

Ein bakterielles Carotinoid färbt vorverpackte, kühl gelagerte Weißwurst gelb Bacterial carotenoid stains cooked sausage ('weisswurst') yellow

L. KRÖCKEL

Zusammenfassung

Ein bakterielles Carotinoid wurde erstmals als chemische Ursache der intensiven („neonartigen“) Gelbverfärbung von vorverpackter, kühl gelagerter Weißwurst identifiziert. Der verantwortliche Keim *Leuconostoc gelidum* produziert auf fetthaltigen Nährböden bei 7 °C das nicht polare C₃₀-Carotinoid 4,4'-Diapo-7,8,11,12-tetrahydrolycopin (7,8,11,12-Tetrahydro-4,4'-diapo- ψ,ψ -carotin, Summenformel C₃₀H₄₄, M_w 404,67), das auf fetthaltigen Substraten auch an das Substrat abgegeben wird und in der Lage ist, den Weißwurst Darm zu penetrieren. Bei diesem Triterpenoid handelt es sich um eine Vorstufe des 4,4'-Diaponeurosporins (7,8-Dihydro-4,4'-diapo- ψ,ψ -carotene), das als Hauptcarotinoid bei pigmentierten Enterokokken sowie bei *Leuconostoc citreum* und *Lactobacillus plantarum* vorkommt. Die Identifikation erfolgte mittels UV-VIS Spektroskopie auf der Grundlage von verfügbaren Literaturdaten. Wie hier erstmals gezeigt wird, erfolgt eine Pigmentbildung bei dem normalerweise unpigmentierten *Leuconostoc gelidum* auch unter Salz- und Ethanolstress. Im Unterschied zur kälteinduzierten Pigmentproduktion bleibt hier aber das Pigment mit der bakteriellen Kolonie verbunden, eine Pigmentabgabe in das fetthaltige Substrat erfolgt nicht. Bei diesem Pigment handelt es sich um das bekannte 4,4'-Diaponeurosporin, das hier erstmals auch in *Leuconostoc gelidum* nachgewiesen wurde.

Summary

This is the first report of a bacterial carotenoid as the responsible pigment for an intensive 'neon-like' yellow discolouration of prepackaged refrigerated 'weisswurst' (a cooked sausage produced without nitrite). The responsible organism, *Lactobacillus gelidum*, produces on fat-containing substrates at 7 °C the non-polar C₃₀-Carotenoid 4,4'-diapo-7,8,11,12-tetrahydrolycopene (7,8,11,12-tetrahydro-4,4'-diapo- ψ,ψ -carotene, formula C₃₀H₄₄, M_w 404,67). On fat-containing substrates this compound does not only stain the bacterial cells but also the substrate and, in the case of 'weisswurst' does stain the natural casing (porc intestine) of the sausage as well as the sausage surface beneath. This triterpenoid is an intermediate in the microbial synthesis of 4,4'-diaponeurosporene (7,8-dihydro-4,4'-diapo- ψ,ψ -carotene) which represents the main carotenoid in pigmented enterococci, *Leuconostoc citreum* and *Lactobacillus plantarum*. Identification of the pigment was achieved by using UV-VIS spectroscopy in combination with available data from literature. It is shown here for the first time that pigment production occurs in the normally unpigmented *Leuconostoc gelidum* also under conditions of salt and ethanol stress. However, in contrast to cold-induced pigment production the pigment remains bound to the cells and is not partitioned into the fat-containing substrate. This pigment was identified as the above mentioned 4,4'-diaponeurosporene which has not been known in *Leuconostoc gelidum* before.

Schlüsselwörter

Leuconostoc gelidum – psychrotrophe Milchsäurebakterien – Carotinoide – 4,4'-Diapo-7,8,11,12-tetrahydrolycopin – 4,4'-Diaponeurosporin – vorverpackte, kühl gelagerte Weißwurst – gelbe Flecken – Verfärbungen – UV-VIS Spektrometrie

Key Words

Leuconostoc gelidum – psychrotrophic lactic acid bacteria – carotenoids – 4,4'-diapo-7,8,11,12-tetrahydrolycopene – 4,4'-diaponeurosporene – prepackaged refrigerated cooked sausage ('weisswurst') – yellow spots – discolourations – UV-VIS spectroscopy

