

Gelbe Farbabweichungen bei vorverpackten, kühl gelagerten Weißwürsten werden durch *Leuconostoc gelidum* verursacht

Yellow discolorations of prepackaged refrigerated German 'Weißwurst' are due to *Leuconostoc gelidum*

L. KRÖCKEL

Zusammenfassung

Leuconostoc gelidum wurde als Ursache einer ungewöhnlichen „neongelben“ Verfärbung des Naturdarms bei vorverpackten, kühl gelagerten Weißwürsten identifiziert. Die Bakterien selbst waren nicht pigmentiert sondern produzierten eine diffussible gelbe Verbindung, die sowohl die Wursthülle als auch die Wurstoberfläche unter der Hülle färbte. Gelbe Farbabweichungen konnten durch gezielte Inokulation von *Leuc. gelidum* auf Weißwurst, Gelbwurst, Kochschinken, Putenschinken, Tofu, Mozzarella und Milchagar erzeugt werden. Keine der anderen Mikroorganismen, die von gelb verfärbten Fleischerzeugnissen isoliert wurden, waren dazu in der Lage. Die chemische Identität der gelben Verbindung konnte bislang nicht geklärt werden. Es handelt sich um eine hydrophobe Verbindung mit einem Molekulargewicht, das kleiner als das von Schweinefett ist (< 800 Da).

Summary

Leuconostoc gelidum was identified as the cause of an unusual 'neon-yellow' discolouration of the natural casings of prepackaged refrigerated German 'Weisswurst', a Bologna-type sausage produced without nitrite. The causative bacterial strains were not pigmented but produced a diffusible yellow compound which stained both, casing and the sausage surface beneath the casing. Sausages, cooked hams, tofu, mozzarella and milk agar experimentally inoculated with *Leuc. gelidum* turned yellow at the site of inoculation. All other microbial isolates from defective products were unable to stain the sausages. At present, the chemical identity of the yellow compound remains unclear. It is hydrophobic in nature and has a molecular weight which is lower than that of pork fat (< 800 Da).

Schlüsselwörter *Leuconostoc gelidum* – psychrotrophe Milchsäurebakterien – gelbes Stoffwechselendprodukt – vorverpackte, kühl gelagerte Weißwurst – gelbe Flecken – Verfärbungen – Kochschinken – Tofu – Milch

Key Words *Leuconostoc gelidum* – psychrotrophic lactic acid bacteria – yellow metabolic end product – prepackaged refrigerated 'weisswurst' – yellow spots – discolourations – cooked ham – tofu – milk

Einleitung

Die Vorverpackung von Fleisch und Fleischerzeugnissen hat in den letzten Jahrzehnten stetig zugenommen. Die Verbraucher sind inzwischen so an diese Vertriebsformen gewöhnt, dass selbst Ökoprodukte sich diesem Trend kaum mehr entziehen können. Auch die bayerische Weißwurst, die früher das berühmte Zwölfuhrläuten nicht mehr hören sollte, wird heute vorverpackt und unter Kühl-

lagerung bei 4-7 °C mit einer Haltbarkeit von bis zu 4 Wochen angeboten. Die Verpackung erfolgt in Polyethylenfolien (PE) entweder unter Vakuum oder unter modifizierter Atmosphäre. Im letzten Fall wird die „normale“ Luft der Packung in der Regel gegen ein Kohlendioxid/Stickstoff-Gemisch (30 % CO₂, 70 % N₂) ausgetauscht. Großhersteller bieten häufig nachpasteurisierte, Vakuum verpackte Erzeugnisse an. In diesen Fällen wird die Ware nach dem Verpacken einem zweiten

Erhitzungsschritt, etwa 10 min bei 80 °C, unterzogen. Damit sollen Bakterien inaktiviert werden, die während des Verpackens als sog. Rekontaminanten auf das Fleischergebnis gelangen. Problematisch für vorverpackte, kühl gelagerte Weißwürste sind, ähnlich wie für Kochschinken- und Brühwurstaufschnitt, vor allem psychrotrophe Keime der Art *Listeria monocytogenes* sowie bestimmte Milchsäurebakterien, die sich im Laufe der Kühllagerung vermehren können. Unter den Milchsäurebakterien, die in überlagerten Packungen dominieren, findet man regelmäßig Arten der Gattungen *Lactobacillus*, *Leuconostoc* und *Carnobacterium*, gelegentlich auch *Weissella*. Typische Vertreter sind *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc carnosum*, *Carnobacterium piscicola*, *Carnobacterium divergens* und *Weissella viridescens*. Diese Bakterien können hohe Keimzahlen erreichen, die im Falle von *L. monocytogenes* bei prädisponierten Verbrauchern eine Listeriose hervorrufen können. Eine starke Vermehrung von Milchsäurebakterien kann zu sensorischen Beeinträchtigungen führen. Da Weißwürste in der Regel warm serviert und somit vor dem Verzehr repasteurisiert werden, handelt es sich bei ihnen um mikrobiologisch relativ sichere Produkte. Sensorische Beeinträchtigungen können durch rein chemische Fettoxidation (z.B. Aufwärmgeschmack, Altgeschmack) oder durch mikrobielle Aktivitäten (z.B. Säuerung) zu Stande kommen. Das Ausmaß der mikrobiell bedingten sensorischen Defekte hängt wesentlich von der Art der beteiligten Bakterien, der Lagerdauer, den Lagerbedingungen sowie von der Rezeptur ab. Während mild säuernde, homofermentative Milchsäurebakterien in nicht gezuckerten Produkten bei 5-7 °C und bei angemessener Lagerdauer sensorisch relativ unbedenklich sind, können heterofermentative Milchsäurebakterien, die neben Milchsäure auch Ethylalkohol, Essigsäure, Diacetyl, Wasserstoffperoxid, Kohlendioxid u.a. bilden, deutliche sensorische Defekte hervorrufen.

Anlass für die nachfolgenden Untersuchungen war die Anfrage eines Herstellers von Ökofleischerzeugnissen aus dem südbayerischen Raum, der Probleme mit „neongelben“, fleckigen Verfärbungen auf

vorverpackten, kühl gelagerten Weißwürsten und vergleichbaren Erzeugnissen (Schweinsbratwurst, Kalbsbratwurst) hatte, die im Laufe der Kühllagerung hervortraten. Eine mikrobiologische Ursache schien wahrscheinlich, da das Problem lagerungsbedingt auftrat und durch Nachpasteurisieren der verpackten Erzeugnisse gelöst werden konnte.

In diesem Beitrag wird gezeigt, dass *Leuc. gelidum* für die genannten Farbveränderungen verantwortlich ist. Das gelbe Stoffwechselendprodukt wird auf den unterschiedlichsten Substraten und ausschließlich bei Kühltemperaturen produziert.

Material und Methoden

Untersuchungsgut

Mikrobiologische Untersuchungen wurden an einer Reihe von Fleischerzeugnissen mit und ohne grünlich-gelbe („neongelbe“) fleckige Verfärbungen durchgeführt. Dabei handelte es sich um Erzeugnisse aus ökologischer (Weißwurst, Schweinsbratwurst, Kalbsbratwurst) sowie konventioneller (Weißwurst, „Rostbratwurst“, Putenbrust) Herstellung. Nicht verfärbte Weißwürste verschiedener Hersteller aus dem Supermarkt/Discounter-Bereich wurden bei 5 °C weitergelagert und eine Woche nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums untersucht. Eine Weißwurstprobe aus dem Fleischerhandwerk wurde am Tag der Herstellung Vakuum verpackt und vor der Untersuchung 27 Tage bei 5 °C gelagert.

