

Bildung sicherheits- und aromarelevanter Metabolite durch Starterorganismen in der Rohwurstreifung

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie Prof. Dr. Rudi F. Vogel
Forschungsstelle II:	Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (DFA), Freising-Weihenstephan Prof. Dr. Dr. Peter Schieberle
Industriegruppe:	Bundesverband der Deutschen Fleischwarenindustrie e.V. (BVDF), Bonn
	Projektkoordinator: PD Dr. Christian Hertel, Frutarom Savory Solutions GmbH, Holdorf
Laufzeit:	2010 – 2013
Zuwendungssumme:	€ 357.950,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Trotz ihrer nahen Verwandtschaft zu pathogenen Species, insbesondere *Staphylococcus aureus*, finden sich einige *Staphylococcus* species in fermentierten Lebensmitteln, insbesondere in Rohpökelfleisch und Rohwurst, in denen sie als Starterkulturen häufig in Kombination mit Laktobazillen eingesetzt werden. Das von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit, EFSA, vorgeschlagene „Qualified Presumption of Safety (QPS)“-Konzept erwartet für die Anwendung von Starterkulturen eine konkrete Wissensbasis (Taxonomie, Abwesenheit des Potenzials unerwünschter Wirkungen auf den Menschen, Kenntnis der Wirkung in der industriellen Anwendung und letztliche Verwendung – hier lebend im Produkt). Nur für wenige Species ist ein QPS-Status aller darin enthaltener Stämme erkennbar, während Stämme anderer Arten im Einzelfall umfassend bewertet werden müssen. Für *Staphylococcus*-Spezies wurden kürzlich Kriterien erarbeitet, die es erlauben, anhand der Abwesenheit von Pathogenitätsfaktoren und Antibiotikaresistenzen sichere Organismen nach dem Stand der Wissenschaft auszuwählen.

Im QPS-Konzept werden ausnahmslos Einzelorganismen bewertet, während Lebensmittelfer-

mentationen überwiegend durch Gemischt- Populationen aus verschiedenen Stämmen bestimmt werden. Erst diese bringen in ihrer Wechselwirkung die erwünschten technofunktionellen und sensorischen Eigenschaften hervor, und gewährleisten die Sicherheit der Produkte sowie die Reduktion unerwünschter Metabolite.

Die Rohwurstreifung ist ein komplexes Geschehen, in dem endogene Fleischenzyme und die eingesetzten Starterkulturen eine wichtige Rolle hinsichtlich hygienischer Sicherheit, Textur-, Farb-, Geschmacks- und Aromabildung spielen. Im Besonderen sind die pH-Absenkung durch die Milchsäurebakterien sowie die von den *Micrococcaceae* ausgehende Lipolyse und Proteolyse mit ihren Folgereaktionen für diese Eigenschaften bestimmend. Während die Anwendung einzelner Stämme Produkte mit nur geringen sensorischen Unterschieden hervorbringt, sind Rohwürste, in denen *Micrococcaceae* mit Laktobazillen kombiniert werden, sensorisch vielfältig. Hinsichtlich Sicherheit und Aromabildung sind die Nitratreduktion und deren Folgereaktionen sowie der Metabolismus von Peptiden und Aminosäuren von besonderer Bedeutung. Zu hohe Mengen an Nitrat oder Nitrit können z.B. im Produkt verbleiben und es können N-Nitrosoverbindungen bzw. toxisch

bedenkliche biogene Amine gebildet werden. Letztere werden aus denselben Vorstufen wie sensorisch bedeutsame Substanzen gebildet. Die Reduktion von NO^3/NO^2 ist auch ausschlaggebend für die Haltbarkeit (Ranzigkeit bei Pizzasalamis) und für die Farbe der Rohwurst, da Oxidationsreaktionen an der Oberfläche dazu führen können, dass $\text{Mb}(\text{Fe}^{2+})\text{NO}$ in $\text{MetMb}(\text{Fe}^{3+})$ übergeht, das graubraune Verfärbungen verursacht.

