Bakteriengruppen wie *Brochothrix thermosphacta* (wächst nicht bei pH < 5,8). Fleisch assoziierte Pseudomonaden können allerdings auch unter diesen Bedin-

gungen in O₂-durchlässigen Vakuumbeuteln wachsen (Abb. 3). Aktive MSB-Kulturen sorgen dafür, dass der pH-Wert in der Peripherie der Fleisch-Scheiben weiter reduziert wird, so dass unter diesen Bedingungen eine gewisse Hemmung der Pseudomonaden erfolgt (vgl. V3 in Abb. 3). Es wurde aber auch deutlich, dass selbst aktive MSB-Starter-/Schutzkulturen eine Vermehrung von Hefen und Pseudomonaden in O₂-durchlässigen Vakuumbeuteln nicht völlig unterdrücken können.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass gut charakterisierte und gut ausgewählte *Lb. sakei* Stämme als Schutzkulturen für künftige Applikationen bei der Nassreifung von Rindfleisch von Interesse sein könnten. Sie liefern einen Beitrag zur mikrobiologischen Sicherheit und halten unerwünschte Verderbniserreger in Schach. Hohe mikrobielle Ausgangskontaminationen können allerdings auch durch Schutzkulturen nicht mehr bzw. nur begrenzt rückgängig gemacht werden, wie hier in den Chargen mit Listerien und MSB-Starter-/Schutzkulturen zu sehen war.

Die klassische Trockenreifung verhindert bei fachkundiger Durchführung eine übermäßige Vermehrung fleischeigener Mikroorganismen, die sich auf Hefen und Pseudomonaden beschränkt, nimmt dafür aber Gewichtsverluste von bis zu 20 % in Kauf (LAUTENSCHLÄGER, 2012). Die Oberflächenanwendung einer geeigneten Schimmelpilzkultur bei der Trockenreifung von Rindfleisch könnte ähnliche Vorteile wie bei schimmelgereifter Salami liefern, das heißt neben einer ästhetischen Komponente einen Schutz der Fleischoberfläche vor unerwünschten Schimmelpilzen und vor Sauerstoff. Die normalerweise für schimmelgereifte Salami verwendete Oberflächenkultur *Penicillium nalgiovense* mold-600™ liefert unter den gewählten Bedingungen optisch ein ansprechendes Ergebnis, allerdings frühestens 4 Wochen nach Inokulation mit der Sporensuspension. Interessant wäre hier eine entsprechende Kultur, die bereits nach 2-3 Wochen zu dem gewünschten Schimmelbelag führt.

Für die unterschiedliche sensorische Wahrnehmung von trocken und nass gereiftem Rindfleisch wurden in der Literatur die technologisch bedingten Unterschiede in der Entwicklung des Fleischmetaboloms verantwortlich gemacht. Bei der Untersuchung flüchtiger Verbindungen fand man bei trocken gereiftem Rindfleisch deutlich mehr Heptan, das durch Autoxidation aus Ölsäure, einer Hauptfettsäure im Rindermuskel, entstehen kann. Auch der Anteil an Estern und sonstigen Verbindungen war höher. Bei Reifebeutelfleisch dominierten dagegen die Säuren (ANONYM, 2010; SAVELL, 2012).

Weitere Forschungsanstrengungen sind erforderlich, um die besten Kulturen für die Trocken- und Nassreifung von Rindfleisch zu identifizieren.

Schlussfolgerungen für die Praxis

Eine Reifung von Rindfleisch mit Starter-/Schutzkulturen kann zu sensorisch überzeugenden und mikrobiologisch sicheren Produkten führen. Bei der Reifung sollte unabhängig vom gewählten Reifeverfahren berücksichtigt werden, dass nur qualitativ hochwertiges Fleisch zu einem vernünftigen Ergebnis führt. Reifekulturen können grobe Hygienefehler und ungeeignete Verfahrensweisen nicht kompensieren. Sie können aber die Entwicklung unerwünschter Keime verhindern oder zumindest verzögern. Bei Reifebeutelfleisch sollten Folien mit möglichst geringer Sauerstoffdurchlässigkeit gewählt werden, um das Wachstum von Hefen und Pseudomonaden zu minimieren. Die Reifetemperaturen sollten <4 °C sein, um einem vorzeitigen Verderb und einer Vermehrung pathogener Keime vorzubeugen. DFD- (dry-firm-dark, pH >5,8) Fleisch eignet sich nicht zur Reifung, da es das Wachstum von Listerien, *Brochothrix thermosphacta* und *Enterobacteriaceae* begünstigt. Für schimmelgereiftes Rindfleisch sollten getrennte Reife- und Verarbeitungsräume vorgesehen werden, um unerwünschte Kreuzkontaminationen mit Reifeschimmel und assoziierten Pseudomonaden und Hefen zu vermeiden.

