

## Einsatz probiotischer Bakterien bei Fleischerzeugnissen Use of probiotic bacteria in meat products

L. KRÖCKEL

### Zusammenfassung

Die Entwicklung von Lebensmitteln mit besonderem ernährungsphysiologischem Wert hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Fermentierte Milcherzeugnisse mit probiotischen Milchsäurebakterien sind mittlerweile für viele Verbraucher fester Bestandteil des täglichen Verzehrplans. Bei den Fleischerzeugnissen könnten die fermentierten Rohwürste ein geeignetes Vehikel für entsprechende Mikroorganismen darstellen. Sie enthalten auf Grund ihrer Herstellungsweise hohe Keimzahlen an Milchsäurebakterien, welchen jedoch selbst keine probiotische Bedeutung beigemessen wird. Andererseits sind die meisten probiotischen Bakterien nicht in der Lage, sich im Rohwurstmilieu zu etablieren. Ausnahmen hiervon sind Kulturen aus der *Lactobacillus plantarum* sowie der *Lactobacillus casei* Gruppe. Obwohl die ersten Versuche in diese Richtung bereits vor 8-10 Jahren erfolgten, gibt es heute nur wenige Hersteller, die Rohwürste mit probiotischen Bakterien anbieten. Gründe hierfür sind die im Vergleich zur Milchbranche eher handwerkliche Orientierung der Hersteller, die größere Produktvielfalt sowie eine Reihe von Unwägbarkeiten technologischer, mikrobiologischer und lebensmittelrechtlicher Art. Da spontan reifende Rohwürste europäischen Typs in der Regel von den konkurrenzfähigeren Stämmen der *Lactobacillus sakei/curvatus* Gruppe dominiert werden, wird im Einzelfall zu prüfen sein, welche Produkte sich mit den neuen probiotischen Kulturen herstellen lassen. Die Entwicklung eines Marktes für probiotische Fleischerzeugnisse wird aber auch wesentlich von der Entwicklung der europäischen Rechtssetzung zu gesundheitsbezogenen Angaben bei Lebensmitteln abhängen.

### Summary

The development of foods with added nutritional values for the consumers has gained increasing attention in recent years. For many consumers fermented milk products with added probiotic lactic acid bacteria are already a regular part of their daily diet. With meat products, raw fermented sausages could constitute an appropriate vehicle for such microorganisms. Due to the manufacturing process raw fermented sausages contain high numbers of lactic acid bacteria which, however, are not regarded as probiotics. On the other hand, most of the known probiotic bacteria are unable to establish themselves in the raw sausage environment. Exceptions thereof are microbial cultures belonging to the *Lactobacillus plantarum* group and to the *Lactobacillus casei* group. Although first steps for marketing probiotic sausages were taken already 8-10 years ago, there are only a few manufacturers today who offer raw fermented sausages with probiotic bacteria. This is probably due to the more artisanal orientation of the sausage manufacturers as compared to the dairy industry, a larger variety of products, as well as a number of uncertainties concerning technological, microbiological and regulatory aspects. Since the microflora of spontaneously ripened European-style raw fermented sausages is usually dominated by the more competitive strains of the *Lactobacillus sakei/curvatus* group, the suitability of new probiotic cultures will have to be verified for each individual sausage type. Also, the development of a market for probiotic meat products will greatly depend on the developments in European legislation with respect to health related claims on foodstuffs.

---

**Schlüsselwörter** probiotische Fleischerzeugnisse – Rohwurst – Milchsäurebakterien

**Key Words** probiotic meat products – raw fermented sausage – lactic acid bacteria

---

Die Entwicklung von Lebensmitteln mit besonderem ernährungsphysiologischem Wert hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Probiotische Lebensmittel nehmen dabei einen breiten Raum ein. Schon ab Mitte der 90er Jahre kamen ständig neue Milcherzeugnisse, vor allem Joghurts, mit probiotischen Mikroorganismen auf den Markt. Die jährliche Anzahl von Publikationen mit probiotischem Hintergrund hat sich seit 1995 mehr als verzehnfacht. Von den bis 2005 weltweit erschienenen rund 3500 (Erst-) Veröffentlichungen kamen 6-7 % aus Deutschland. Mehr als zwei Drittel dieser Arbeiten wurden in den letzten 5 Jahren publiziert.

Vom Einsatz probiotischer Bakterien soll nicht nur die Wirtschaft mit innovativen und wettbewerbsstarken Produkten profitieren, sondern auch der Konsument, dem bei täglichem Verzehr eine zumindest wohltuende, wenn nicht gar gesundheitsfördernde Wirkung versprochen wird. Nach der sehr erfolgreichen Vermarktung solcher Kulturen in Milcherzeugnissen rücken jetzt zunehmend andere Lebensmittel in den Mittelpunkt des Interesses. In der Europäischen Union wird künftig eine neue Regelung über nährwert- und gesundheitsbezogene Aussagen bei Lebensmitteln die Rechte von Herstellern und Verbrauchern im Zusammenhang mit der Bewerbung derartiger Lebensmittel stärken (ANONYMUS, 2000a,b).

### **Rohwurst als Vehikel für probiotische Mikroorganismen**

Probiotische Nahrungsmittel sollten Mikroorganismen enthalten, von welchen eine gesundheitsfördernde Wirkung nach Verzehr erwartet werden kann. Solche Wirkungen erwartet man vor allem von *Bifidobacterium* spp. und von bestimmten Arten der Gattung *Lactobacillus* (*Lb.*) wie *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* und *Lb. rhamnosus* (ALANDER *et al.*, 1999). Bei den Fleischerzeugnissen werden gegenwärtig die Rohwürste als geeignetes Vehikel für probiotische Mikroorganismen angesehen (HAMMES und HALLER, 1998; KLINGBERG *et al.*, 2005). Diese gereiften, nicht erhitzten Fleischerzeugnisse enthalten pro

Gramm in der Regel 50-500 Mio. Milchsäurebakterien (MSB), die wesentlich zur Verzehrsicherheit dieses Lebensmittels sowie zu den sensorischen Produkteigenschaften beitragen.