Die Proben aus ökologischer Produktion waren nach Angabe des Herstellers ohne Phosphat gefertigt, am Tag nach der Herstellung verpackt (Vakuumpackung sowie „Aromapackung“) und unter Kühlung gelagert worden. Nach 5 Tagen Kühllagerung waren gelbe Punkte auf den Würsten erkennbar. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Proben unter Kühlung zur Untersuchung versandt. Von Tag 6 bis zur Untersuchung am Tag 16 wurden die eingesandten Proben bei 4-5 °C weitergelagert.

Die „Rostbratwurst mit Bärlauch“ (Spezifikation/Auslobung: Spitzenqualität, im Frischepack unter Schutzatmosphäre verpackt, DLG-prämiert, 95 % Schweine-

fleisch, Säureregulatoren [Natriumlactat, Natriumacetat], Dextrose, Glucosesirup, Würze, Saitling, Gewürze, jodiertes Speisesalz) eines südbayerischen Herstellers aus dem Discount-Einzelhandel mit 8 Tagen Restlaufzeit (gekühlt bei +7 °C) wies bei zwei der vier Würste der Packung 4-9 mm² große gelbe Flecken auf.

Bei der Putenbrust (22 Fächerpackungen zu je 5 Scheiben pro Packung, Scheibendurchmesser: 9,6 cm, Scheibendicke: 1,5 mm, Scheibengewicht: 16-17 g) handelte es sich um Vakuum verpackten Aufschnitt einer gekochten, gepökelten (20 % Pökellake: 10,2 % NPS, 0,2 % Ascorbat, 1,8 % Na-di-phosphat) und geräucherten Putenbrust aus einem Versuch der BfEL-Kulmbach zur Qualität von Putenbrust in Abhängigkeit von der Tiererzeugung. Der Aufschnitt wurde zunächst 14 Tage bei 2 °C gelagert, zur Bestimmung des Tropfsaftverlustes trocken getupft und zurückgewogen, wieder verpackt und (außerplanmäßig) weitere 50 Tage bei 2 °C gelagert. Die einzelnen Scheiben wiesen danach eine unterschiedliche Anzahl gelber Punkte von ca. 1 mm Durchmesser auf.

Analyse der Mikroflora von Fleisch-erzeugnissen

Die Keimzahlen der aeroben mesophilen Mikroflora, der Milchsäurebakterien (MSB), *Micrococcaceae*, GRAM-negativen Mikroflora (*Enterobacteriaceae*, Pseudomonaden) sowie Hefen wurden im Spatelverfahren auf Std-I-, MRS6.5 (MRS, pH 6,5), MSE-, VRBG- und MEA(+)-Nährböden bei 30 °C bzw. 25 °C für MEA(+) bestimmt. Die psychrotrophe Flora wurde bei 5 °C auf Std-I- und MRS6.5 Nährböden erfasst. *Micrococcaceae*, *Brochothrix thermosphacta* und Pseudomonaden wurden anhand der Koloniemorphologie, mikroskopisch und m.H. differentialdiagnostischer Schnelltests auf Std-I-Agar unterschieden. *Brochothrix* war mikroskopisch und auf Grund seiner Kolonieform auf Std-I-Agar einfach und eindeutig zu identifizieren; einzelne Kolonien wurden durch genomisches Fingerprinting bestätigt (KRÖCKEL, 1998). Die Identifizierung von Milchsäurebakterien erfolgte mit Unterstützung mikroskopischer, biochemischer („Bunte Reihe“) und molekulargenetischer (genomisches Fingerprinting mittels BOX-

rep-APD) Methoden (KRÖCKEL, 1998; KRÖCKEL *et al.*, 2003). Fertignährmedien und benötigte Chemikalien wurden soweit nicht anders vermerkt von MERCK bezogen. Agar-Agar wurde von RIEDEL-DE HAEN bezogen.

Zur Erfassung der anteiligen Zusammensetzung der MSB-Flora wurden jeweils gleiche Kolonietypen zusammengefasst. Von jedem Kolonietyp wurden je ein bis sechs Isolate identifiziert. Dabei wurden sowohl die Ergebnisse von MRS6.5- als auch von Std-I-Agar herangezogen.

Physikalisch-chemische und sensorische Untersuchungen

Die Konzentrationen von Sauerstoff und Kohlendioxid in der Schutzatmosphäre verpackter „Rostbratwurst“ wurden mittels eines „Combi Check 9800-1“ (PBI-Dansensor GmbH, Neuwied) bestimmt. Die pH-Werte wurden in der 1/10-Verdünnung der Probe in 0,9 % NaCl-Lösung gemessen. Die sensorische Bewertung der gelagerten Fleischerzeugnisse erfolgte visuell und olfaktorisch.

Mikroorganismen

Als Referenzorganismen für die Identifizierung von Neuisolaten dienten *Leuconostoc (Leuc.) gasicomitatum* LMG 18811, *Leuc. gelidum* DSM 5578, *Leuc. carnosum* DSM 5576, *Leuc. citreum* ATCC 10882, *Leuc. lactis* DSM 20192, *Leuc. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* DSM 20343, *Leuc. pseudomesenteroides* DSM 20193, *Lactobacillus (Lb.) sakei* BAFF-Lb 674, *Lb. curvatus* BAFF-Lb 1071, *Carnobacterium (Carn.) divergens* DSM 20623, *Carn. piscicola* DSM 20730, *Weissella viridescens* DSM 2041 und *Brochothrix (Broch.) thermosphacta* DSM 20171.

Zur Inokulation von Weißwurst u. a. Substraten wurden die genannten Referenzorganismen sowie Eigenisolate von *Leuc. gelidum*, *Leuc. carnosum*, *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Broch. thermosphacta* und andere von verschiedenen Fleischerzeugnissen mit gelben Verfärbungen erhaltene Isolate als Reinkulturen eingesetzt. Impfsuspensionen wurden aus Exsudat/Kondensat („Weißwurstsaft“) bzw. durch Abschwemmen der Weißwurst mit 0,9 % NaCl-Lösung gewonnen; Reinkulturen

wurden in NaCl-Lösung gewaschen und resuspendiert. Die Impfsuspensionen wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 10-15 % Glycerin aufbewahrt.

Spezialnährmedien

Für Untersuchungen zum Einfluss des Substrates auf die Produktion des gelben Stoffwechselproduktes wurde eine Reihe von Spezialnährmedien auf Basis des Std-I-Nährbodens eingesetzt.

Milchmedium wurde mit Std-I-Agar bzw. Std-Bouillon und H-Milch (mit 3,5 % Fett) an Stelle von Wasser hergestellt. Für die Herstellung des Milchagars wurden entweder 37 g/l Std-I-Nährboden oder 12 g/l Agar-Agar in H-Milch maximal für 30 min im Dampftopf gelöst und, ohne vorheriges Autoklavieren, nach Abkühlen auf $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ gegossen und nach Verfestigung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Für Nährböden mit Schmalz, Paraffin und Octadecan wurden 37 g/l Std-I-Agar im Dampftopf aufgelöst, 5 g Xanthan Gum (Keltrol F von Kelco/AIL International GmbH, Hamburg) sowie jeweils eines der folgenden Substrate zugesetzt:

1. 20 ml Schweineschmalz
 - 1.1 ohne zusätzliche C-Quelle
 - 1.2 mit 0,5 % Glucose
 - 1.3 mit 0,5 % Saccharose
 - 1.4 ohne weitere Zusätze
2. Paraffin
 - 2.1 20 ml dickflüssiges Paraffin (MERCK Kat.Nr. 107160)
 - 2.2 20 g Hartparaffin (Erstarrungspunkt $51-53\text{ }^{\circ}\text{C}$, MERCK Kat.Nr. 107157)
 - 2.3 20 g Paraffin (dickflüssig:hart = 2:1)
3. 10 g n-Octadecan

Anschließend wurden die Nährböden 2 min mit einem Ultra Turrax T25 (Janke und Kunkel, IKA Labortechnik) homogenisiert, autoklaviert ($121\text{ }^{\circ}\text{C}/15\text{ min}$) und wie oben gegossen und gelagert.