Einleitung

Vor zwei Jahren wurde an dieser Stelle über gelbe Farbabweichungen bei vorverpackten, kühl gelagerten Weißwürsten berichtet (KRÖCKEL, 2005). Damals wurde das psychrotrophe Milchsäurebakterium *Leuconostoc gelidum* als Verursacher identifiziert. Das gelbgrüne („neongelbe“) Pigment wurde teilweise charakterisiert. Es erwies sich als nicht wasserlöslich, konnte aber mit Aceton aus der Weißwursthülle extrahiert werden. Mittels Größenausschlusschromatographie wurde das Molekulargewicht auf <800 kDa eingegrenzt. Schwierigkeiten bei der chemischen Charakterisierung bereiteten unter anderem die verfügbaren Pigmentmengen und die ausgeprägten hydrophoben Eigenschaften dieser Verbindung. Wissenschaftliche Berichte über dieses Phänomen in Zusammenhang mit *Leuconostoc gelidum* lagen zu diesem Zeitpunkt kaum vor. Nur in einem Fall wurde dieses Milchsäurebakterium auch als Verursacher einer Gelbverfärbung bei vorverpacktem, kühl gelagertem, nicht gepökeltem Kochschinken identifiziert (CAI *et al.*, 1998). Die japanischen Forscher machten jedoch keine Angaben zur Identität des Pigmentes. Eigene Literaturrecherchen haben inzwischen einen Beitrag kanadischer Forscher aus dem Jahr 1989 zu Tage gefördert, in welchem das Phänomen der Gelbverfärbung erhitzter Fleischerzeugnisse, die aufgeschnitten, vorverpackt und über längere Zeit kühl gelagert werden, beschrieben wurde (WHITELEY und D'SOUZA, 1989). Diese Autoren, Mitarbeiter einer großen kanadischen Lebensmittelfirma (damals Canada Packers Inc.), machten allerdings ein anderes Milchsäurebakterium als Verursacher aus, welches heute als *Enterococcus casseliflavus* bekannt ist. Die genauere Lektüre dieses Beitrags sowie die Tatsache, dass über *Enterococcus casseliflavus* in der neueren Literatur nicht als Fleischverderber bei vorverpackter, kühl gelagerter Ware berichtet wird, lässt vermuten, dass der damals noch unbekannt *Leuconostoc gelidum* fälschlicherweise als *Enterococcus* spp. identifiziert wurde. Unstimmigkeiten bei der Identifizierung wurden von den Autoren damals bereits eingeräumt. Zudem wurde ein wichtiges diagnostisches

Kriterium (Gasbildung) nicht getestet. Auch das fehlende Wachstum bei 37 °C und 45 °C spricht nicht für *Enterococcus casseliflavus*. Was diese Arbeit dennoch interessant macht, außer der Tatsache, dass hier erstmals über Gelbverfärbungen bei vorverpackten Fleischerzeugnissen berichtet wird, sind Hinweise auf die chemische Identität des gelben Pigments. Die Autoren kommen aufgrund ihrer Untersuchungen zu dem Schluss, dass es sich um ein „saures Xanthophyll“ mit sieben konjugierten Doppelbindungen handelt, dessen Infrarot-Spektrum große Ähnlichkeit mit dem nicht polaren Carotinoid 4, 4'-Diapo-7, 8, 11, 12-tetrahydrolycopin hat und das TAYLOR und DAVIES (1974) zuvor bei *Streptococcus faecium* UNH564P identifiziert hatten. Die Gelbfärbung ist zudem phänologisch relativ gut beschrieben und deckt sich weitgehend mit den eingangs genannten Beobachtungen bei vorverpackter Weißwurst: „...eine Gelbverfärbung in Form kleiner Flecken ...auf Vakuum verpacktem „Frühstücksfleisch“ während der Lagerung bei 4,4 °C über 3 Wochen ...mit bakteriellem Hintergrundreproduzierbar durch Überimpfen ...keine Pigmentproduktion bei Raumtemperaturein ungewöhnliches Verderbsphänomen ...das Pigment färbt vorwiegend die fetthaltigen Teile des Fleischsubstrats ... keine Pigmentbildung auf herkömmlichen Nährböden ... Pigmentbildung sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen ...“. Hinweise auf ein Carotinoid erhielten die Autoren aufgrund des charakteristischen Absorptionsspektrums der gelben Verbindung in Petrolether. Die gelbe Verbindung wurde aus dem Fleischsubstrat mit alkalischem Ethanol extrahiert und daraus nach Ansäuern in Petrolether überführt. Carotinoide bei Milchsäurebakterien waren bis vor kurzem nur bei gelb pigmentierten Arten der Gattung *Enterococcus* bekannt. Als Hauptcarotinoid kommt hier das 4,4'-Diaponeurosporin vor (TAYLOR und DAVIES, 1974; BREITHAUPT *et al.*, 2001). Bekannter sind sie bei Staphylokokken, insbesondere das Staphyloxanthin von *Staphylococcus aureus* (TAYLOR und DAVIES, 1983; CLAUDITZ *et al.*, 2006). Eine temperatur- und substratabhängige Pigmentbildung bei Bakterien wie im Fall von *Leuconostoc gelidum*, wo nicht nur die Bakterienzellen

sondern auch das Substrat verfärbt werden, ist allerdings bisher in der Literatur ohne Parallele.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das von *Leuconostoc gelidum* auf Weißwurst und anderen fetthaltigen Substraten produzierte gelbe Pigment näher zu charakterisieren und zu überprüfen, ob es sich wie von WHITELEY und D'SOUZA (1989) berichtet um ein Carotinoid handeln könnte. Außerdem wurden die gelb pigmentierte Spezies *Leuconostoc citreum* und die leicht gelblich pigmentierte Spezies *Lactobacillus plantarum* sowie die nicht pigmentierte Spezies *Leuconostoc carnosum* DSM 5576 für Vergleichszwecke herangezogen.