Spontan reifende Rohwürste europäischen Typs werden in der Regel von den in diesem Milieu wesentlich konkurrenzfähigeren Spezies *Lb. sakei* und *Lb. curvatus* dominiert. Der Anteil von *Lb. sakei* liegt regelmäßig bei 50-75 %, der von *Lb. curvatus* bei bis zu 25 % der MSB-Flora. Daneben findet man in wesentlich niedrigeren Anteilen auch Arten wie *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, und *Lb. paracasei* (DOBDMANN *et al.*, 1998; LEROY *et al.*, 2006; AYMERICH *et al.*, 2006). Die als Starterkulturen für die Herstellung von Rohwurst verwendeten Milchsäurebakterien umfassen die *Lactobacillus* Arten *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* und *Lb. pentosus*, die *Pediococcus* Arten *Pc. acidilactici* und *Pc. pentosaceus* sowie die *Lactococcus*-Art *Lc. lactis* (HAMMES und HERTEL, 1998).

Auf Grund der allgemein akzeptierten Anforderungsprofile für probiotische Mikroorganismen (u. a. signifikante Komponente der Darmflora gesunder Menschen, Überleben der Magen-Darm-Passage bzw. Säure-Galle-Resistenz, Adhäsion an Darmzellen), wird den heute üblichen Reifekulturen für Rohwurst mit Ausnahme von *Lb. plantarum* keine probiotische Bedeutung beigemessen. Andererseits sind die meisten probiotischen Bakterien, die bei Milcherzeugnissen Verwendung finden, nicht in der Lage, sich im vergleichsweise unwirtlichen Rohwurstmilieu zu vermehren bzw. dort in relevanter Keimzahl, das heißt mit mehr als 1-10 Mio. Keimen pro Gramm, zu überleben (HAMMES und HERTEL, 1998; ANDERSEN, 1998; PETÄJÄ *et al.*, 2003).

### **Strategien bei der Entwicklung probiotischer Kulturen**

Bei der Entwicklung probiotischer Kulturen für Fleischerzeugnisse werden zwei Strategien verfolgt. Zum einen hat man versucht bereits etablierte probiotische Milchsäurebakterien aus dem Milchbereich ein-

zusetzten, zum anderen sucht man in natürlich fermentierten Fleischerzeugnissen nach Kulturen, die probiotische Anforderungsprofile erfüllen (LEROY *et al.*, 2006; KLINGBERG *et al.*, 2005). Erstere stammen ursprünglich aus dem Gastrointestinal (GI)-Milieu vorzugsweise des Menschen. Getestet wurden unter anderem Stämme der *Lb. acidophilus* und der *Lb. casei* Gruppe sowie einige Arten der Gattung *Bifidobacterium*. Relativ gute Erfolge wurden dabei mit *Lb. casei*, *Lb. paracasei* und *Lb. rhamnosus* erzielt.

Aus Rohwurst wurden Stämme von *Lb. plantarum* und *Lb. pentosus* isoliert, die probiotische Eigenschaften aufweisen und zugleich als Starterkulturen einsetzbar sind (KLINGBERG *et al.*, 2005). Im GI-Trakt des Menschen gehört *Lb. plantarum* neben *Lb. rhamnosus* und *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* zu den vorherrschenden *Lactobacillus* Arten (AHRNÉ *et al.*, 1998; KLINGBERG *et al.*, 2005; MOLIN *et al.*, 1993; PRETZER *et al.*, 2005).

Obwohl *Lb. rhamnosus* Kulturen als Probiotika eingesetzt werden und Isolate aus fermentierten Lebensmitteln für gesundheitlich unbedenklich gehalten werden, ist diese Spezies auf Grund klinischer Vorfälle im Gegensatz zu *Lb. casei* bzw. *Lb. paracasei* einer höheren Sicherheitstufe zugeordnet (HAMMES und HALLER, 1998). Letztere können daher problemlos als Probiotika vermarktet werden. Rohwürste mit *Lb. paracasei* sind bereits seit Jahren ohne Beanstandungen auf dem Markt.

### Probiotische Wirkung

Wieviele probiotische Bakterien täglich und in welcher Form aufgenommen werden müssen, um einen messbaren probiotischen Effekt zu erzielen, ist nicht genau bekannt. Man nimmt aber an, dass eine Aufnahme von mindestens  $10^6$  KBE/g Lebensmittel erforderlich ist (GROENEVELD, 1999). Der Verzehr von 100 g Rohwurst mit  $10^8$  KBE/g probiotischen Bakterien würde ausreichen, um  $10^7$  KBE/g Stuhl zählen zu können, wenn keine Verluste im oberen GI-Trakt zu verzeichnen sind. Auch traditionell fermentierte Lebensmittel könnten eventuell be-

stimmte probiotische Effekte, etwa eine modulierende Wirkung auf das Immunsystem, ausüben. Die Wirksamkeit probiotischer Lebensmittel sollte jedoch letztlich durch Humanstudien belegt werden können (HAMMES und HALLER, 1998; REID *et al.*, 2006). Bis heute liegt nur eine einzige derartige Studie für ein probiotisches Fleischerzeugnis vor. Sie dokumentiert, dass der tägliche Verzehr von 50 g einer Salami mit einem *Lb. paracasei* Stamm als Starter bei gesunden Probanden verschiedene Aspekte des Immunsystems moduliert (HAMMES und HALLER, 1998; JAHREIS *et al.*, 2002).

### Offene Fragen

Gerade bei funktionellen Lebensmitteln gibt es eine Reihe offener Fragen, die nur mit aufwändiger und teurerer Forschung geklärt werden können. Große Bedeutung wird z. B. der Frage beigemessen, ob ein Befund hinsichtlich einer probiotischen Wirkung, die mit einem Joghurt erzielt wurde, auch mit einer Wurst erzielt werden kann (HAMMES und HALLER 1998). Daneben spielen auch gesundheitspolitische Fragen eine Rolle. Nicht überall werden Fleischerzeugnisse als „gesunde“ Lebensmittel angesehen (LÜCKE, 1998).