Inkubation von inokulierten Nährmedien und Fleischerzeugnissen

Zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Farbstoffbildung wurden die (Spezial-) Nährmedien bei 5, 12, 18 und $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Inokulierte Fleischerzeugnisse wurden bei $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, in einigen Fällen

(Weißwürste) auch bei $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anaerobe Bedingungen in Siegelrandbeuteln und Anaerobiertöpfen wurden mittels Anaerocult-IS (MERCK) erzeugt. Nährböden wurden bei Bedarf vor der Inokulation unter anaeroben Bedingungen vorgelagert.

Inokulation von Fleischerzeugnissen

Es wurden Inokulationsstudien mit verschiedenen Fleischerzeugnissen durchgeführt. Als Inokulum wurden Impfsuspensionen von gelagerten Weißwürsten mit und ohne Gelbfärbung sowie daraus isolierte Reinkulturen verwendet. Zum Vergleich wurden außerdem entsprechende Referenz- bzw. Typ-Stämme eingesetzt. Je $30\text{ }\mu\text{l}$ der Impfsuspension wurden strichförmig auf dem Fleischerzeugnis verteilt. Die Proben wurden anschließend in Siegelrandvakuumbutel verpackt (Siegelrandvakuumbutel Typ SR, Größe: $200\times 300\text{ mm}$, Zusammensetzung: Polyamid/Polyethylen = 20/70, O_2 -Durchlässigkeit bei $23\text{ }^{\circ}\text{C}$: $50\text{ cm}^3/\text{m}^2$ nach DIN 53380, Hersteller: allfo Vakuumverpackungen, Waltenhofen, Deutschland) und unter den jeweils gewählten Bedingungen gelagert, z. B. bei $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10-20 Tage.

Weißwürste (mit und ohne Petersilie) für Inokulationszwecke wurden von einer lokalen Metzgerei (Hersteller FT) am Tag der Herstellung gekauft, 10 min in 0,9 % NaCl-Lösung bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt, in kalter steriler NaCl-Lösung abgekühlt, 15 min hängend an der Luft getrocknet und anschließend beimpft. Nach 15 min Einwirken der Impfsuspension wurden die Würste in die Siegelrandbeutel verpackt.

Für Vergleichszwecke wurde in einem Fall auch Weißwurst von einer zweiten Metzgerei (Hersteller KF) mit einbezogen. Zusätzlich wurden Gelbwurst (Hersteller KK) sowie Gelbwurstbrät im „Weißwurst darm“ (Hersteller FT), Kochschinken (vom Schwein, Hersteller FT), Putenpressschinken (Hersteller KH), und Kaiserfleisch (aus Schweinekamm, Hersteller FT) beimpft.

Inokulation von Tofu, Feta und Mozzarella

Ein 250 g Block Tofu (Yamato Bio-Tofu Pur; Zutaten: Wasser, Sojabohnen, Säure-

regulator [CaSO₄, CaCl₂]; pH 6,1; Zusammensetzung: 12 g Eiweiß, 7 g Fett, 1,5 g Kohlenhydrate) wurde 3 x 1 h in je 800 ml sterilem *aq. dest.* unter leichtem Rühren gewässert, mit Papierhandtüchern abgetupft und mit einem sterilen Skalpell in 1 cm dicke Scheiben geschnitten. Die Scheiben wurden mit je 30 µl Bakterien-suspension (10⁸-10⁹ KBE/ml) beimpft und wie oben verpackt und gelagert. Alternativ wurde auch granoVita Bio-Tofu (mit 7,1 % Fett, davon 1,1 g gesättigte Fettsäuren; 1,1 g Kohlenhydrate, pH 5,74) eingesetzt. Bio-Ziegenfeta (48 % Fett i.Tr., pH 4,62) sowie Bio-Mozzarella aus Kuhmilch (45 % Fett i.Tr., pH 5,41) wurden analog behandelt. Die pH-Werte wurden vor dem Wässern gemessen.

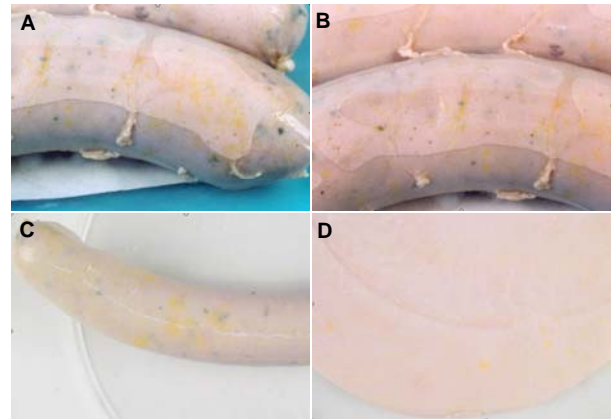


Abb. 1: Gelbe Verfärbungen auf vorverpackten Fleischerzeugnissen. A und B, Weißwurst aus ökologischer Herstellung; C, Grillwürstchen aus konventioneller Herstellung; D, Putenbrustaufschnitt aus konventioneller Herstellung

Ergebnisse

Analyse der Mikroflora von Fleischerzeugnissen

Wurstproben aus ökologischer Herstellung.

Von 11 eingesandten Weißwurst- (n=4), Schweinsbratwurst- (n=3) und Kalbsbratwurst- (n=4) Proben zeigten 5 gelbe, fleckige Verfärbungen. Die gelben Flecken waren schwach erkennbar, verstreut, kleinflächig und sporadisch bis häufig sichtbar (Abb. 1A und B). Die Verfärbungen schienen zunächst mit Unregelmäßigkeiten der Wursthülle („Adern“, „Warzen“, „Zotten“, schleimreicheren Stellen) assoziiert zu sein und stellten sich unter dem Stereomikroskop als diffuses Gelb ohne Herd dar.

Vakuum verpackte Würste waren von 2-9 ml einer trüben Flüssigkeit (Exsudat)

umgeben, Proben unter Schutzatmosphäre von 1-3 ml trübem Kondensat. Alle mikrobiologisch untersuchten Würste enthielten ca. 10⁸ KBE/ml Milchsäurebakterien und maximal 10⁵ KBE/g *Micrococccaceae*, *Pseudomonaden* und Hefen. In zwei Fällen (ohne erkennbare gelbe Flecken) lagen ca. 10⁷ KBE/g *Broch. thermosphacta* vor (Tab. 1).

Die MSB-Flora im Exsudat der gelbfleckigen Wurstproben auf MRS6.5 wurde in hohem Maße (87-92 %) von *Leuc. carnosum* dominiert, wenn die Nährböden bei 30 °C inkubiert wurden. Daneben wurde in nennenswerten Anteilen (8-13 %) nur noch *Lb. sakei* gefunden (Tab. 2). Erfolgte die Inkubation bei 5 °C, so wurde bei gelbfleckiger Weißwurst neben *Leuc. carnosum* auch *Leuc. gelidum* in hoher Keimzahl gefunden (Tab. 3).