Material und Methoden

Mikroorganismen. Die Kultivierung von *Leuconostoc gelidum* DSM 5578, *Leuconostoc citreum* DSM 5577 und *Leuconostoc carnosum* DSM 5576 erfolgte routinemäßig in MRS-pH6.5 und Std-I Nährmedien, von *Lactobacillus plantarum* Lb75 (aus Duploferment 66) in MRS-pH6.5 bei 25 °C. Zur Herstellung von Nährböden wurden 1,5 % AgarAgar zugesetzt. Milchmedium wurde wie vorher beschrieben hergestellt (KRÖCKEL, 2005). Die Herstellung von Sojamilchmedium erfolgte analog zum Milchmedium.

Pigmentproduktion und Extraktion. Die Pigmentproduktion mit *Leuconostoc gelidum* erfolgte wie beschrieben bei 7 °C auf Weißwurst, Milchagar und Sojamilchagar (KRÖCKEL, 2005). Bakterienzellen wurden 2x in 0,9 % NaCl gewaschen und zur Extraktion des Pigments mit Methanol versetzt. Im Fall von *Leuconostoc gelidum* und *Leuconostoc citreum* wurde die gelbe Verbindung anschließend nach Verdünnen mit Wasser und Zusatz von Salz in Petrolether überführt.

UV-VIS Spektroskopie. Unlösliche Partikel wurden durch Filtration und/oder Zentrifugation aus den Extrakten entfernt. UV-VIS Spektren wurden mit einem Spekol 1200 (Analytic Jena) sowie einem Ultraspec 4300 (Biochrom Ltd., Cambridge) aufgenommen.

Ergebnisse

Weißwurstpelle. Das gelbe Pigment ließ sich bei Raumtemperatur aus feuchter Weißwurstpelle außer mit Aceton auch mit Methanol gut und schnell extrahieren. Acetonitril und Ethanol waren weniger effizient. Eine Extraktion mit Toluol, n-Hexan, Chloroform oder Petrolether gelang unter diesen Umständen nicht. Auch alkalisches Methanol oder alkalisches Ethanol wie bei WHITELEY und D'SOUZA (1989) beschrieben eignen sich. Durch mäßiges Erwärmen lässt sich die Extraktion mit alkalischem Ethanol beschleunigen. Die Extraktion mit alkalischem Ethanol gab aber keine anderen Ergebnisse als die Extraktion mit Methanol.

Das UV-VIS Spektrum des Methanolextraktes zeigte ein Maximum im sichtbaren Bereich bei 402-408 nm mit einer im Vergleich zum Maximum bei 210 nm etwa 8-mal niedrigeren Extinktion. Eine erhöhte Extinktion im Vergleich zur nicht pigmentierten Weißwurstpelle ließ sich im sichtbaren Bereich von 380/400 bis etwa 480 nm beobachten (Abb. 1).

Nach Überführung der gelben Verbindung aus Methanol in Petrolether durch Zugabe gleicher Volumina Wasser und Petrolether ging bereits ohne Zugabe von NaCl ein Teil der Substanz in den Petrolether über. Mit 0,5 M NaCl erfolgt der Übergang quantitativ. Das UV-VIS Spektrum in Petrolether unterschied sich deutlich von dem des Methanolextraktes. Anstelle der breiten Absorptionsbande bei 402 bis 408 nm wurde ein typische Carotinoid-Spektrum mit Hauptbanden bei 374, 393 und 414 nm beobachtet, mit Schultern bei 357 und 437 nm (Abb. 2). Die mittlere der drei Hauptbanden zeigte die höchste Extinktion.

Bakterienzellen. Das UV-VIS Spektrum eines methanolischen Extraktes pigmentierter Zellen von *Leuc. gelidum* unterschied sich deutlich von *Leuc. citreum* und *Lb. plantarum* (Abb. 3). Es war dabei unerheblich ob *Leuc. citreum* bei 25 °C oder bei 7 °C kultiviert wurde. *Leuc. citreum* und *Lb. plantarum* zeigten das typische dreigipflige Absorptionsspektrum des Tri-terpenoids 4,4'-Diaponeurosporins (7,8-Dihydro-4,4'-diapo- ψ,ψ -carotin) mit Ab-

sorptionsmaxima bei 414, 437 und 466 nm. Die geringere Extinktion bei *Lb. plantarum* im Vergleich zu *Leuc. gelidum* ist auf die schwächer ausgeprägte Pigmentierung bei *Lb. plantarum* zurückzuführen. Bei *Leuc. gelidum* war dagegen analog zum Extrakt aus der gelb verfärbten Weißwurstpelle nur ein einziges, breites Absorptionsmaximum bei 410 bis 412 nm zu beobachten.