Der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e. V. zufolge ist gegen den Verzehr von Fleisch nichts einzuwenden solange es mager ist und in Maßen (300-600 g Fleisch und Wurst pro Woche) konsumiert wird. Für Fleisch spricht sein hoher Anteil an verfügbarem Eisen und den Vitaminen B1, B6 und B12. Fleischerzeugnisse mit hohem Fettgehalt sollten dagegen eher selten verzehrt werden (ANONYMUS, 2006c). Probiotische Salamis sollten daher so wenig wie möglich tierische Fette enthalten.

### Verbraucherschutz

Der Verbraucher erwartet, dass die Lebensmittel gesundheitlich unbedenklich sind und die besonders hervorgehobenen Produkteigenschaften auch zutreffen. Da die probiotische Wirkung nicht für jedes einzelne Erzeugnis überprüft werden kann, sollte zumindest für den Produkttyp

eine Dokumentation vorliegen, die einer kritischen Evaluierung Stand hält. Dabei wäre auch festzulegen, welche Variationen hinsichtlich der Produktqualität erlaubt sind. Die europäische Gesetzgebung zur Lebensmittelkennzeichnung versucht außerdem, missbräuchliche Werbung, z.B. eine unlautere „Aufwertung“ minderwertiger bzw. ungesunder Lebensmittel-erzeugnisse zu verhindern. Werden bestimmte probiotische Bakterien genannt, dann sollten diese im Lebensmittel auch nachweisbar sein, und zwar mindestens in der Anzahl wie sie in der Dokumentation als notwendig erachtet werden. Geeignete Nachweismethoden sollten aus der Dokumentation ebenso klar hervorgehen wie die exakte taxonomische Bezeichnung der verwendeten Kulturen.

Ähnlich wie bei probiotischen Milcherzeugnissen (MASCO *et al.*, 2005) werden auch bei den im Handel erhältlichen probiotischen Rohwürsten nicht immer die Mikroorganismen gefunden, die ausgelobt sind. Das liegt zum einen daran, dass die Stämme nicht richtig identifiziert wurden bzw. der aktuelle Stand der Taxonomie nicht berücksichtigt wurde, zum anderen daran, dass teilweise Stämme im Handel sind, die bereits den Fermentationsvorgang nicht überleben. Zu letzteren gehören u.a. *Lb. acidophilus* und *Bifidobacterium* spp. .

### Nachweismethoden

Der Nachweis probiotischer Keime wirft einige Probleme auf, die über die Grenzen der traditionellen Mikrobiologie hinaus gehen. Das gilt insbesondere für Lebensmittel, welchen die probiotischen Bakterien nicht nachträglich zugegeben werden können, wie etwa bei wärmebehandelten Joghurts und Getränken, und die zudem eine signifikante produktspezifische Eigenflora aufweisen. Fermentierte Rohwurst enthält in der Regel  $10^8$  KBE/g Milchsäurebakterien, die den Nachweis der probiotischen Bakterien stören, indem sie z.B. auf denselben Nährböden wachsen. Der kulturelle Nachweis lebensfähiger probiotischer Bakterien erfolgt daher vorzugsweise unter anaeroben Bedingungen

bei 37 °C auf gallehaltigen Selektivnährböden, deren Selektivität gegebenenfalls durch Zusatz von Antibiotika erhöht wird. Werden keine ausreichend selektiven Bedingungen gefunden, so müssen die erhaltenen Kolonien weiter analysiert werden. Klassische mikrobiologische Methoden können dabei hilfreich sein. Sie reichen jedoch für eine exakte Identifizierung oft nicht aus. Moderne DNA- und/oder Protein-analytische Methoden spielen daher bereits heute eine wichtige Rolle bei der Spezies- und Subspezies-Identifizierung. Da probiotische Eigenschaften oft spezifischen Stämmen einer Art zugeschrieben werden und nicht einer Spezies *per se*, sind weitergehende Differenzierungen auf Stammebene erforderlich. Diese können bislang nur mit unverhältnismäßig großem Aufwand durchgeführt werden (ROY *et al.*, 1999; ROY und WARD, 2004; MASCO *et al.*, 2005; REID *et al.* 2006) und kommen somit für die Lebensmittelüberwachung kaum in Frage. Bereits die Unterscheidung sehr nah verwandter Arten und Unterarten etwa innerhalb der *Lb. plantarum* und *Lb. casei* Gruppe oder der Bifidobakterien ist kritisch (CHAVAGNAT *et al.*, 2002; MASCO *et al.*, 2004).

### Marktlage

Obwohl die ersten probiotischen Rohwürste in Europa bereits vor 8 Jahren erhältlich waren (HAMMES und HALLER, 1998), hat sich seitdem kein größerer Markt für derartige Produkte entwickelt. Gründe hierfür sind die im Vergleich zur Milchbranche eher handwerkliche Orientierung der Hersteller, die größere Produktvielfalt sowie eine Reihe von Unwägbarkeiten technologischer, mikrobiologischer und lebensmittelrechtlicher Art. Einzelne Hersteller bieten jedoch ein breites Sortiment schnittfester und streichfähiger probiotischer Rohwurst an, die in 2005 noch etwa 4 % der DLG-prämierten Erzeugnisse stellten (51 von 1150 Rohwürsten), während in 2006 lediglich 21 Erzeugnisse mit probiotischen Kulturen zur Prüfung eingesandt wurden (ANONYMUS, 2006d).