Tab. 1: Keimzahlen im Exsudat ausgewählter Wurstproben aus ökologischer Herstellung

| Wurstprobe | gelbe Flecken | Verpackung | Keimzahlen/ml Wurstsafte | | | | |
|------------|---------------|------------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | | | MSB | MCC | Broch | PSM | Hefen |
| WW-1 | + | V | 1,7E+8 | 9,2E+4 | <1000 | 7,0E+3 | 2,5E+4 |
| WW-3 | + | V | 2,6E+8 | 1,5E+5 | <1000 | 1,5E+5 | 2,1E+5 |
| SB-5 | - | V | 1,2E+8 | 2,9E+4 | <1000 | 1,1E+4 | 7,0E+3 |
| SB-7 | - | A | 4,5E+8 | 1,4E+5 | 8,1E+6 | <1000 | 5,1E+4 |
| KB-9 | - | V | 7,0E+7 | <1000 | 1,5E+7 | 1,1E+4 | 1,0E+3 |
| KB-11 | + | A | 2,2E+8 | <1000 | <1000 | <1000 | 3,0E+3 |

WW, Weißwurst; SB, Schweinsbratwurst; KB, Kalbsbratwurst; V, Vakuumpackung; A, Aromapackung; MSB, Milchsäurebakterien; MCC, *Micrococccaceae*; Broch, *Brochothrix thermosphacta*; PSM, *Pseudomonaden*

Leuc. gelidum wurde neben *Leuc. carnosum* nur auf Std-I-Agar, nicht auf MRS6.5 gefunden und zwar in 4-mal höherer Keimzahl als *Leuc. carnosum* ($8,0 \times 10^7$ vers. $2,0 \times 10^7$ KBE/ml). Die MSB-Keimzahlen bei 5 °C waren auf Std-I etwa 10-mal höher als auf MRS6.5 ($1,0 \times 10^8$ KBE/ml vers. $2,2 \times 10^7$ KBE/ml). *Lb. sakei* wurde nur auf MRS6.5 gefunden, wobei die Keimzahl mit $1,2-2,0 \times 10^6$ etwa 10-mal kleiner war als die von *Leuc. carnosum* mit $2,1-3,9 \times 10^7$ KBE/ml.

Vorverpackte „Rostbratwurst“ aus konventioneller Herstellung. Die bei den Ökoerzeugnissen gemachten Beobachtungen gaben Anlass, vergleichbare Erzeugnisse aus konventioneller Herstellung ebenfalls auf gelbe Farbabweichungen zu überprüfen. Erwartungsgemäß kam das Phänomen relativ selten vor. Nur in einem Fall wurden bei vorverpackten Grillwürstchen aus dem Discount-Handel gelbliche Verfärbungen registriert (Abb. 1C). Die Analyse der Schutzatmosphäre in der Packung kurz vor dem Öffnen ergab 0 % Sauerstoff, 23 % Kohlendioxid und 77 % Stickstoff. Der olfaktorische Eindruck beim Öffnen der Packung war nicht eindeutig. Die Beschreibungen reichten von „majoranartig/akzeptabel“ bis „leicht säuerlich“ und „leicht stechend“. Der pH-Wert des Wurstexsudates in der 1:100 Verdünnung lag bei 5,0. Die Keimzahlen 7 Tage vor Ablauf des MHD waren unerwartet hoch (Tab. 4).

Die MSB-Flora der Grillwürstchen wurde von den vier Species *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Leuc. carnosum* und *Leuc. gelidum* dominiert, wobei das Verhältnis der einzelnen Species zueinander im Exsudat und auf der gelbverfärbten Wursthülle verschieden war (Tab. 5).

Leuc. gelidum wurde interessanterweise nur von Std-I-Nährboden isoliert. *Leuc. carnosum* kam 2-5-mal häufiger vor als *Leuc. gelidum*. Daneben kamen auch *Lb. sakei* und *Lb. curvatus* in größeren Anteilen vor, wobei *Lb. sakei* im Exsudat häufiger gefunden wurde als *Lb. curvatus*. Die limitierte Anzahl der untersuchten Kolonien erlaubt allerdings nur eine grobe Schätzung der Anteile.

Tab. 2: Prozentuale Zusammensetzung der MSB-Flora im Exsudat der Wurstproben aus ökologischer Herstellung auf MRS6.5-Nährboden bei 30 °C

| Wurstprobe | Anteil an der Mikroflora, % | | gelbe Flecken |
|------------|-----------------------------|------------------|---------------|
| | <i>Leuc. carnosum</i> | <i>Lb. sakei</i> | |
| WW-1 | 92,5 | 7,5 | + |
| WW-3 | 92,3 | 7,7 | + |
| SB-5 | 85,5 | 14,5 | - |
| SB-7 | 86,7 | 13,3 | - |
| KB-9 | 99,4 | 0,6 | - |
| KB-11 | 87,2 | 12,8 | + |

Tab. 3: Zusammensetzung der MSB-Flora (KBE/ml) auf MRS6.5- und Std-I-Nährboden bei 5 °C und 20 °C im Exsudat der Wurstprobe WW-1

| Species | 5 °C | | 22 °C |
|-----------------------|--------|-------|--------|
| | MRS6.5 | Std-I | MRS6.5 |
| <i>Lb. sakei</i> | 1,2E+6 | nd | 2,0E+6 |
| <i>Leuc. carnosum</i> | 2,1E+7 | 2E+7 | 3,9E+7 |
| <i>Leuc. gelidum</i> | nd | 8E+7 | nd |

nd, nicht detektiert

Tab. 4: Keimzahlen im Exsudat gelbfleckiger Grillwürstchen aus konventioneller Herstellung 7 Tage vor Ablauf des MHD

| Keimgruppe / Species | Keimzahlen (KBE) | | |
|----------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| | Wurstsaft | gelbe Wursthaut*) | |
| | / ml | / g | / cm ² |
| Broch | 2,9E+9 | 1,7E+9 | 1,5E+8 |
| MSB | 2,2E+10 3,2E+10 | 1,0E+10 7,5E+8 | 9,1E+8 6,8E+7 |
| PSM | 2,4E+7 | 6,0E+7 | 5,5E+6 |
| EBC | 8,0E+6 | 5,0E+6 | 4,5E+5 |

*) 20 mg (= 22 mm²) gelb verfärbte Wursthaut wurden seriell verdünnt; Abkürzungen vgl. Tab. 1

Putenbrustaufschnitt aus konventioneller Herstellung. Die insgesamt 22 untersuchten Vakuumpackungen einer Charge überlagerten Putenbrustaufschnitts (7 Wochen bei 2 °C) enthielten unterschiedlich viele gelbe Flecken pro Packung

Tab. 5: Grobe Zusammensetzung der MSB-Flora im Exsudat der Grillwürstchen

| Species | Prozentualer Anteil | | | |
|-----------------------|---------------------|------------|------------------|------------|
| | Exsudat | | gelbe Wursthülle | |
| | MRS6.5 | Std-I | MRS6.5 | Std-I |
| untersuchte Kolonien | 5 | 4 | 2 | 2 |
| <i>Lb. sakei</i> | 75 (2A+2B) | 0 | 0 | 0 |
| <i>Leuc. carnosum</i> | 25 (1B) | 72 (2A) | 73 (1A) | 69 (1A) |
| <i>Leuc. gelidum</i> | 0 | 14 (1B) | 0 | 31 (1B) |
| <i>Lb. curvatus</i> | 0 | 14 (1B) | 27 (1B) | 0 |