Nach Überführung aus Methanol in Petrol-ether zeigte das UV-VIS Spektrum bei *Leuc. gelidum* ebenfalls ein dreigipfliges Spektrum (Abb. 4). Die Absorptionsmaxima lagen hier bei 376, 392 und 414 nm.

Extrakte von *Leuconostoc carnosum* zeigten im sichtbaren Wellenbereich keine Absorption.

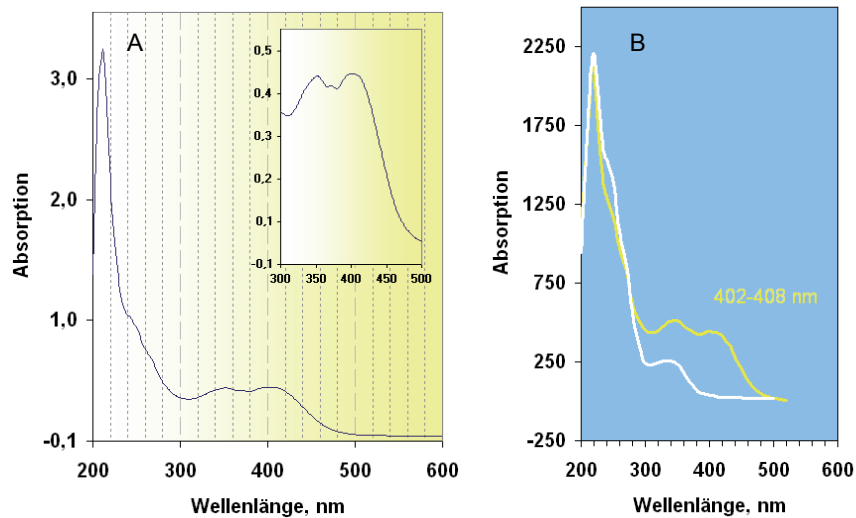


Abb. 1: UV-VIS Spektrum der gelben Verbindung aus gelb verfärbter Weißwurstpelle (Naturdarm) nach Extraktion mit Methanol (A) und im Vergleich zur nicht verfärbten Wurstpelle (B). *Leuc. gelidum* DSM 5578 auf Weißwurst bei 7 °C für 14 Tage

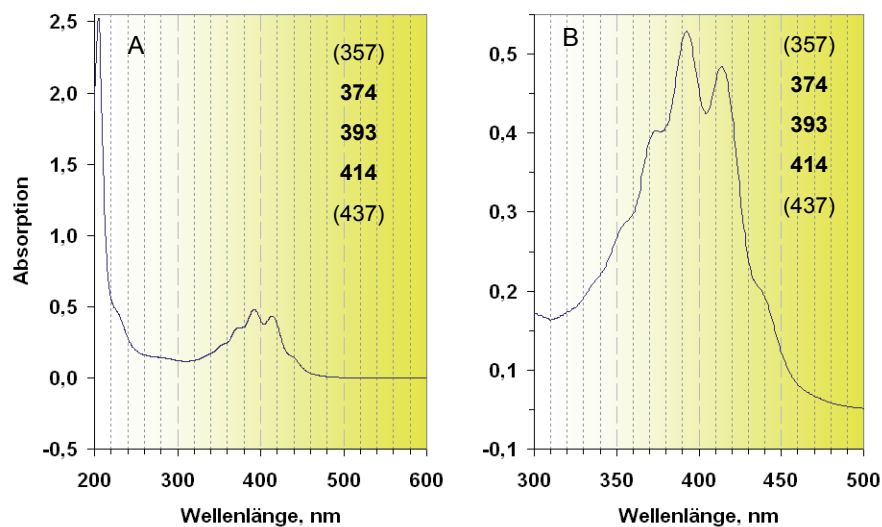


Abb. 2: UV-VIS Spektrum der gelben Verbindung aus gelb verfärbter Weißwurstpelle (Naturdarm) nach Extraktion mit Methanol und Überführung in Petrolether (ohne Salz). Bereich 200-600 nm (A) und 300-500 nm (B). Markante Maxima im Fettdruck, Schultern in Klammern. *Leuc. gelidum* DSM 5578 auf Weißwurst bei 7 °C für 14 Tage