## Eigene Untersuchungen

Die Hersteller von Starterkulturen bieten inzwischen auch probiotische Bakterien für den Einsatz bei Rohwurst an. Eine immer wieder gestellte Forderung war in der Vergangenheit die möglichst tägliche Aufnahme einer Mindestanzahl lebensfähiger Mikroorganismen, um eine behauptete probiotische Wirkung zu garantieren. Bei der Herstellung probiotischer Joghurts werden die probiotischen Mikroorganismen daher nachträglich, d. h. nach erfolgter Fermentation zugesetzt, um die geforderten hohen Lebendkeimzahlen zu erhalten (HELLER, 2001). Die Technologie der Rohwurstherstellung schließt eine solche Praxis jedoch aus. Hier müssen die probiotischen Bakterien bereits bei der Brätherstellung zugesetzt werden. Während der Rohwurstreifung müssen sich diese in Rohwurst an sich unüblichen Bakterien gegen die typische Fermentationsflora behaupten, das heißt, es sollten mindestens  $10^6$  KBE/g in der fertigen Rohwurst nachweisbar sein. Die traditionelle Rohwursttechnologie fördert das Wachstum bestimmter, gut an diese Milieubedingungen angepasster Milchsäurebakterien, vor allem *Lb. sakei* und *Lb. curvatus*. Diese beiden Bakterienarten werden daher auch als Starterkulturen für Rohwurst eingesetzt. Häufig werden auch *Lb. plantarum* und *Pediococcus acidilactici* sowie *Staphylococcus carnosus* und *Staphylococcus xylosus* als Rohwurststarter verwendet. In jüngerer Zeit wurden auch *Lb. paracasei* und *Lb. rhamnosus* erfolgreich erprobt (siehe unten). Vor diesem Hintergrund wurden einige probiotische Rohwürste aus dem Handel mikrobiologisch analysiert und die Eignung von zwei zum Einsatz bei Rohwurst angebotenen probiotischen Kulturen getestet.

### *Untersuchung probiotischer Rohwürste aus dem Handel*

Untersucht wurden drei deutsche Erzeugnisse und ein schweizer Produkt (Tab. 1). Die Würste wurden medial ringsum etwa 5 mm tief mit einem sterilen Skalpell angeschnitten und auseinander gebrochen. Zentral wurden dann mit einem sterilen Spatel Proben zu je 20 g entnommen und

im Stomacher mit 180 ml 0,9 % NaCl für 2 min homogenisiert. Aliquots der Suspensionen wurden dezimal verdünnt und auf MRS-Agar (pH 6,5, ohne Acetat) mit und ohne Zusatz von 0,05 % Cystein sowie auf Std-I-Agar plattiert. Die inokulierten Nährböden wurden zur Erfassung der regulären Rohwurstflora aerob bei 30 °C und zur Erfassung der probiotischen Bakterien anaerob bei 37 °C für mindestens 3 Tage inkubiert. Unterschiedliche Kolonietypen wurden getrennt ausgezählt. Pro Kolonietyp wurden 1-5 Einzelkolonien mikroskopisch und biochemisch differenziert. Zur Unterstützung der Identifizierung wurde ein mittels BOX-rep-APD erzeugter genetischer Fingerabdruck eingesetzt (MARTIN *et al.*, 1992; SELENSKA-POBELL *et al.*, 1995; KRÖCKEL, 1997, 1998a,b). Referenzstämme wurden, soweit nicht in der BfEL-Sammlung vor Ort vorhanden, von der DSMZ bezogen.

Probe 1 enthielt keinen der auf dem Etikett angegebenen Stämme („*Bifidus*, *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*“). Lediglich ein potentiell probiotisches Isolat von *Lb. rhamnosus* ( $1-6 \times 10^7$  KBE/g) konnte gegen den Hintergrund der konventionellen (Starter) MSB-Flora aus *Lb. sakei* ( $5 \times 10^8$  KBE/g) und *Pc. pentosaceus* ( $5 \times 10^7$  KBE/g) identifiziert werden. „*Bifidus*“ ist kein gültiger Name. Er könnte sich auf *Bifidobacterium* spp. beziehen, die in dieser Wurst nicht enthalten waren, oder auf den ungültigen Namen „*Lb. bifidus*“, wie in der Vergangenheit einige *Lb. sakei* Stämme genannt wurden. Ebenso zeigte keines der anderen Isolate Ähnlichkeiten mit *Lb. acidophilus*. Stattdessen wurden Stämme von *Carnobacterium piscicola* ( $10^7-5 \times 10^8$  KBE/g), *Lb. curvatus* ( $10^6-10^8$  KBE/g), *Lb. hilgardii* ( $4 \times 10^7$  KBE/g) und *Lb. farciminis* ( $1 \times 10^7$  KBE/g) gefunden. Die Übereinstimmungen zwischen klassischer Identifizierung und genetischem Fingerabdruck waren gut bei *Lb. sakei*, *Lb. rhamnosus* und *Pc. pentosaceus*, während die Isolate, die als *Lb. curvatus*, *Lb. hilgardii* und *Lb. farciminis* identifiziert wurden weniger Ähnlichkeiten zu den entsprechenden Referenzstämmen zeigten.

Bei Probe 2 wurde neben der „normalen“ MSB-Flora (*Lb. sakei* [ $5 \times 10^7$  KBE/g], *Lb.*

Tab. 1: Nachweis probiotischer Kulturen in probiotischer Rohwurst aus dem Handel

Rohwurst	1	2	3	4
Typ	weiche, schnell-gereifte, geräucherte Salami	sehr harte, luft-getrocknete Salami	schnellgereiftes, kleinkalibriges, geräuchertes Rohwürstchen	geräucherte, ab-getrocknete Salami mit 30 % Gewichts-verlust
Eigenschaften	pH 4,7; $a_w$ 0,954	pH 5,6	pH 4,9	n.b.
Herkunft	D	CH	D	D
Werbeaussage	„probiotische Geflügelsalami mit drei probiotischen Kulturen ( <i>Bifidus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> )“	„probiotisch“, mit Rind- und Schweinefleisch	„probiotische Kultur in hohen Keimzahlen ( $5 \times 10^8$ KBE/g)“ mit Rind- und Schweinefleisch	„Probiotisch !!!, naturgereift“, mit Rindfleisch und Pflanzenfett (kein Speck)
beworbene Kulturen nachweisbar	nein	keine Angaben	ja	keine Angaben
nachgewiesene potentiell probiotische Kultur	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
Keimzahl (KBE/g) der probiotischen Kultur	$1-6 \times 10^7$	$4-9 \times 10^7$	$3 \times 10^7$	$1 \times 10^7$

n.b., nicht bestimmt; D, Deutschland; CH, Schweiz

*curvatus* [ $6 \times 10^7$  KBE/g], *Pc. acidilactici* [ $4 \times 10^6$  KBE/g]) ein potentiell probiotisches Isolat, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* ( $4-9 \times 10^7$  KBE/g), identifiziert. Mit Ausnahme der potenziell probiotischen Flora waren die Zahlen der lebensfähigen MSB in dieser stark abgetrockneten Wurst etwa um den Faktor 10 niedriger als in Probe 1. In den Proben 3 und 4 wurde ebenfalls nur *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* als probiotische Kultur nachgewiesen ( $3 \times 10^7$  KBE/g und  $1 \times 10^7$  KBE/g).