Je zwei dominierende Kolonietypen (A und B) wurden getrennt ausgezählt. Von jedem Kolonietyp wurde eine limitierte Anzahl von Kolonien näher untersucht. Aus dem jeweiligen Anteil der identifizierten Species im Verhältnis zum Kolonietyp wurde der Florenanteil der einzelnen Species geschätzt

(Abb. 1D). Je eine Packung mit der geringsten (Packung 3, n=1) und der höchsten (Packung 13, n=66) Anzahl gelber Flecken wurden näher untersucht. Sensorisch waren bei normalem Erscheinungsbild („hellrosa“) in beiden Fällen Geruchsabweichungen wahrnehmbar („käsigt, leicht faulig“). Die Größe der gelben Flecken reichte von 1x1 mm bis 2x4 mm. Die gelben Flecken fanden sich nur dort wo Kontakt zur Folie bestand, nicht zwischen den Scheiben. Die pH-Werte der 1:10-Verdünnung in physiol. NaCl lagen bei 6,1. Zur Bestimmung der Keimzahlen wurde je eine (Außen-)Scheibe (16-17 g) mit 9 Teilen 0,9 % NaCl 2 min im Stomacher homogenisiert und angelegt, wobei die gelb gefärbten Stellen exzissiert und separat analysiert wurden.

Tab. 6: Keimzahlen auf vorverpackter Putenbrust (foliennahe Scheiben) nach 9 Wochen Lagerung bei 2 °C

| Keimgruppe / Species | Keimzahlen (KBE/g) | | | |
|----------------------|--------------------|--------|------------|--------|
| | Packung 3 | | Packung 13 | |
| | MRS6.5 | Std-I | MRS6.5 | Std-I |
| Broch | nd | 4,6E+7 | nd | 8,0E+6 |
| MSB | 9,2E+7 | 6,7E+7 | 4,5E+7 | 8,1E+7 |
| PSM | nd | < E+5 | nd | 1,9E+6 |
| EBC | nd | 6,0+6 | nd | 6,0+5 |

Die Inkubation der Nährböden erfolgte bei 25 °C. Abkürzungen vgl. Tab. 1; nd, nicht detektiert

Die Scheiben enthielten ca. 10⁸ KBE/g Milchsäurebakterien (Tab. 6). Die MSB-Flora des gelben Flecks von Packung 3 war zu 100 % *Leuc. gelidum*. Die ganze Scheibe enthielt 50 % *Leuc. gelidum* und 50 % *Carn. divergens*. Die MSB-Flora von Packung 13 bestand in beiden Fällen (Fleck und Scheibe) zu 100 % aus *Leuc. gelidum*. Es fanden sich aber auch relativ hohe Keimzahlen an Pseudomonaden und *Enterobacteriaceae* (Tab. 6). Exzissierte gelbe Flecken zeigten ein ähnliches Bild. Beide Packungen enthielten als dominante Flora Milchsäurebakterien und *Brochothrix thermosphacta* in vergleichbarer Keimzahl.

Weißwurst aus konventioneller Herstellung. Auch Weißwurst aus konventioneller Herstellung zeigte nach längerer Kühlung Lagerung unter Vakuum hohe Keimzahlen an MSB und anderen Mikroorganismen (Tab. 7). Die MSB-Flora wurde bei Durchführung der Florenanalyse bei 30 °C von *Lb. sakei* dominiert. *Lb. curvatus* und *Leuc. carnosum* stellten je 15,5 % der MSB-Flora. Der pH-Wert lag

Tab. 7: Dominante Keimflora im Exsudat von kühl gelagerter, Vakuum verpackter Weißwurst aus konventioneller handwerklicher Herstellung

| Species | 30 °C | 5 °C | | 22 °C |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| | MRS6.5 KBE/ml, (%) | MRS6.5 KBE/ml, (%) | Std-I KBE/ml, (%) | MRS6.5 KBE/ml, (%) |
| <i>Lb. sakei</i> | 3,1E+8, (69) | 1,8E+8, (72) | 1,0E+8, (13,3) | 4,6E+7, (60) |
| <i>Lb. curvatus</i> | 7,0E+7, (15,5) | nd | nd, (0) | nd, (0) |
| <i>Leuc. carnosum</i> | 7,0E+7, (15,5) | nd | 5,0E+7, (6,7) | 1,7E+7, (22) |
| <i>Leuc. gelidum</i> | nd, (0) | 7,0E+7, (28) | 6,0E+8, (80) | 1,4E+7, (18) |

Sonstige Mikroorganismen (KBE/ml bei 30 °C): *Micrococcaceae*, 7,2 x 10⁵; Hefen, 4,0 x 10³; *Enterobacteriaceae*, 8,0 x 10⁴-2,4 x 10⁶; Pseudomonaden, 1,5 x 10⁵-5,0 x 10⁶; nd, nicht detektiert

am Ende der Lagerung (6 Wochen) bei 5,45. Wurde die Florenanalyse bei 5 °C und 22 °C durchgeführt, so wurde zusätzlich *Leuc. gelidum* als dominanter Keim gefunden. Die Weißwurst zeigte keine gelben Verfärbungen. Gasbildung in der Packung war deutlich erkennbar, das trübe, nicht schleimige Exsudat (12 ml) hatte einen hellen gräulich-gelblichen Farbton. Der Packungsinhalt roch leicht säuerlich. Ein Ausstrich des Exsudats auf frische, pasteurisierte Weißwurst lieferte überraschenderweise nach 7 Tagen bei 5 °C eine Gelbfärbung (luftdichte Verpackung ohne Vakuum).

Von sieben nach Ablauf des MHD untersuchten Weißwurst-Proben aus dem Discount-Bereich waren vier unter Vakuum und drei unter Schutzatmosphäre verpackt. Die Keimzahlen der Vakuum verpackten Würste (MHD ca. 4 Wochen) waren in jedem Fall unterhalb der Nachweisgrenze (<10 KBE/g). Vermutlich handelte es sich hierbei um nachpasteurisierte Ware. Die anderen drei Proben (MHD ca. 2 Wochen) wiesen MSB-Keimzahlen von 10⁸ KBE/g auf, sowohl bei 25 °C als auch bei 5 °C. Dabei dominierte bei zwei Proben *Leuc. carnosum*, bei einer Probe *Leuc. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*. *Leuc. gelidum* war nicht vertreten. Daneben wurde mit einem Anteil von 20-50 % noch *Lb. sakei* gefunden.

Identifikation der für die Verfärbungen verantwortlichen Mikroorganismen

Von allen bei 30 °C isolierten Mikroorganismen von gelbverfärbten Produkten war keiner in der Lage, als Einzelstamm oder in Mischkultur mit anderen isolierten Stämmen nach gezielter Inokulation auf pasteurisierte Weißwurst eine Gelbfärbung während der Kühllagerung (bis zu 4 Wochen bei 5 °C) hervorzurufen. Dagegen gelang es bei 5 °C sowohl auf MRS6.5 als auch auf Std-I-Nährboden Stämme zu isolieren, die diese Eigenschaft aufwiesen (Abb. 2A und B). Dabei war es ohne Belang, ob die Würste mit oder ohne Petersilie hergestellt waren.