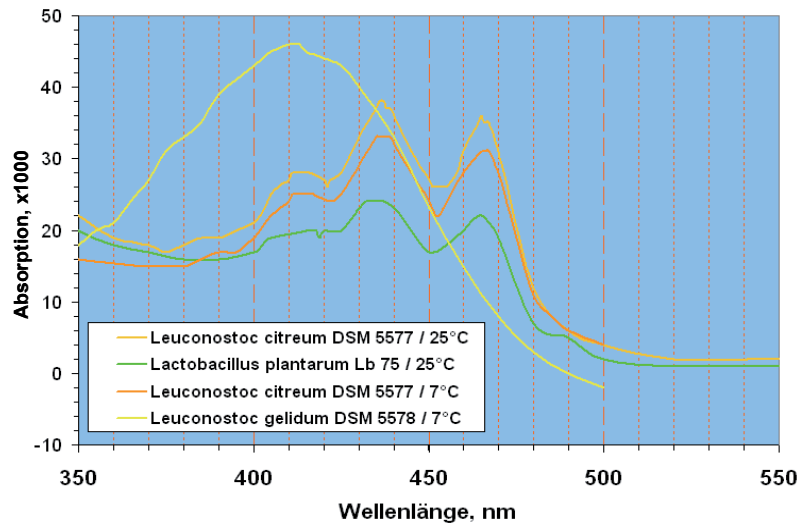


Abb. 3: UV-VIS-Spektrum methanolischer Extrakte gelb pigmentierter Zellen von *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc citreum* und *Lactobacillus plantarum*. Kultivierung auf Milchagar bei 25 °C und 7 °C

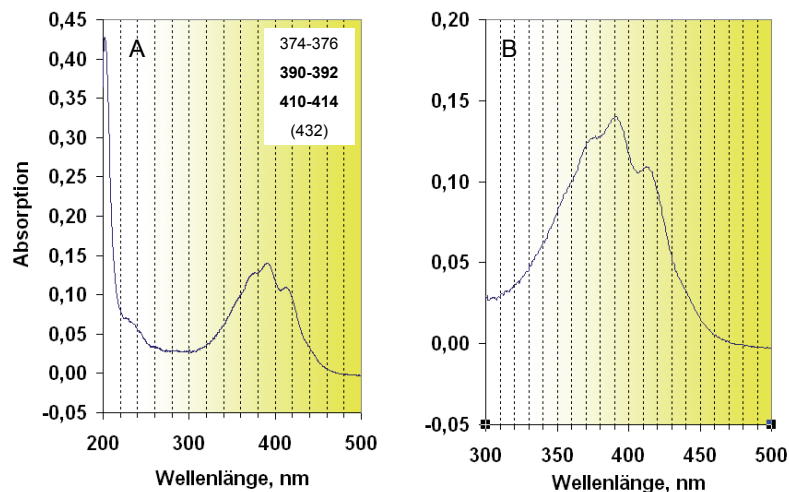


Abb. 4: UV-VIS-Spektrum der gelben Verbindung aus gelb verfärbten Zellen von *Leuc. gelidum* DSM 5578. Bereich 200-500 nm (A) bzw. 300-500 nm (B). Markante Maxima im Fettdruck, Schultern in Klammern. *Leuc. gelidum* DSM 5578 auf Sojamilchagar mit Saccharose bei 7 °C für 5 Tage

Sojamilchagar. Auf Sojamilchagar bei 7 °C erschienen die Kolonien von *Leuc. gelidum* gelb pigmentiert und der Nährboden in der unmittelbaren Umgebung der Kolonien zeigte die gleiche gelbe Verfärbung. Der methanolische Extrakt zeigte nach Überführung in Petrolether das gleiche Carotinoid-Spektrum wie es auch bei den Extrakten aus der Wurstpelle und den Bakterienzellen zu beobachten war (Abb. 5). Ähnliche Ergebnisse wurden mit (Kuh-) Milchagar erhalten.

Salz- und Ethanolstress. Um zu klären, ob auch unter anderen ungünstigen Umweltbedingungen eine Pigmentbildung erfolgt, wurden Sojamilchplatten mit Zusatz von 1, 2, 4, 6, 8 und 10 % NaCl bzw. Ethanol hergestellt und sowohl bei 7 °C als auch bei 25 °C bis zu 13 Tage inkubiert. Wachstum erfolgte bei 25 °C bis 6-8 % NaCl bzw. 10 % Ethanol, bei 7 °C bis 4 % NaCl bzw. 6 % Ethanol. Eine gelbe Pigmentierung der Kolonien war bei 25 °C nur bei 6-8 % NaCl bzw. 6-10 % Ethanol