Alle Proben enthielten demnach neben der regulären MSB-Flora auch Spezies, welchen ein probiotisches Potential zugesprochen wird, in Keimzahlen  $> 10^6$  KBE/g. Das alleine kann jedoch das Etikett „probiotisch“ nicht rechtfertigen, vor allem, wenn die angegebenen Bakterien nicht nachweisbar sind (Wurst 1) oder nicht genannt werden (Würste 2-4).

#### Überleben probiotischer Mikroorganismen in Salami

Probiotische Kulturen eines Starterkulturenherstellers, die als *Lb. casei* und *Bifidobacterium* (*Bif.*) *lactis* vermarktet werden, wurden alleine und zusammen mit Starter- und/oder Schutzkulturen des gleichen Herstellers nach dessen Verwen-

dungsvorschlägen eingesetzt. Die Überprüfung der Identität der Stämme mittels klassischer und molekularer Methoden (siehe unten) zeigte, dass es sich um die Species *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* und *Bif. animalis* subsp. *lactis* handelte. Die Rohwürste wurden im Institut für Technologie der BfEL Kulmbach produziert (KRÖCKEL und MÜLLER, 2006; Müller, 2006). Drei verschiedene Rindfleisch-Salamis (Kaliber 45) à 10 kg mit (1) 15 % Pflanzenfett, (2) 15 % Speck und (3) 25 % Speck und je 3 % NPS wurden hergestellt. Starter- und Schutzkulturen wurden in der üblichen Dosierung verwendet ( $10^6$ - $10^7$  KBE/g Brät), die Anfangskeimzahlen von *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* und *Bif. animalis* subsp. *lactis* lagen bei  $5 \times 10^6$  und  $10^7$  KBE/g Brät. Die Gesamtkeimzahlen der Milchsäurebakterien wurden auf MRS 5.7-Agar (30 °C, anaerob) erfasst, die Keimzahlen von „*Lb. casei*“ und von „*Bif. lactis*“ wie vom Kulturlieferanten empfohlen auf MRS5.7-Moxalactam- bzw. auf MRS5.7-Gentamycin / Ochsengalle / Cystein-Agar (37 °C, anaerob). Differenziert wurde zusätzlich anhand von Koloniemorphologie (Abb. 1), mikroskopischem Bild sowie im Zweifelsfall anhand biochemischer und genetischer Merkmale (Fermentationsmuster und genomisches Fingerprinting mittels BOX-PCR).

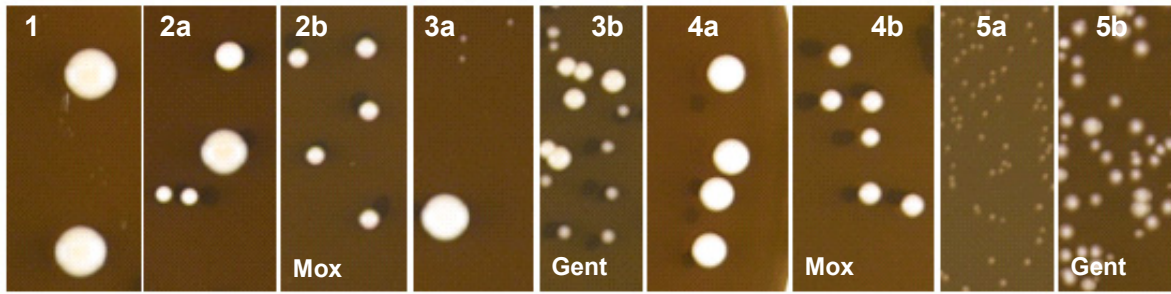


Abb. 1: Koloniebilder von Keimzählungen verschiedener Rohwurstchargen (Versuch 3 mit 25 % Speck, Tag 0, Chargen Ch2-6) auf MRS5.7-Nährboden unter selektiven und nicht selektiven Bedingungen. 1, Ch2 mit *Lb. plantarum*; 2, Ch3 mit *Lb. plantarum* und *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* ohne (2a) und mit (2b) Moxalactam; 3, Ch4 mit *Lb. plantarum* und *Bif. animalis* ohne (3a) und mit (3b) Gentamycin; 4, Ch5 mit *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* ohne (4a) und mit (4b) Moxalactam; 5, Ch6 mit *Bif. animalis* ohne (5a) und mit (5b) Gentamycin. Beachte: *Lb. plantarum* wächst auf MRS5.7-Gentamycin-Galle-Cystein-Agar (3b), nicht aber auf MRS5.7-Moxalactam-Agar (2b). *Bif. animalis* wächst auf MRS5.7-Gentamycin-Galle-Cystein-Agar besser (5b) als auf MRS5.7-Agar (kleine Kolonien in Teilbild 3a und 5a).