Zu metabolischen Wechselwirkungen zwischen Laktobazillen und Staphylokokken in der Rohwurstreifung liegen trotz dieser in der Praxis häufigsten Anwendung keine gezielten Untersuchungen vor. Die Kombination von *Pediococcus pentosaceus* und *S. carnosus* oder *S. xylosus* in Modellsystemen für die Rohwurstfermentation zeigte, dass der größte Teil in der Variation des flüchtigen Metaboloms der Staphylokokken am deutlichsten durch die Verschiedenartigkeit der Stämme selbst sowie über die Verfügbarkeit von Mangan, die Temperatur und die pH-Wert-Entwicklung während der Rohwurstreifung bestimmt wird. Letztere hängt wesentlich von der Stoffwechselaktivität der Milchsäurebakterien ab, die ihrerseits vom Mangangehalt sowie von Nitrit und Temperatur abhängt. Dies zeigt, dass gerade die Wechselwirkung zwischen Milchsäurebakterien und Staphylokokken der Rohwurstmatrix bestimmend für das Gesamtmetabolitspektrum ist, wobei der pH-Wert eine entscheidende Mittlergröße im Verhalten dieser Organismen zu haben scheint.

Die Kenntnis des Stoffwechsels von *L. sakei* und *L. curvatus* aus dem IGF-Vorhaben AiF 15458 N sowie die seit 2008 verfügbare Genomsequenz von *Staphylococcus carnosus* erlauben heute die Einbeziehung von *S. carnosus* in die Untersuchungen und insbesondere die Untersuchung der Wechselwirkung von *S. carnosus* mit Stämmen von *L. sakei* zur Verbesserung der Sicherheit und sensorischen Qualität von Rohwurst.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, die metabolischen Wechselwirkungen zwischen Milchsäurebakterien und Staphylokokken bei der Rohwurstfermentation und insbesondere ihre Auswirkungen auf die Bildung sicherheits- und aromarelevanter Metabolite zu charakterisieren.

Forschungsergebnis:

Vierundachtzig verschiedene Stämme von 8 verschiedenen *Staphylococcus* (*S.*)-Spezies wurden physiologisch bezüglich ihres Wachstumsverhaltens bei ansteigenden Salzkonzentrationen und

des Wachstums bei unterschiedlichen pH-Werten charakterisiert. Alle Stämme wurden auf ihr Bildungsvermögen von biogenen Aminen und von Bakteriozinen getestet. Mit Ausnahme der eher salztoleranteren Spezies *S. vitulinus* bzw. *piscifermentans* ergab sich für die als Starter relevanten Spezies *S. carnosus* und *S. xylosus* keine signifikante Spezies-Spezifität. Ebenso scheint das bevorzugte Wachstum bei pH 6 bzw. pH 5 eine stammspezifische Eigenschaft zu sein. Mit 86 % bzw. 17 % aller getesteten Stämme von *S. carnosus* bzw. *S. xylosus* war die Bildung von Tyramin gegenüber anderen biogenen Aminen am deutlichsten vorhanden. Bakteriozinbildung konnte bei keinem der getesteten Stämme gezeigt werden. Von den insgesamt 46 Stämmen von *S. carnosus*, die mittels RAPD genetisch typisiert wurden, zeigten 34 Stämme von *S. carnosus subsp. carnosus* untereinander identische Muster. Zehn Isolate von *S. carnosus subsp. utilis* bildeten einen eigenen Cluster. Die Stämme *S. carnosus subsp. carnosus* TMW 2.212 bzw. TMW 2.218 gruppieren ebenfalls im Cluster von *S. carnosus subsp. utilis*. Ebenfalls war es möglich, mittels MALDI-TOF-MS-Analytik die verschiedenen Subtypen zu identifizieren, ebenfalls mit Ausnahme von TMW 2.212 und 2.218. Interessanterweise sind die beiden Datensätze trotz unterschiedlichen molekulargenetischen Ansatzes konsistent. Hinsichtlich des Aromaprofils konnten stammspezifische Unterschiede detektiert werden. Die flüchtigen Metaboliten 2-Heptanon, 3-Methylbutanol, 3-Hydroxy-2-butanon 2-Heptanol, 2-Nonanon, Essigsäure, Benzaldehyd und Butansäure wurden nicht von allen Stämmen nachweisbar gebildet. Während Benzaldehyd einzig vom Stamm TMW 2.214 nicht gebildet wurde, war 2-Nonanon nur bei den Stämmen TMW 2.1147 und 2.801 sowie in geringer Menge bei TMW 2.218 nachweisbar. Somit konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in verschiedenen Stämmen im Modellsystem mit Fleischmedium detektiert werden können.