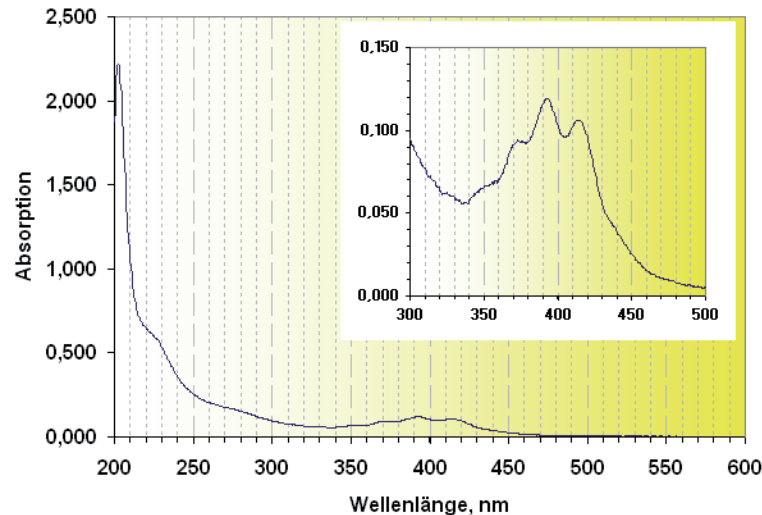


Abb. 5: UV-VIS Absorption der gelb gefärbten Verbindung aus Sojamilchagar nach Extraktion mit Methanol und Überführung in Petrolether. Markante Maxima bei 373-393-414 nm, Schultern bei 354 nm, 432 nm. *Leuc. gelidum* DSM 5578 auf Sojamilchagar mit Saccharose bei 7 °C für 5 Tage

zu erkennen. Diese war relativ schwach ausgeprägt und das Pigment blieb an die Kolonien gebunden (keine Verfärbung des Nährbodens). Der methanolische Extrakt der schwach gelb gefärbten Zellen auf Sojamilchagar mit 6-10 % Ethanol bzw. 6-8 % NaCl zeigte das typische Carotinoid-Spektrum des 4,4'-Diaponeurosporins (λ_{max} (nm): 414-436-465). Bei 7 °C waren dagegen die Kolonien und auch die Nährbodenoberfläche intensiv gelb gefärbt. Interessanterweise erfolgte jedoch keine Gelbverfärbung der Kolonien bei 6 % Ethanol und nur vereinzelt eine Gelbfärbung bei 4 % Ethanol. Bei 2 % NaCl waren nach 8 Tagen etwa 70 % der Kolonien gelb, nach 13 Tagen dagegen alle; bei 4 % NaCl war nach 8 Tagen kaum Wachstum zu beobachten, nach 13 Tagen waren ca. 50 % der Kolonien gelb.

Verpackungsfolie. Der längere Kontakt gelb verfärbter Weißwurst mit Polyethylenfolie (>14 Tage) führte auch zu einer Gelbfärbung der Folie an den Kontaktstellen. Das UV-VIS Differenzspektrum (unverfärbte Folie als Leerwert) war ebenfalls mehrgipflig und zeigte Absorptionsmaxima bei 406-411 und 432 nm, mit Nebengipfel oder Schultern bei 385-395 und 455-460 nm. Diese Daten lassen vermuten, dass es sich hier ebenfalls um das 4,4'-Diapo-7,8,11,12-tetrahydrolycopin handelt, dessen Absorptionsmaxima in

Polyethylen etwas in den längerwelligen Bereich verschoben sind. Es könnte sich aber auch um Derivate dieses Carotinoids handeln.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass ein bakterielles Carotinoid für die Gelbverfärbung von vorverpackter, kühl gelagerter Weißwurst verantwortlich ist. Andere, auch auf herkömmlichen Nährböden gelb pigmentierte Milchsäurebakterien sind dazu nicht in der Lage. Die Identifizierung mittels UV-VIS Spektroskopie unter Berücksichtigung vorhandener Literaturdaten in Verbindung mit anderen Eigenschaften (Lösungsverhalten, Molekulargewicht) kann für diesen Zweck als hinreichend angesehen werden. Ein Spektrum mit Absorptionsbanden zwischen 400 und 500 nm mit drei Maxima, das mittlere mit der höchsten Intensität, ist charakteristisch für ein Carotinoid (BRITTON *et al.*, 2004). Bei etwa 700 heute bekannten Carotinoiden liefert die spektroskopische Analyse allerdings oft nur erste Hinweise auf die Identität der Verbindung. Das Molekulargewicht von 4,4'-Diapo-7,8,11,12-tetrahydrolycopin (Mw 404,67) steht im Einklang mit dem Ergebnis der Größenausschlusschromatographie (KRÖCKEL, 2005), die auf ein Mw < 800 Da hinwies.