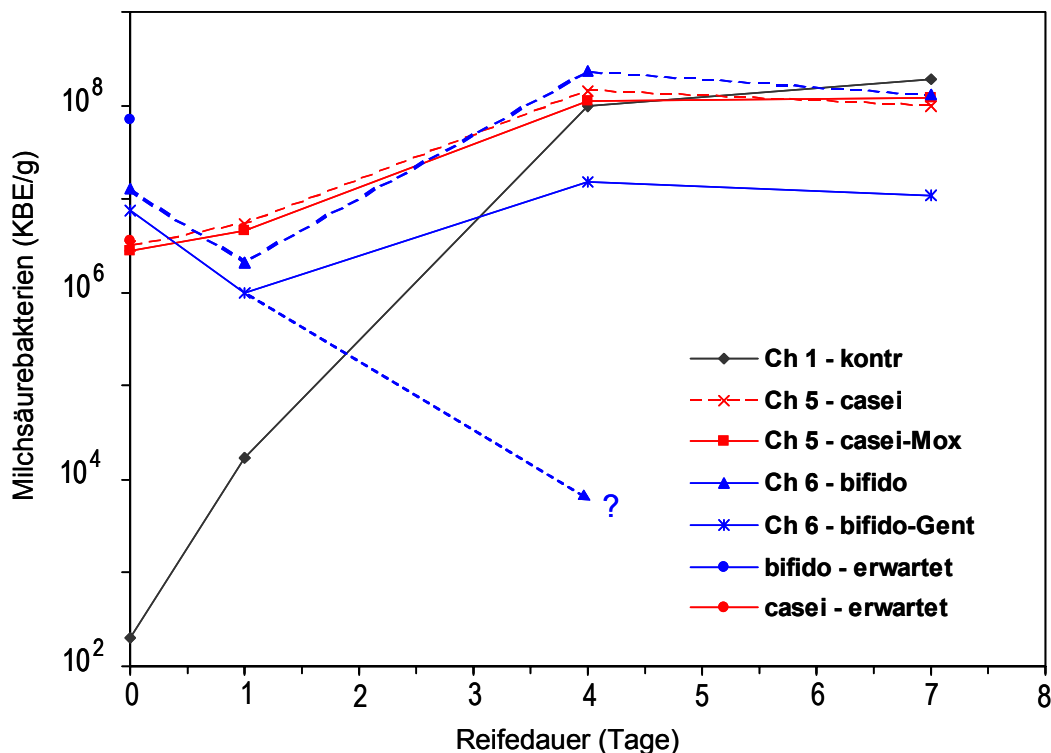


Abb. 2: Keimzahlverlauf der Milchsäurebakterien in Rindfleisch-Salami mit 25 % Speck, ohne und mit Zusatz probiotischer Bakterien (mit und ohne Selektivnährboden). Ch1, Kontrollcharge ohne Zusatz von MSB, Koloniezahl (KZ) auf MRS5.7 bei 30 °C; Ch5, Charge mit Zusatz von *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, KZ auf MRS5.7 bei 30 °C (Ch5-casei) und KZ auf MRS5.7-Moxalactam-Agar bei 37 °C (Ch5-casei-Mox); Ch6, Charge mit Zusatz von *Bif. animalis* subsp. *lactis*, KZ auf MRS5.7 bei 30 °C (Ch6-bifido) und KZ auf MRS5.7-Gentamycin-Agar bei 37 °C (Ch6-bifido-Gent); bifido-erwartet und casei-erwartet, aufgrund der zugesetzten Bakteriensuspension erwartete KZ an Tag 0. Beachte: Der MRS5.7-Gentamycin-Agar erwies sich als nicht selektiv für *Bif. animalis* subsp. *lactis* (vgl. Text). Für den Anstieg der KZ von Tag 1 auf Tag 4 auf diesem Nährboden sind ausschließlich fleischeigene MSB verantwortlich. Die wahrscheinliche Entwicklung der zugesetzten Bifidobakterien in Ch6 ist mit einem nach unten gerichteten Pfeil mit „?“ gekennzeichnet.

Dabei zeigte sich, dass *Bif. animalis* nur zu Beginn der Reifung (Tag 0 und Tag 1) in signifikanten Keimzahlen nachweisbar war ( $> 10^6$  KBE/g). An Tag 4 war dieser Keim vor dem Hintergrund der Spontan- oder Starterflora nicht mehr zu detektieren (Abb. 2). Bereits an Tag 0 wurden weniger als 20 % der erwarteten Keimzahl erhalten. An Tag 1 waren davon wiederum nur 16 % nachweisbar. *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* war dagegen in jedem Fall stabiler und in der Lage in der Rohwurst zu wachsen. Der Stamm zeigte bei Abwesenheit und Gegenwart von Starter- und Schutzkulturen noch  $10^7$ - $10^8$  bzw.  $10^6$ - $10^7$  KBE/g in der fertigen Salami. Aus technologischer und sensorischer Sicht waren die Chargen, die nur mit *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* fermentiert wurden, nicht zu beanstanden. Der Moxalactam-

Nährboden war in allen Fällen selektiv für *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* (kein Wachstum von Milchsäurebakterien aus der Spontanflora bzw. der verwendeten Starter- und Schutzkulturen). Der Gentamycin-Ochsengalle-Cystein-Nährboden eignete sich dagegen nicht für eine selektive Keimzählung von *Bif. animalis* unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C. Er ermöglicht nicht nur das Wachstum von *Lb. plantarum* (Abb. 1 Teilbild 3b) sondern auch von fleischeigenen *Lb. sakei* Stämmen (in Abb. 1 nicht gezeigt). Grund dafür dürfte sein, dass die Resistenz gegen Gentamycin u.a. auch innerhalb der *Lb. sakei/curvatus* Gruppe weit verbreitet ist (AYMERICH *et al.*, 2006). Alle Isolate ließen sich mittels BOX-rep-APD eindeutig identifizieren (Abb. 3).