Neben dem bereits etablierten Versuchsaufbau zur Rohwurstreifung im Labormaßstab und dem Modellsystem in flüssigen Medien wurde ein neues Modellsystem etabliert, da unter den Bedingungen des bisherigen Reifungsschemas der pH-Wert der Rohwürste bis auf einen pH-Wert von bis zu 4,6 absank. Unter diesen Bedingungen ist die Stoffwechselaktivität und Überlebensfähigkeit von *S. carnosus* stark eingeschränkt. Da die Stoffwechselaktivität der Staphylokokken ein zentraler Aspekt des Projekts war und dementsprechend das flüchtige

Metabolitenspektrum beeinflusst, wurde das Reifungsschema dahingehend optimiert, dass der pH-Wert nicht unter 5 sinkt und somit das Überleben und die metabolische Aktivität der Staphylokokken gesichert sind. Die Modulation des pH-Wertes wurde insbesondere durch eine veränderte Temperaturführung erreicht. Hinsichtlich des Aromaprofils konnte festgestellt werden, dass unabhängig von den eingesetzten *L. curvatus*- oder *L. sakei*-Stämmen die Kombination mit *S. carnosus* TMW 2.1147 im Vergleich zu TMW 2.1330 nach semiquantitativer Analyse mehr aromarelevante Metaboliten produzierte. Bei diesem Stamm handelt es sich um *S. carnosus ssp. utilis*, während der Stamm TMW 2.1330 eindeutig als *S. carnosus ssp. carnosus* identifiziert werden konnte.

Ein neues Modell zum effektiven Screening von Starterkulturen in Flüssigmedium wurde ebenfalls etabliert. Dabei wird das Modellmedium auf eine hohe Zellzahl angeimpft und die flüchtigen Metabolite zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Über den Zeitraum von 18 h war die Zellzahl konstant und die gemessenen flüchtigen Metabolite konnten somit auf die Zellzahl bezogen werden. Dadurch können erste Aussagen über Unterschiede in der Bildung der flüchtigen Metabolite der verschiedenen Bakterienkombinationen getroffen werden und ermöglichen erste Erkenntnisse bezüglich der Interaktion von Staphylokokken und Laktobazillen. Weitere Experimente mit den ausgewählten Kombinationen im Rohwurstmodell wurden durchgeführt.

Die begleitenden Untersuchungen zur Entwicklung der Fermentationsflora mittels statistischer MALDI-TOF-MS-Identifizierung von Isolaten deuten darauf hin, dass im Rahmen normaler Betriebskontrollen (z. B. pH-Wert, Ausplattieren auf differenziellen Medien für Laktobazillen und Staphylokokken) nicht erfasst werden kann, ob sich die eingesetzten Stämme auch durchgesetzt haben. Sie sichern offenbar lediglich den Reifungsverlauf in der ersten Woche. Danach können sich auch andere Stämme aus der Spontanflora unbemerkt durchsetzen und in der Folge an der Bildung sicherheits- und aromarelevanter Metabolite beteiligt sein. Die diesbezügliche Rolle der Spontanflora wird derzeit möglicherweise unterschätzt. Eine Rückführung der Metabolitbildung auf die Stoffwechsellitung und Interaktion der eingesetzten Stämme ist deswegen derzeit nur in der ersten Fermentationsphase und in kürzer laufenden Rohwurst-Modellsystemen zuverlässig möglich.

Der Einfluss von Mangan auf die Bildung von rohwursttypischen und aromarelevanten flüchtigen Metaboliten durch die Starterkulturen *L. sakei* TMW 1.1322 und *S. carnosus* TMW 2.208 während einer simulierten Rohwurstreifung und die Interaktion beider Stämme bei gemeinsamem Wachstum wurden untersucht. Dabei wurden folgende Metabolite betrachtet: Buttersäure, 3 Methylbuttersäure, 2-Methylpropansäure, Essigsäure, 2-Heptanon und 3-Methyl-1-butanol. Ein offensichtlicher Effekt des Manganzusatzes war ein signifikant gesteigertes Wachstum von *L. sakei* TMW 1.1322 während der Modellfermentationen, das gleichzeitig zu einer verstärkten Ansäuerung des Rohwurstmediums führte. Das Wachstum von *S. carnosus* TMW 2.208 blieb durch den Manganzusatz nahezu unbeeinflusst. Die Produktion von 3-Methylbuttersäure und 2-Methylpropansäure konnte durch Manganzusatz bei *S. carnosus* TMW 2.208 und der Mischkultur mit *L. sakei* TMW 1.1322 gesteigert werden.