Gelbe Verfärbungen konnten so nicht nur auf Weißwurst, sondern auch auf Kochschinken (Abb. 2C) und einer Reihe ande-

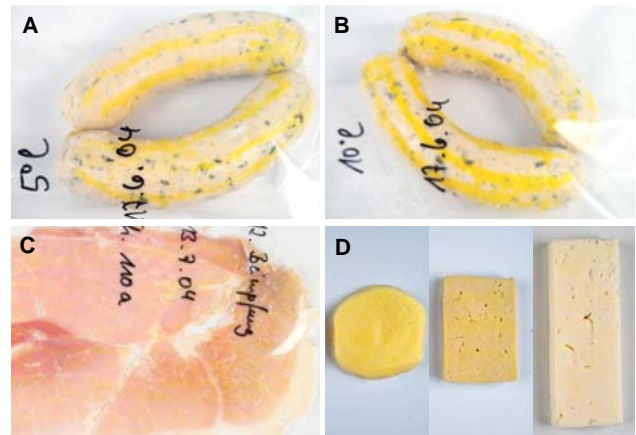


Abb. 2: Gezielte Provokation von Gelbverfärbungen auf unterschiedlichen kühl gelagerten Lebensmitteln durch Inokulation mit *Leuc. gelidum*.

- A, Weißwurst nach Lagerung bei 5 °C;
- B, Weißwurst nach Lagerung bei 10 °C;
- C, Kochschinken nach Lagerung bei 5 °C;
- D, von links nach rechts: Mozzarella aus Kuh-Milch, Tofu, Ziegen-Feta nach Lagerung bei 5 °C

rer Fleischerzeugnisse (nicht in Abb. 2 gezeigt: Gelbwurst, „Weißwurstdarm“ gefüllt mit Gelbwurstbrät, Fleischwurst, Putenpressschinken) provoziert werden.

Die Identifizierung dieser Isolate mittels phänotypischer und genotypischer Methoden zeigte, dass es sich ausschließlich um Isolate von *Leuc. gelidum* handelte.

Die BOX-rep-APD-Profile aller Isolate von *Leuc. gelidum* waren untereinander und mit dem Typstamm DSM 5578 identisch. Das Profil von *Leuc. gelidum* selbst war eindeutig von den Profilen anderer *Leuconostoc* spp. zu unterscheiden (Abb. 3).

Gelbfärbung von Tofu, Mozzarella und Feta

Auf Grund der Ergebnisse von MATSUZAWA *et al.* (1998), die gelbe Flecken auf Tofu *Leuconostoc mesenteroides* spp. *mesenteroides* zuschrieben, wurde überprüft, ob *Leuc. gelidum* Stämme, die zu Gelbfärbung auf Weißwurst führten, auch Tofu gelb färben können. Sowohl die *Leuc. gelidum* Isolate WSK5a und WSK8 von Weißwurst als auch der *Leuc. gelidum* Typstamm führten bei aerob verpacktem, kühl gelagertem Tofu zu gelben Verfärbungen (Abb. 2D mittleres Teilbild).

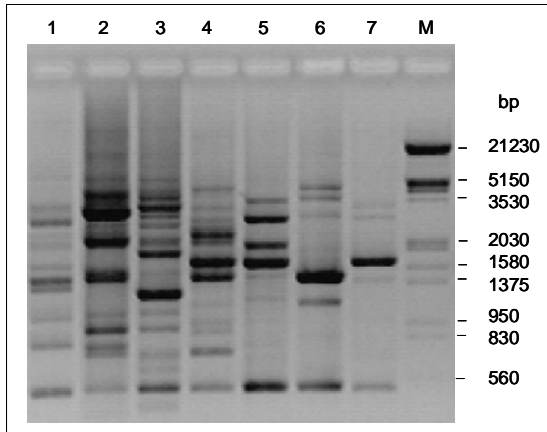


Abb. 3: Differenzierung von *Leuconostoc* spp. mittels BOX-rep-APD. Spur 1: *Leuc. citreum* ATCC 10882, Spur 2: *Leuc. lactis* DSM 20192, Spur 3: *Leuc. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* DSM 20343, Spur 4: *Leuc. pseudomesenteroides* DSM 20193, Spur 5: *Leuc. gelidum* DSM 5578, Spur 6: *Leuc. carnosum* DSM 5576, Spur 7: *Leuc. gasicomitatum* LMG 18811, M: Größenmarker, Lambda *EcoRI* / *HindIII*

Die Gelbfärbung war demnach kein fleischspezifisches Phänomen. Es lag daher nahe, vergleichbare Produkte analog zu testen. Dabei zeigte sich, dass auch auf Mozzarella aus Kuh-Milch und Ziegenfeta gelbe Verfärbungen provoziert werden konnten (Abb. 2D linkes und rechtes Teilbild). Die Gelbfärbung auf dem Ziegen-Feta fiel im Vergleich zum Mozzarella und Tofu etwas schwächer aus, vermutlich aufgrund des sehr niedrigen pH-Wertes (pH 4,6) des Produktes. In diesem pH-Bereich sind die meisten Milchsäurebakterien kaum noch aktiv.

Gelbfärbung von Spezialnährböden

Da keiner der *Leuc. gelidum* Stämme auf den üblichen Nährböden (MRS6.5, Std-I) bei Kühlung eine Gelbfärbung zeigte und die Nährböden sich von den Lebensmitteln im Wesentlichen durch einen gewissen Fettanteil unterschieden, wurde spekuliert, dass die Gelbfärbung nur in Gegenwart von Fett auftritt.

Ein Nährboden aus Std-I-Agar mit Milch (3,5 % Fett) anstelle von Wasser ermöglichte es, das Phänomen der Gelbfärbung erstmals auf Platte zu beobachten (Abb. 3A und B). Wie bereits bei gelbverfärbten Weißwürsten beobachtet, handelte es sich bei dieser Gelbfärbung nicht um eine Pigmentierung der Kolonien, sondern

um einen diffusiblen gelben Farbstoff, der auch einen definierten Nährbodenbereich außerhalb der Kolonie gelb anfärbte. In Flüssigkultur wurde jedoch keine Gelbfärbung der Milch beobachtet.

Zu Gelbfärbungen kam es auch auf Nährböden mit Zusatz von Schweineschmalz (Abb. 3C), wobei ein Zusatz von 0,5 % Glucose oder Saccharose die Ausprägung nicht beeinflusste. Die Kontrolle ohne Schweineschmalz zeigte keine Gelbfärbung.

Es zeigte sich in der Folge, dass es auch auf Nährböden mit Hartparaffin (Abb. 3D), Flüssigparaffin und Octadecan (nicht in Abb. 3 gezeigt) in Anwesenheit von *Leuc. gelidum* zu einer Gelbfärbung kommt. Die Paraffinqualität zeigte keinen Einfluss auf die Gelbfärbung. Im Vergleich zu Schweineschmalz war die Gelbfärbung bei Paraffin und Octadecan weniger intensiv.