Das Lösungsverhalten sowie das Verhalten in der RP-HPLC (KRÖCKEL, unveröffentlicht) entspricht dem eines nicht polaren Carotinoids. Das Ergebnis der UV-VIS Spektroskopie ist zu 100 % identisch mit dem von WHITELEY und D'SOUZA (1989). Der Argumentation dieser Autoren, dass es sich um ein „saurer Xanthophyll“ handeln müsse, kann allerdings nicht gefolgt werden. Eine Ansäuerung war nicht erforderlich um das Carotinoid aus dem Methanol in Petrolether zu überführen. Der gleiche Effekt konnte durch Zusatz einer wässrigen NaCl-Lösung erzielt werden. Letztlich sprechen die spektroskopischen Daten auch bei WHITELEY und D'SOUZA (1989) für 4,4'-Diapo-7,8,11,12-tetrahydrolycopin.

Die Untersuchungen zur Pigmentierung der Zellen in Gegenwart hoher Konzentrationen von Salz bzw. Ethanol zeigten, dass *Leuconostoc gelidum* den vollständigen Carotinoidsyntheseweg zur Produktion des bei Staphylokokken und Milchsäurebakterien verbreiteten 4,4'-Diaponeurosporin besitzt. Größere Mengen dieses Carotinoids, die zu einer sichtbaren Pigmentierung der Kolonien führen, werden jedoch erst unter extremen Stressbedingungen produziert. Es liegt nahe, dass die Regulation ähnlich wie bei *S. aureus* über einen alternativen Sigmafaktor erfolgt (KULLIK *et al.*, 1998). In der Kälte kommt es offenbar in Verbindung mit fetthaltigen Substraten zu einer Deregulation dieses Synthesewegs unter Bildung der Vorstufe 4,4'-Diapo-7,8,11,12-tetrahydrolycopin, welche von den Kolonien in das Substrat leckt. Bei Salz- und Ethanolkonzentrationen im Grenzbereich wird das Carotinoid zunächst nicht bzw. erst verzögert gebildet.

Carotinoide haben wichtige Aufgaben bei der Photosynthese und dienen Bakterien zum Schutz vor photooxidativen Schädigungen (GOODWIN, 1972; OLSON, 1993). Sie haben aber auch eine Bedeutung als Antioxidantien in Abwesenheit von Licht. Die antioxidative Wirkung des Pigments spielt nicht nur eine Rolle für die „fitness“ eines Organismus beim Überleben unter schädigenden Umweltbedingungen, sondern fördert auch die Virulenz pathogener Bakterien (REVERCHON *et al.*, 2002; LIU *et*

al., 2005; CLAUDITZ *et al.*, 2006). Sowohl LIU *et al.* (2005) als auch CLAUDITZ *et al.* (2006) haben eine verminderte Abtötung durch Oxidantien bei Xanthenoid bildenden Stämmen von *Staphylococcus aureus* berichtet.

Triterpenoid-Carotinoide waren bis vor kurzem bei *Lactobacillus* und *Staphylococcus* (Ausnahme *S. aureus*) nicht bekannt (BREITHAUPT *et al.*, 2001). Lange bekannt sind sie jedoch bei *Enterococcus* (TAYLOR und DAVIES, 1974). Entsprechende Berichte bei *Leuconostoc* lagen bislang nicht vor. In dieser Arbeit wird erstmals über das Vorkommen dieser Stoffklasse in zwei *Leuconostoc* Spezies berichtet. Während das gelbe Pigment von *Leuconostoc citreum* spektrophotometrisch eindeutig als 4,4'-Diaponeurosporin identifiziert werden konnte, das temperaturunabhängig produziert wird, handelt es sich bei dem nur in der Kälte produzierten gelben Pigment von *Leuconostoc gelidum* um eine Vorstufe dieses Triterpenoids.

Das gelbe in der Kälte produzierte Pigment von *Leuc. gelidum* unterscheidet sich spektrometrisch deutlich von dem C₃₀-Carotinoid 4,4'-Diaponeurosporin, das als Hauptcarotinoid bei *Enterococcus casseliflavus* und *Lactobacillus plantarum* vorkommt (TAYLOR und DAVIES, 1974; BREITHAUPT *et al.*, 2001). Für letzteres werden in der Literatur Absorptionsmaxima von 416, 438 und 468 nm (in Methanol) bzw. (390)-412-436-466 nm (in Petroleum) angegeben (TAYLOR und DAVIES, 1974). Das Triterpenoid hat die Summenformel C₃₀H₄₂, ein Molekulargewicht 402,7 und zehn Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen, davon 9 konjugiert. Neben dem „all-trans“-Isomer wurden auch zahlreiche cis-Isomere nachgewiesen (BREITHAUPT *et al.*, 2001). Im Unterschied dazu liegen beim 4,4'-Diapo-7,8,11,12-tetrahydrolycopin nur neun Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen vor, wovon 7 konjugiert sind. Letzteres absorbiert daher in einem kurzwelligeren Bereich.