Die Metabolisierung verzweigt-kettiger Aminosäuren durch Starterkulturen trägt wesentlich zur Bildung typischer Aromastoffe bei. Um weitere limitierende Faktoren für die Bildung flüchtiger, aromarelevanter Derivate aus verzweigt-kettigen Aminosäuren zu identifizieren, wurde der Transporter für Leucin, Isoleucin und Valin (BrnQ) in den Fokus genommen. In je vier *L. sakei*- und *L. curvatus*-Stämmen konnte die Anwesenheit des Gens gezeigt werden. Die Gene von *L. sakei* TMW 1.114 sowie TMW 1.578 konnten vollständig sequenziert werden. In laufenden Studien werden die Funktionalität von BrnQ als auch die möglichen Auswirkungen auf die Bildung flüchtiger Aromasubstanzen untersucht.

Zusammenfassend wird deutlich, dass der Einfluss des pH-Wertes eine größere Bedeutung hat als die Anwesenheit der Aminosäuren Tyrosin und Arginin. *S. carnosus ssp. utilis* zeigt besonders in Kombination mit *L. curvatus* TMW 1.167 ein sehr gutes Wachstum. Obwohl bei Tyrosinzugabe das Wachstum gesteigert wird, wächst *S. carnosus ssp. utilis* im Überstand mit eingestelltem pH-Wert von 6,33 ohne Tyrosin im Vergleich zu den Überständen mit Tyrosin besser. Auch in Kombination mit *L. sakei* TMW 1.1322 ist das Wachstum von *S. carnosus ssp. utilis* im Vergleich zu *L. sakei* TMW 1.1393 und *L. curvatus* TMW 1.1389 besser. Es wird deutlich, dass der Einfluss auf das Staphylokokkenwachstum bei niedrigen pH-Werten nur gering-

fällig durch die Zugabe von Aminosäuren kompensiert werden kann.

Die Experimente im Modellsystem haben gezeigt, dass durch intelligente Kombination unterschiedlicher Starterkulturen bessere Wachstumsraten insbesondere der aromaproduzierenden und für die Farbstabilität wichtigen Staphylokokken erzielt werden können. Insbesondere sollten Starterkulturkombinationen vermieden werden, in denen die Starterorganismen um dieselben Nährstoffe konkurrieren.

Um zunächst Einblicke über das Aroma von Salami zu erhalten, wurde eine italienische Salami aus dem Feinkosthandel bezogen und bzgl. ihres Aromas charakterisiert. Dafür wurden nach Durchführung einer Aromaextraktverdünnungsanalyse insgesamt 43 Geruchseindrücke am Sniffing-Port wahrgenommen, von denen 28 in Verdünnungen ≥ 16 detektiert wurden. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich von Referenzen anhand von RI-Werten auf zwei Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität sowie anhand von MS-Spektren im EI- und CI-Modus. Nach Identifizierung der aromaaktiven Verbindungen erfolgte die Quantifizierung der wichtigsten Verbindungen mittels Stabilisotopenverdünnungsanalysen (SIVA). Eine Ausnahme stellte die Essigsäure dar, welche enzymatisch bestimmt wurde.

Die höchsten Konzentrationen wurden für Essigsäure (136.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$), Phenylacetaldehyd (4.800 $\mu\text{g}/\text{kg}$) und 3-Methylbuttersäure (4.600 $\mu\text{g}/\text{kg}$) gemessen. Buttersäure, α -Pinen und Phenylelessigsäure lagen in Konzentrationen über 2.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vor. Mit Konzentrationen zwischen 110 und 690 $\mu\text{g}/\text{kg}$ waren Myrcen, 2-Methylbuttersäure und die Phenole 2,6-Dimethoxyphenol, 4-Allyl-2-methoxyphenol und 4-Methylphenol vertreten. Da erst über die Geruchsschwelle eines Aromastoffs ein Bezug der quantitativen Daten zu der jeweiligen Lebensmittelmatrix Rückschlüsse auf die Aromarelevanz zulässt, wurden mit Hilfe der Geruchsschwellen (in Öl) die jeweiligen Aromawerte (Verhältnis eines Aromastoffs zu seiner Geruchsschwelle) der quantifizierten Verbindungen berechnet. Von den 36 quantifizierten Aromastoffen erhielten 20 einen Aromawert ≥ 1 , was bedeutet, dass diese Aromastoffe zum Gesamtaroma beitragen. Essigsäure erreichte den höchsten Aromawert (1.100). Der zweithöchste Aromawert mit 280 wurde für das nach Popcorn riechende 2-Acetyl-1-pyrrolin gefunden. Die schweißig riechende 3-Methylbuttersäure hatte einen Aromawert von 190. Weitere wichtige Aromastoffe waren Phe-