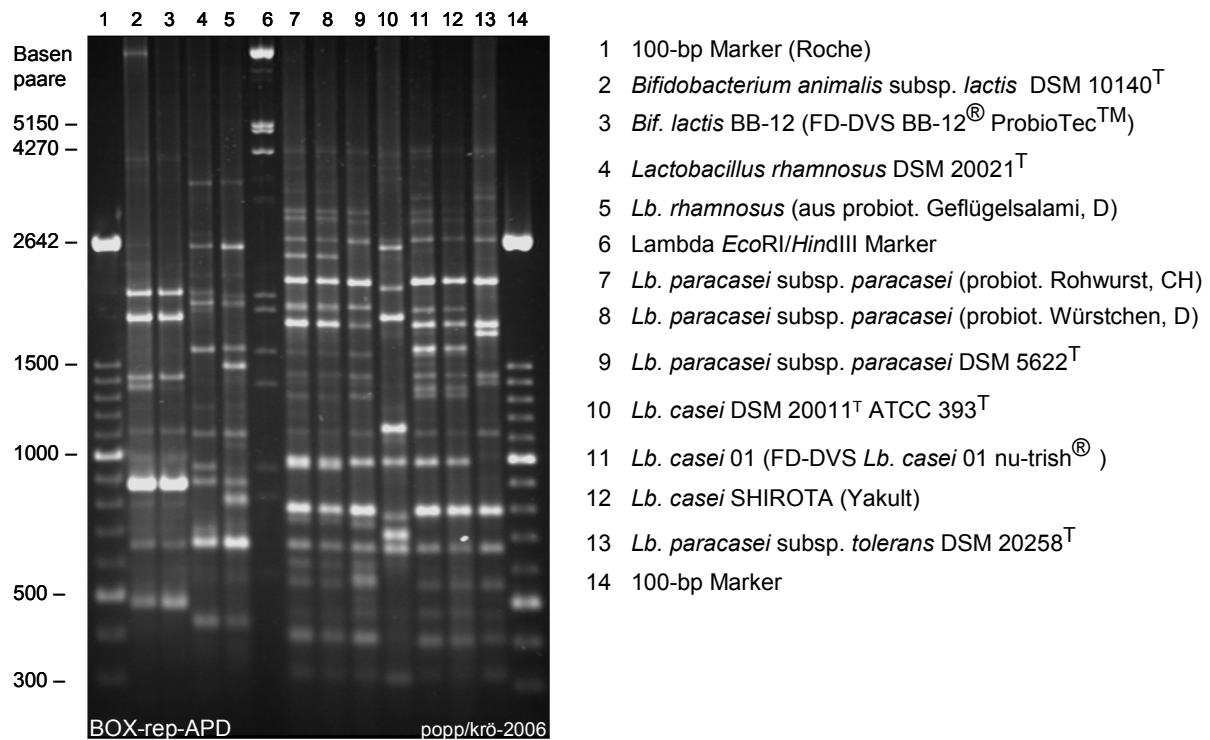


Abb. 3: Genetischer Fingerabdruck (BOX-rep-APD Profile) probiotischer Bakterien aus Rohwurst und kommerziellen Kulturen im Vergleich zu definierten Referenzstämmen

### Perspektiven für probiotische Mikroorganismenkulturen bei Fleisch-erzeugnissen

Es gibt zur Zeit keine Studien, die eine eindeutige, langfristige Gesundheitswir-

kung durch den Verzehr probiotischer Rohwürste belegen. In einer Studie wurden jedoch Hinweise gefunden, die auf eine immunstimulierende Wirkung beim Menschen nach regelmäßigem Verzehr von mit *Lb. paracasei* gereifter Rohwurst



hindeuten (JAHREIS *et al.*, 2002). Die fehlenden Belege und die damit verbundenen Unsicherheiten sind ein wesentlicher Grund, warum bis heute nur wenige Hersteller probiotische Fleischerzeugnisse anbieten.

Mittelfristig könnten sich neben *Lb. casei/paracasei* auch bestimmte Stämme von *Lb. plantarum* und *Lb. pentosus* als probiotische Kulturen für Rohwurst etablieren. Stämme der letzten beiden Spezies werden schon lange als Starterkulturen für Rohwurst vermarktet. *Lb. casei* Stämme wurden dagegen traditionell bei der Herstellung von Milcherzeugnissen eingesetzt und werden erst seit kurzem auch als Starterkulturen für die Herstellung von Rohwurst angeboten.

Es wird im Einzelfall zu prüfen sein, welche Produkte sich mit den neuen probiotischen Kulturen herstellen lassen, da spontan reifende Rohwürste europäischen Typs in der Regel von den in diesem Milieu wesentlich konkurrenzfähigeren Spezies *Lb. sakei* und *Lb. curvatus* dominiert werden (AYMERICH *et al.*, 2006; DOßMANN *et al.*, 1998). Die technologische Eignung neuer Stämme ist dabei ein wichtiges Auswahlkriterium. Als Starterkulturen mit probiotischen Eigenschaften wurden bisher mit Erfolg *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum* und *Lb. pentosus* eingesetzt (BUNTE *et al.*, 2000; ERKKILÄ *et al.*, 2001; KLINGBERG *et al.*, 2005).

Die Entwicklung eines Marktes für probiotische Fleischerzeugnisse wird aber auch wesentlich von der Entwicklung der europäischen Rechtssetzung zu gesundheitsbezogenen Angaben bei Lebensmitteln abhängen. Die formelle Annahme der neuen europäischen *Regelung über nährwert- und gesundheitsbezogene Aussagen bei Lebensmitteln* durch den Rat der Europäischen Union wird voraussichtlich im Herbst 2006 erfolgen. Sie legt fest, dass derartige Aussagen wahr, klar und verständlich sein müssen und auf gesicherten wissenschaftlichen Grundlagen beruhen müssen. Darüber hinaus darf eine nährwertbezogene Angabe nur gemacht werden, wenn das betreffende Lebensmittel ein bestimmtes Nährwertprofil (z. B.

geringer Gehalt an Salz, Fett und/oder Zucker) aufweist (ANONYMUS, 2006a,b). Eine nährwertbezogene Angabe bleibt jedoch auch dann noch zulässig, wenn ein Nährstoff (etwa Salz oder Zucker oder Fett) den Höchstwert übersteigt. Dies muss aber gut sichtbar unmittelbar neben der Angabe und in gleichwertiger Darstellung auf dem Etikett vermerkt sein.