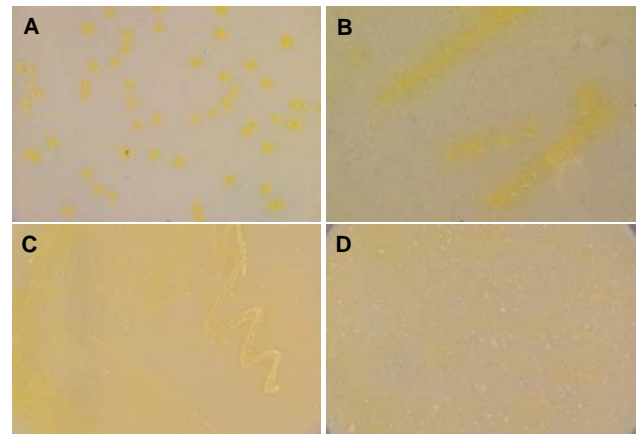


Abb. 3: Gelbverfärbungen auf Spezialnährböden. A, Einzelkolonien von *Leuc. gelidum* 13PB2/12 auf Milchagar; B, Ausstrich von *Leuc. gelidum* DSM 5578 auf Milchagar; C, Ausstrich von *Leuc. gelidum* WSK5a auf Schmalzagar; D, Ausstrich von *Leuc. gelidum* DSM 5578 auf Hartparaffin-Agar

Charakterisierung ausgewählter *Leuc. gelidum* Stämme

Die aus Fleischerzeugnissen isolierten *Leuc. gelidum* Stämme unterschieden sich gelegentlich hinsichtlich der Ausprägung ihrer Fähigkeit, bei gezielter Inokulation Gelbverfärbungen auf pasteurisierten Weißwürsten hervorzurufen (Tab. 8). Der Typstamm *Leuc. gelidum* DSM5578 produzierte dagegen in allen Fällen bereits nach kurzer Zeit (4 Tage) bei 5 °C eine

intensive Gelbfärbung. Ein bereits vor 13 Jahren aus gemischtem Hackfleisch isolierter Stamm, *Leuc. gelidum* BAFF-LB 1052, verhielt sich ähnlich wie der Typstamm. Die meisten *Leuc. gelidum* Stämme, die im Rahmen dieser Arbeit isoliert wurden, benötigten mehr Zeit (8-12 Tage) und verfärbten die Würste nicht mit der gleichen Intensität und auch nicht an allen Impfflächen. Die beobachteten phänotypischen Unterschiede zwischen den einzelnen *Leuc. gelidum* Isolaten korrelierten nicht mit der Ausprägung der Gelbfärbung auf Weißwurst (Tab. 8). Phänotypisch mehr oder weniger identisch mit dem Typstamm bzw. den bei SHAW und HARDING (1989) angegebenen Daten für den Typstamm waren nur die Weißwurstisolate 1/11/5, WSK5a und WSK8.

Auf Milchagar wurde bei einigen Stämmen Segregation in weiße und gelbe Kolonien beobachtet. Aus weißen Kolonien segre-

gierten nach erneuter Kultur auf Milchplatten wieder gelbe Kolonien. Der Anteil der weißen Kolonien nahm mit der Koloniezahl pro Platte zu. Keine Segregation (nur gelbe Kolonien) wurde beim *Leuc. gelidum* Typstamm sowie bei den Isolaten Lb 1052, 3PB1/4 und WSK8 beobachtet (Tab. 8).

Versuche zur Induktion der Gelbfärbung bei Stämmen, die eine variable Ausprägung der Gelbfärbung auf Weißwurst zeigten, mit sterilisiertem Exsudat positiver Stämme lieferten keine eindeutigen Ergebnisse.

Leuconostoc gelidum BAFF-Lb 1052 wurde 1992 aus gemischtem Hackfleisch isoliert und im Screening als Bacteriocinbildner identifiziert (KRÖCKEL, 1998). Der Stamm produziert das anti-listerielle Bacteriocin, Leucocin 1052. Alle anderen *Leuc. gelidum* Isolate waren Bacteriocin-negativ (Tab. 8).

Tab. 8: Unterschiede im Phänotyp ausgewählter *Leuc. gelidum* Stämme, Ausprägung der Gelbfärbung auf Weißwurst bei 5 °C, Segregation auf Milchagar in gelbe und weiße Kolonien sowie Produktion anti-listerieller Bacteriocine

| Merkmal | 3PB1/4 | 3 PB 2/5 | 13 PB 1/6 | 13 PB 2/12 | RB 1/11 | RB 2/16 | WSK5a | WSK8 | 1/11/5 | Lb1052 | DSM5578 | Literatur |
|-------------------|--------|----------|-----------|------------|---------|---------|-------|------|--------|--------|---------|-----------|
| Esculin | - | - | (+) | - | (+) | - | -/+ | + | (+) | -/+ | -/+ | + |
| Arabinose | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Cellobiose | + | + | + | + | + | + | -/+ | -/+ | + | + | + | + |
| Galactose | + | - | + | + | (+) | - | - | - | - | + | - | - |
| Gluconat | - | - | - | + | (+) | + | - | - | - | + | - | - |
| Maltose | - | + | (+) | (+) | + | + | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Amygdalin | - | - | - | - | - | + | -/(+) | + | (+) | - | (+) | + |
| Salicin | -/+ | - | - | (+) | - | + | + | -/+ | + | + | (+) | + |
| gelb nach 4 Tagen | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | nb |
| 8 Tagen | (+) | - | + | + | (+) | - | +/- | + | - | + | +++ | nb |
| 12 Tagen | + | (+) | + | + | (+) | (+) | (+) | ++ | + | ++ | +++ | nb |
| Segregation | - | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | nb |
| Bacteriocin | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | nb |

-, negativ; (+), schwach ausgeprägt; +, positiv; ++, gut ausgeprägt; +++, sehr gut ausgeprägt;

Segregation auf Milchagar: -, nur gelbe Kolonien; +, gelbe und weiße Kolonien; +!, nur weiße Kolonien.

Sammlungsnummern der *Leuc. gelidum* Eigenisolate [Isolat-Nr. (Sammlungs-Nr.)]: 3PB1/4 (Lb 1303), 3 PB 2/5 (Lb 1304), 13 PB 1/6 (Lb 1305), 13 PB 2/12 (Lb 1306), RB 1/11 (Lb 1301), RB 2/16 (Lb 1302), WSK5a (Lb 1370), WSK8 (Lb 1308), 1/11/5 (Lb 1309). Literatur: SHAW und HARDING, 1989

Charakterisierung des gelben Farbstoffs

Der gelbgrüne Farbstoff ist nicht wasserlöslich, kann aber mit Aceton aus der Weißwursthülle extrahiert werden. Mittels Größenausschlusschromatographie wurde gefunden, dass das Molekulargewicht der gelben Verbindung kleiner als das von Fett ist (<800 Da). Eine genauere chemische Charakterisierung ist schwierig, da zum einen ein einfaches Verfahren zur Gewinnung größerer Mengen der gelben Verbindung noch nicht zur Verfügung steht und zum anderen die ausgeprägten hydrophoben Eigenschaften die Abtrennung von anderen hydrophoben Lebensmittelkomponenten erschweren.

Diskussion

Es gibt in der Literatur bislang nur zwei Hinweise auf eine bakteriell bedingte Gelbverfärbung bei einem Fleischerzeugnis (CAI *et al.*, 1998; CANTONI *et al.*, 2001). In beiden Fällen handelt es sich um Kochschinken. Von CAI und Mitarbeitern wurde *Leuc. gelidum* als auslösende Ursache identifiziert, von CANTONI und Mitarbeitern *Dermacoccus nishimononiyensis*. CAI und Mitarbeiter beschreiben gelbe Flecken bei Vakuum verpacktem Kochschinken, der ohne Nitrit hergestellt und 2-3 Wochen bei 4 °C gelagert wurde. Von 46 Isolaten produzierten 35 gelbe Flecken. Keiner der Stämme war allerdings auf Anfrage mehr verfügbar. Es bleibt auch unklar, ob die Schinkenpackungen wirklich frei von Sauerstoff waren und ob gelbe Flecken auch auf anderen Fleischerzeugnissen erzeugt werden konnten. Die chemische Natur der gelben Substanz wird in dem Beitrag nicht diskutiert. Bei CANTONI und Mitarbeitern waren gelbe Flecken in Vertiefungen bzw. Spalten von Kochschinken beschrieben worden.