nylacetaldehyd (140), 3-(Methylthio)propanal (33) und 3-Methylbutanal (4). Zur Simulation des Rohwurstaromas und zur Überprüfung der erhaltenen Daten wurden alle Verbindungen mit Aromawerten ≥ 1 entsprechend ihrer Konzentrationen in einem Öl-Wasser-Gemisch gelöst. Ein geschultes Sensorikpanel verglich anschließend Aromamodell und italienische Rohwurst und bewertete die Ähnlichkeit beider Proben auf einer Skala von 0 bis 3 (0: keine Ähnlichkeit; 3: identisch) mit 2,3. Deshalb konnte davon ausgegangen werden, dass alle relevanten Aromastoffe der italienischen Salami erfasst wurden.

In Rohwürsten kann es auch zur Bildung unerwünschter/toxischer Metabolite, wie den biogenen Aminen, kommen. Deshalb wurden in 19 unterschiedlichen Rohwürsten die Bildung ausgewählter biogener Amine (Tyramin, Tryptamin, Histamin, 2-Phenylethylamin, Putrescin, Cadaverin, Ethanolamin und β -Alanin) während des Fermentationsprozesses (0 bis zu 35 Tage) untersucht. Dafür wurden Rohwürste hergestellt, denen verschiedene Starterkulturen (*S. carnosus* TMW 2.208, *S. carnosus* TMW 2.1148, *S. carnosus* TMW 2.1147, *L. curvatus* TMW 1.1876, *L. sakei* K23 TMW 1.1322) – einzeln und in Kombination – zugesetzt wurden. Weitere Würste, ohne einen Zusatz von Starterkulturen (Spontanfermentation), wurden als Kontrolle hergestellt. Nach verschiedenen Tagen werden die Konzentrationen der biogenen Amine nach der im IGF-Projekt AiF 15458 N entwickelten Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) bestimmt.

In allen untersuchten Proben waren die Konzentrationen der Amine Tryptamin, Histamin, 2-Phenylethylamin und Putrescin am Tag der Wurstherstellung < 1 mg/kg. Die Konzentrationen von Cadaverin, Ethanolamin, β -Alanin und Tyramin waren höher. Während β -Alanin mit rund 25 mg/kg enthalten war, lagen die Konzentrationen von Cadaverin (teilweise) und Ethanolamin zu diesem Zeitpunkt zwischen 1 und 10 mg/kg. Die Gehalte von Tyramin zeigten Schwankungen zwischen < 1 mg/kg und 50 mg/kg am Tag der Wurstherstellung. Während des gesamten Reifeprozesses nahmen die Gehalte aller biogenen Amine kontinuierlich zu. Ferner zeigte sich die Tendenz, dass in den Rohwürsten ohne Zusatz von Starterkulturen nach der Reife höhere Amin-Mengen gebildet wurden als in den Rohwürsten mit zugesetzten Starterkulturen. Die höchsten Konzentrationen wurden für Tyramin (253 mg/kg) und Putrescin

(294 mg/kg) gefunden. Allerdings wurden beim Vergleich zweier verschiedener spontanfermentierter Rohwürste große Schwankungen bemerkt. Der Zusatz von *L. sakei* – alleine und in Kombination – hatte (teilweise) einen leicht minimierenden Effekt auf die Bildung biogener Amine.

Um einen weiteren Einblick in das Bildungsverhalten biogener Amine zu erhalten, wurden in je einem Set an drei unterschiedlichen Rohwürsten, hergestellt von fünf verschiedenen Fachbetrieben, mit verschiedenen Salz-Zusätzen ((i) Kochsalz, (ii) Nitrat und (iii) Nitrit) ebenfalls die Konzentrationen der biogenen Amine (Tyramin, Tryptamin, Histamin, Phenylethylamin, Putrescin, Cadaverin, Ethanolamin und β -Alanin) bestimmt.