## Literatur

- Ahrné, S., S. Nobaek, B. Jeppsson, I. Adlerberth, A. E. Wold, G. Molin (1998) The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *J. Appl. Microbiol.* 85, 88-94
- Alander, M., I. de Smet, L. Nollet, W. Verstraete, A. von Wright, T. Mattila-Sandholm (1999) The effect of probiotic strains on the microbiota of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME). *Int. J. Food Microbiol.* 46, 71-79
- Andersen, L. (1998) Fermented dry sausage produced with the admixture of probiotic cultures. *Proceedings of the 44<sup>th</sup> ICoMST*, pp. 826-827
- Anonymus (2006a) Kommissar Kyprianou begrüßt Zustimmung des Europäischen Parlaments zur Verordnung über Nährwert- und Gesundheitsangaben.  
<http://europa.eu.int/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP/06/625&format=HTML&aged=0&language=DE>
- Anonymus (2006b) Klare Verbesserung beim Verbraucherschutz durch Verbot irreführender Werbung. BMELV Pressemitteilung Nr. 092 vom 16.05.2006
- Anonymus (2006c) DGE-Infos (Die neuen 10 Regeln der DGE, Cholesterin im Blut, Viele Fragen zur richtigen Ernährung im Alter). [www.dge.de](http://www.dge.de)
- Anonymus (2006d) DLG-Qualitätswettbewerb Schinken und Wurst. Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft e. V.  
<http://www.dlg.org/de/ernaehrung/wurstfleisch/wursttest.html>, <http://www.dlg.org/de/ernaehrung/wurstfleisch/schinkencheck06.html>
- Aymerich, T., B. Martin, M. Garriga, M.C. Vidal-Carou, S. Bover-Cid, M. Hugas (2006) Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* 100, 40-49
- Bunte, C., Hertel, C., Hammes, W. P. (2000) Monitoring and survival of *Lactobacillus paracasei* LTH 2579 in food and the human intestinal tract. *Syst. Appl. Microbiol.*, 23, 260-266
- Chavagnat, F., M. Haueter, J. Jimeno, M.G. Casey (2002) Comparison of partial *tuf* gene sequences for the identification of lactobacilli. *FEMS Microbiol. Lett.* 217, 177-183
- Doßmann, M.U., P. Klostermaier, R.F. Vogel, W.P. Hammes (1998) Einfluss ökologischer Faktoren

- auf die Wettbewerbskraft von *L. pentosus* und *L. sakei*. *Fleischwirtschaft* 78 (8), 905-908
- Erkkilä, S., M.L. Suihko, S. Eerola, E. Petaja, T. Mattila-Sandholm (2001) Dry sausage fermented by *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 64, 205-210
- Groeneveld, M. (1999) Funktionelle Lebensmittel - Gesundheit aus dem Supermarkt? *aid Heft* 1390, S. 17
- Hammes, W.P., D. Haller (1998) Wie sinnvoll ist die Anwendung von Probiotika in Fleischwaren? *Fleischwirtschaft* 78 (4), 301-306
- Hammes, W.P., C. Hertel (1998) New developments in meat starter cultures, *Meat Science* 49 (1998) (Suppl. 1), 125-138
- Heller, K.J. (2001) Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am. J. Clin. Nutrition* 73, 374S-379S
- Jahreis, G., H. Vogelsang, G. Kiessling, R. Schubert, C. Bunte, W.P. Hammes (2002) Influence of probiotic sausage (*Lactobacillus paracasei*) on blood lipids and immunological parameters of healthy volunteers. *Food Res. Int.* 35, 133-138
- Klingberg, T.D., L. Axelsson, K. Naterstad, D. Elsser, B.B. Budde (2005) Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 419-431
- Kröckel, L. (1997) Differenzierung von *Lactobacillus sake* und *L. curvatus* mittels BOX-rep-APD. *Mittbl. Bundesanst. Fleischforsch. Kulmbach*, 36 (137), 286-294
- Kröckel, L. (1998) Differenzierung von Milchsäurebakterien mittels BOX-rep-APD. *Mittbl. Bundesanst. Fleischforsch. Kulmbach* 37 (139), 5-14
- Kröckel, L. (1998) Fingerprints of lactic acid bacteria derived by BOX-rep-APD. *International Symposium on Probiotics and Prebiotics*, Kiel, Germany, June 11th-12th 1998, Book of Abstracts / Poster #1
- Kröckel, L., W.-D. Müller (2006) Überleben probiotischer Mikroorganismen in Salami. *BfEL, Jahresbericht* 2005
- Leroy, F., J. Verluyten, L. De Vuyst (2006) Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 270-285
- Lücke, F.-K. (1998) Fermented sausages. In: B.J.B. Wood (ed.), *Microbiology of Fermented Foods*. Blackie Academic and Professional, London, pp. 441-483
- Martin, B., O. Humbert, M. Camara, E. Guenzi, J. Walker, T. Mitchell, P. Andrew, M. Prudhomme, G. Allong, R. Hackenbeck, P.A. Morrison, G.J. Boullnois, J.P. Claveris (1992) A highly conserved repeat element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucl. Acids Res.* 20, 3479-3483
- Masco, L., M. Ventura, R. Zink, G. Huys, J. Swings (2004) Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 54, 1137-1143
- Masco, L., G. Huys, E. De Brandt, R. Temmerman, J. Swings (2005) Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 221-230
- Molin, G., B. Jeppsson, M. L. Johansson, S. Ahmé, S. Nobaek, M. Ståhl, S. Bengmark (1993) Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 314-323
- Müller, W.-D. (2006) Funktionelle Fleischerzeugnisse – Rohwürste. 41. *Kulmbacher Woche* 9.-10. Mai 2006, Kurzfassung der Fachvorträge, S. 41-42
- Petäjä, E., T. Manninen, P. Smidtslund, K. Sipilä, (2003) Probiotic lactic acid bacteria as starters – applicability in raw ham and in fermented meat products made from coarsely ground pork. *Fleischwirtschaft* 83, 97-102
- Pidcock, K., G.M. Heard, A. Henriksson (2002) Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. *Int. J. Food Microbiol.* 76, 75-81
- Pretzer, G., J. Snel, D. Molenaar, A. Wiersma, J. Lambert, W.M. de Vos, R. van der Meer, M.A. Smits, M. Kleerebezem (2005) Biodiversity-based identification and functional characterization the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 187, 6128-6136
- Reid, G., S.O. Kim, G.A. Kohler (2006) Selecting, testing and understanding probiotic microorganisms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 46, 149-157
- Roy, D., P. Ward, D. Vincent (1999) Strain identification of probiotic *Lactobacillus casei*-related isolates with randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis methods. *Biotechnology Techniques* 13, 843-847
- Roy, D., P. Ward (2004) Comparison of fructose-1,6-bisphosphatase gene (*fbp*) sequences for the identification of *Lactobacillus rhamnosus*. *Current Microbiol.* 49, 313-320
- Selenska-Pobell, S., E. Evguenieva-Hackenberg, O. Schwickerath (1995) Random and repetitive primer amplified polymorphic DNA analysis of five soil and two clinical isolates of *Rahnella aquatilis*. *System. Appl. Microbiol.* 18, 425-438