Gelbverfärbungen bei bestimmten Fleischerzeugnissen wurden auch in Deutschland schon früher beobachtet (A. BANTLEON, W.-D. MÜLLER, H. HECHELMANN, persönliche Mitteilungen). Im Lauf der Untersuchungen wurde das Problem der gelben Farbabweichungen auf erhitzten Fleischerzeugnissen („Weiße Ware“) auch von

anderer Seite (H.-J. BAUMGART, persönliche Mitteilung) an uns herangetragen.

Gelbverfärbungen wurden interessanterweise auch bei vorverpacktem Tofu beschrieben (MATSUZAWA *et al.*, 1998). Die Autoren isolierten von einem solchen gelbgeleckten Sojabohnenerzeugnis ein Milchsäurebakterium, das sie als *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* identifizierten. Auch in diesem Fall war der Bakterienstamm auf Anfrage nicht erhältlich.

Die Probleme bei der eindeutigen Zuordnung des beobachteten Phänomens der Gelbverfärbung bestimmter Lebensmittel während der Kühlung erklären sich vermutlich daraus, dass einerseits die Identifizierung der beteiligten Mikroorganismen nicht trivial ist und andererseits die verdächtigten Mikroorganismen möglicherweise diese Gelbfärbung nicht immer ausprägen.

Leuc. gelidum, *Leuc. carnosum* und *Leuc. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* sind nicht pigmentierte, heterofermentative psychrotrophe Milchsäurebakterien, die regelmäßig von kühl gelagerten Fleischerzeugnissen isoliert werden (SHAW und HARDING, 1989). Sie sind mit konventionellen mikrobiologischen Methoden schwer zu unterscheiden. Dies gilt insbesondere für *Leuc. gelidum* und *Leuc. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*. Der genetische Fingerabdruck mittels BOX-rep-APD ermöglichte dagegen eine eindeutige Zuordnung der Isolate zur jeweiligen Species.

Probleme bei der Reproduzierbarkeit der Gelbfärbung deuten darauf hin, dass es sich um ein komplexes Induktionsphänomen handelt. Temperaturen im Bereich 5-12 °C sind unseren Untersuchungen zufolge unabdingbar. Das gleiche scheint auch für die Anwesenheit von Sauerstoff zu gelten. In Abwesenheit von Sauerstoff wird die Gelbfärbung nicht oder nur sehr schwach ausgeprägt. Scheinbar im Widerspruch dazu stehen die Befunde, dass ein Teil der gelb gefleckten Bio-Weißwürste Vakuum verpackt war und dass in der Schutzatmosphäre der gelb verfärbten Grillwürstchen kein Sauerstoff nachweis-

bar war. Die Sauerstoffdurchlässigkeit der Packungsfolien war hier unbekannt; es ist aber nicht ausgeschlossen, dass während der Lagerung Sauerstoff in das Innere der Packungen gelangte und dort an mikrobiellen und chemischen Umsetzungen beteiligt war. Auch die Zelldichte scheint von Bedeutung zu sein, da in den Beimpfungsversuchen nur Impfsuspensionen mit hoher Zelldichte ($> 10^7$ KBE/ml) wieder zu Gelbfärbung führten. Zudem scheint die Fähigkeit zur Gelbfärbung in den meisten Stämmen nicht stabil zu sein. Darauf deutet die Segregation in gelbe und weiße Kolonien auf Milchagar hin. In einigen Stämmen, darunter im Typstamm DSM 5578, scheint die Fähigkeit zur Gelbfärbung stabil vorzuliegen. Vorerst bleibt unklar, ob es sich hier um eine stressinduzierte Instabilität im Genom von *Leuc. gelidum* handelt oder ob hier ein dem *quorum sensing* ähnliches Phänomen, wie es bei einigen Milchsäurebakterien im Zusammenhang mit der Bacteriocinbildung beobachtet wird (NES und EIJSINK, 1999), eine Rolle spielt.

Die einschlägige Literatur über Milchsäurebakterien liefert keine Erklärung für das beobachtete Phänomen. Da experimentell eine ausgeprägte Gelbfärbung nur bei Kühltemperaturen und bevorzugt in Gegenwart von Sauerstoff auftritt, könnte vermutet werden, dass Wasserstoffperoxid eine Schlüsselrolle spielt. Sauerstoff wird von Milchsäurebakterien unter bestimmten Bedingungen als externer Elektronenakzeptor unter Bildung von Wasserstoffperoxid genutzt (AXELSSON, 1993). Besonders heterofermentative Milchsäurebakterien können zur Erhöhung der Energieausbeute bei der Vergärung von Glucose unter anaeroben Bedingungen auch andere externe Elektronenakzepto-

ren (Acetaldehyd, alpha-Ketosäuren, Citrat, Fructose, Fumarat, Glycerin) nutzen. Es ist bekannt, dass die Peroxidproduktion bestimmter Milchsäurebakterien bei Brühwurst zu einer Vergrünung führen kann (PEIRSON *et al.*, 2003). Ein ähnlicher Angriff auf die Nitrosohämgruppe des Nitrosomyoglobin kann hier jedoch aus verschiedenen Gründen ausgeschlossen werden. Die Identität der gelben Verbindung bleibt daher vorerst unklar. Es könnte sich sowohl um ein bislang unbekanntes Stoffwechselendprodukt von *Leuc. gelidum* als auch um eine durch diesen Mikroorganismus in lipophiler Umgebung verursachte Modifikation eines Lebensmittelbestandteils handeln.

Bedeutung für die Praxis

Eine mikrobiell bedingte Gelbverfärbung bei vorverpackter, kühl gelagerter Weißwurst lässt sich am ehesten vermeiden, wenn das Erzeugnis nach der Verpackung repasteurisiert wird. Für nicht repasteurisierte Produkte wären möglicherweise auch Schutzkulturen interessant. In allen anderen Fällen muss entweder eine Rekontamination mit *Leuc. gelidum* nach dem Erhitzungsprozess ausgeschlossen werden, das verpackte Erzeugnis möglichst unter 5 °C gelagert werden bzw. das Mindesthaltbarkeitsdatum entsprechend verkürzt werden. Auch der sichere Ausschluss von Sauerstoff könnte u.U. eine Option sein. Da Gelbverfärbungen bei „Weißer Ware“ offenbar relativ selten vorkommen, ist davon auszugehen, dass das Problem von den meisten Herstellern beherrscht wird. Für den Verbraucher ist die Gelbfärbung ein Zeichen, dass das Produkt nicht mehr frisch und in der Regel auch geschmacklich nicht mehr akzeptabel ist.

Literatur (beim Verfasser)

Danksagung

Johanna Björkroth (Universität Helsinki), Wolfgang Jira (Institut für Chemie und Physik, BfEL-Kulmbach) und Wolf-Dietrich Müller (Institut für Technologie, BfEL-Kulmbach) danke ich für die Zusendung von *Leuconostoc gasicomitatum* LMG 18811, die Durchführung der Größenausschlusschromatographie der gelben Verbindung und die Gasanalyse im Kopfraum einer Folienpackung. Frau Jutta Popp danke ich für die hervorragende technische Assistenz.