Literatur

- Anonym (2010) Meat technology update - Dry-aging of beef. http://www.ampc.com.au/site/assets/media/Factsheets/Food-Safety-Meat-Science-Market-Access-Marketing-Consumer/MTU_2010_Dry-aging-of-beef.pdf
- Anonym (2012) <http://luma-dac.com/de/>
- Brooks FT, Hansford CG (1923) Mould growths upon cold-store meat. *Transact. Brit. Mycol. Soc.* 8: 113-142.
- Castellano P, Gonzalez C, Carduza F, Vignolo G (2010) Protective action of *Lactobacillus curvatus* CRL705 on vacuum-packaged raw beef. Effect on sensory and structural characteristics. *Meat Sci.* 85, 394-401.
- Clerjon S, Peyrin F, Lepetit J (2011) Frontal UV-visible fluorescence polarization measurement for bovine meat ageing assessment. *Meat Sci.* 88, 28-35.
- Collins MD, Rodrigues UM, Dainty RH, Edwards RA, Roberts TA (1992) Taxonomic studies on a psychrophilic *Clostridium* from vacuum-packed beef: Description of *Clostridium estertheticum* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* 96, 235-239.
- De Jonghe V, Coorevits A, Van Hoorde K, et al. (2011) Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2), 460-470.
- Dillon VM (1998) Yeasts and molds associated with meat and meat products. In: A Davies, R Board (eds.) *The Microbiology of Meat and Poultry*. Blackie, London. pp. 85-117.
- Ercolini D, Casaburi A, Nasi A, et al. (2010) Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall behaviour as meat spoilers. *Int. J. Food Microbiol.* 142 (1-2), 120-131.
- Gleason FH (1971) Alcohol dehydrogenase in mucorales. *Mycologia* 63 (4), 906.
- Jones RJ, Zagorec M, Brightwell G, Tagg JR (2009) Inhibition by *Lactobacillus sakei* of other species in the flora of vacuum packaged raw meats during prolonged storage. *Food Microbiol.* 26, 876-881.
- Kaya, M, Schmidt U (1991) Behavior of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed beef. *Fleischwirtschaft* 71 (4), 424-426.
- Kotula KL, Kotula AW (2000) Fresh red meats. In: BM Lund, TC Baird-Parker, GW Gould (eds.) *The Microbiological Safety and Quality of Food*, Vol. 1. Springer, New York. pp. 361-388.
- Kröckel L (2008) Mikrobiologische Qualität von vorverpacktem Brühwurst- und Kochschinkenaufschnitt – Aktuelle Untersuchungen. *Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach* 180, 87-97.
- Kröckel L (2009) Black spots on adipose tissue of pork and beef caused by melanin producing *Pseudomonas fluorescens*. *Fleischwirtschaft* 89 (6), 89-92.
- Kröckel L (2011a) Evaluation of a novel agar medium for the detection of hydrogen peroxide producing lactic acid bacteria. *Fleischwirtschaft* 91 (10), 97-101.
- Kröckel L (2011b) Mikrobiologische Qualität von vorverpacktem Rohschinkenaufschnitt. *Mitteilungsblatt Fleischforschung Kulmbach* 193, 141-152.
- Lautenschläger R (2012) Aktuelle Trends bei der Rindfleischreifung – Trockenreifung und Vakuumreifung im Vergleich. *Mitteilungsblatt Fleischforschung Kulmbach* (in Vorbereitung).
- Marchand S, Heylen K, Messens W, et al. (2009) Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. *Environ. Microbiol.* 11 (2), 467-482.
- Parrish Jr. FC (2012) Aging of beef. *Beef Facts*, Beef USA Series No. FS/MS011. www.goodcooking.com/steak/aging/aging.htm
- Pitt JI, Hocking AD (2009) *Fungi and Food Spoilage*, 3rd ed. Springer, Dordrecht, New York.
- Savell, JW (2012) Dry-aging of beef – Executive Summary. <http://beefresearch.org/CM/Docs/BeefResearch/Dry%20Aging%20of%20Beef.pdf>
- Scarpellini M, Franzetti L, Galli A (2004) Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. *FEMS Microbiol. Lett.* 236 (2), 257-260.
- Schillinger U, Lücke FK (1987) Lactic acid bacteria on vacuum-packaged meat and their influence on shelf life. *Fleischwirtschaft* 67 (10), 1244-1248.
- Stanbridge LH, Davies AR (1998) The microbiology of chill-stored meat. In: A Davies, R Board (eds.) *The Microbiology of Meat and Poultry*. Blackie, London. pp. 174-219.
- Widmer F, Seidler RJ, Gillevet PM, et al. (1998) A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (7), 2545-2553.