Carotinoide sind auch bei *Enterobacteriaceae* bekannt, allerdings kommen hier die häufigeren Tetraterpenoide (C₄₀-Carotin-

oide) vor. Multiple Gencluster für die Synthese von Carotinoiden wurden bei mehreren *Enterobacteriaceae* Arten beschrieben (SEDKOVA *et al.*, 2005). *Enterobacter sakazakii* bildet gelb-pigmentierte Kolonien auf Trypticase-Soja-Agar. Er zählt zu den opportunistisch-pathogenen lebensmittelassoziierten Bakterien. Die Intensität der Pigmentierung variiert unter den Stämmen, und es sind auch nicht pigmentierte Varianten bekannt (FARMER *et al.*, 1980). Das C₄₀-Carotinoid von *Enterobacter sakazakii* hat neun konjugierte C-C-Doppelbindungen in der Hauptkette (LEHNER *et al.*, 2006). Bei einigen *Enterobacteriaceae* wurden β -Carotin, β -Cryptoxanthin und Zeaxanthin nachgewiesen (SEDKOVA *et al.*, 2005).

Schlussfolgerungen für die Praxis

Bei der Gelbverfärbung von erhitzten Fleischerzeugnissen durch das psychrotrophe, heterofermentative Milchsäurebakterium *Leuconostoc gelidum* wird ein intensiv gelb erscheinendes Carotinoid an das Fleischsubstrat abgegeben. Mittels UV-VIS Spektroskopie wurde gezeigt, dass es sich dabei um 4,4'-Diapo-7,8,11,12-tetrahydrolycopin handelt. Über eine gesundheitsrelevante Wirkung dieser Verbindung liegen keine Daten vor. Bei gelb pigmentierten Fleischerzeugnissen ist allerdings mit einem weit fortgeschrittenen bakteriellen Verderb zu rechnen, der neben der Verfärbung auch zu unerwünschten Abweichungen in Geruch und Geschmack führt. Erfolgreiche Vermeidungsstrategien beruhen auf einer sehr guten Prozesshygiene in Verbindung mit der Vermeidung überlanger Lagerungszeiten.

Danksagung

Für die hervorragende technische Assistenz danke ich Frau Jutta Popp, einer Reihe von Kollegen für ihre Diskussionsbereitschaft sowie dem Institut für Chemie und Physik für die gewährte Hilfe bei der Aufnahme der UV-VIS Spektren.

Literatur

- Anonymus (2007) <http://lipidbank.jp>
- Breithaupt DE, Schwack W, Wolf G, Hammes WP (2001) Characterization of the triterpenoid 4,4'-diaponeurosporene and its isomers in food-associated bacteria. *Eur Food Res Technol* 213 (3): 231-233
- Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (2004) Carotenoids, Birkhäuser Verlag, Basel
- Clauditz A, Resch A, Wieland K-P, Peschel A, Goetz F (2006) Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. *Infect Imm* 74: 4950-4953
- Farmer JJ, Ashbury MA, Hickman FW, Brenner DJ (1980) The *Enterobacteriaceae* group: *Enterobacter sakazakii*: a new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Int Syst Bacteriol* 30: 569-584
- Goodwin TW (1972) Carotenoids in fungi and nonphotosynthetic bacteria. *Progr Ind Microbiol* 11: 29-88
- Kröckel L (2005) Gelbe Farbabweichungen bei verpackten, kühl gelagerten Weißwürsten werden durch *Leuconostoc gelidum* verursacht. *Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach* 44, Nr. 170, 283-294
- Kullik I, Giachino P, Fuchs T (1998) Deletion of the alternative sigma factor σ^B in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. *J Bact* 180: 4814-4820
- Lehner A, Grimm M, Rattei T, Ruepp A, Frishman D, Manzardo GGG, Stephan R (2006) Cloning and characterization of *Enterobacter sakazakii* pigment genes and in situ spectroscopic analysis of the pigment. *FEMS Microbiol Lett* 265: 244-248
- Liu GY, Essex A, Buchanan JT, Datta V, Hoffman HM, Bastian JF, Fierer J, Nizet V (2005) *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med* 202: 209-215
- Olson JA (1993) Vitamin A and carotenoids as antioxidants in a physiological context. *J Nutr Sci Vitaminol* 39: 57-65
- Reverchon S, Rouanet C, Expert D, Nasser W (2002) Characterization of indigoidine biosynthetic genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity. *J Bact* 184: 654-665
- Sedkova N, Tao L, Rouviere PE, Cheng Q (2005) Diversity of carotenoid synthesis gene clusters from environmental *Enterobacteriaceae* strains. *Appl Environ Microbiol* 71: 8141-8146
- Taylor RF, Davies BH (1974) Triterpenoid carotenoids and related lipids: The triterpenoid carotenes of *Streptococcus faecium* UNH 564P. *Biochem J* 139: 751-760
- Taylor RF, Davies BH (1983) The triterpenoid carotenoids and related terpenoids in *Staphylococcus aureus*. *Can J Biochem Cell Biol* 61: 892-905