Für Tyramin wurden mit mehr als 200 mg/kg die höchsten Konzentrationen bestimmt. Allerdings zeigte der Vergleich der Würste innerhalb einer „Salz-Gruppe“ und auch der Vergleich der drei „Salz-Gruppen“, dass die Tyramin-Konzentrationen einem großen Schwankungsbereich (16,0–221 mg/kg) unterlagen. Auch für die Konzentrationen von Putrescin, Cadaverin, Tryptamin und 2-Phenylethylamin wurden große Schwankungen festgestellt. Dennoch konnte für einige Amine der Eindruck gewonnen werden, dass der Einsatz von Pökelsalz einen leicht minimierenden Effekt auf die Aminbildung hatte. β -Alanin, Ethanolamin und Histamin wurden von den einzelnen Salzzugaben nicht beeinflusst.

Die Untersuchungen zu biogenen Aminen sowohl bei unterschiedlichen Starterkulturen als auch bei verschiedenen Salzzusätzen zeigte, dass diese Zugaben die Bildung bestimmter Amine beeinflussen kann, dass allerdings auch die durch die Rohware eingebrachte Mikroflora einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Bildung hatte.

Biogene Amine können beim Menschen zu gesundheitlichen Problemen führen. Insbesondere sind dabei die Tyramin- und Histamin-Gehalte von großer Bedeutung. Die Tyramin-Konzentrationen in den untersuchten Rohwürsten erreichten Werte von über 250 mg/kg. Da sich Mengen von mehr als 6 mg Tyramin bei empfindlichen Menschen bereits negativ auf die Gesundheit auswirken können, wäre bereits der Verzehr von 35 g einer solchen Rohwurst als bedenklich einzustufen. Bei gesunden Erwachsenen führen 200–800 mg Tyramin zu einer leichten (30 mm Hg) Erhöhung des Blutdrucks,

weshalb für diese Personen der Verzehr als unbedenklich einzustufen war.

Auch hinsichtlich der Histamin-Konzentrationen (bis zu 10 mg/kg) konnten die Salamis als unbedenklich für den Verbraucher eingestuft werden, da für einen gesunden Erwachsenen erst Konzentrationen zwischen 100 und 200 mg als gesundheitlich bedenklich gelten. Für Histamin-Intolerante Menschen haben bereits kleinste Mengen dieses Amins einen negativen Effekt auf die Gesundheit. Deshalb wäre für diese Personengruppe von einem Verzehr der untersuchten Rohwürste abzuraten.

Mit dem Ziel das „Pökelaroma“ von Rohwürsten zu ermitteln, wurde aus den bereits erwähnten Rohwürsten, hergestellt mit verschiedenen Salz-Zusätzen ((i) Kochsalz, (ii) Nitrat und (iii) Nitrit) Ether-Extrakte gewonnen mit welchen je eine Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA) durchgeführt wurde. Die geruchsaktiven Bereiche wurden anschließend mithilfe von Referenzsubstanzen identifiziert und mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) quantifiziert.

Die höchsten Konzentrationen (1.059.000 bis 1.458.000 mg/kg) wurden in allen drei Salamis für Essigsäure bestimmt. Auch Linalool, Buttersäure, Hexanal und α -Pinen waren in Konzentrationen zwischen 900 und 5000 mg/kg enthalten. Dabei waren die Gehalte der einzelnen Verbindungen in den drei Würsten sehr ähnlich. 2-/3-Methylbuttersäure (1017 μ g/kg) und (*E,E*)-2,4-Decadienal (362 μ g/kg) waren jedoch in der NPS-Salami in größeren Mengen enthalten als in der NaCl- bzw. NO₃-Salami. Für 2-Methylbutanal, 3-Methylbutanal, (*E*)-2-Nonenal und 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd wurden in beiden gepökelten Produkten (Nitrat und NPS) höhere Konzentration bestimmt als in der NaCl-Salami. Gegenteilig verhielt es sich für die Verbindungen 3-(Methylthio)propanal. Hierfür wurden in der NaCl-Salami höhere Konzentrationen bestimmt als in beiden gepökelten Würsten.

Anschließend wurden ausgewählte Aromastoffe (Phenylacetaldehyd, Phenyllessigsäure, 3-(Methylthio)propanal, 3-Methylbutanal, *p*-Kresol und 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon) in weiteren Sets (Kochsalz-, Nitrat- und Nitritpökelsalz-Zusatz) an Salamis, hergestellt von unterschiedlichen Fachbetrieben und damit an unterschiedlichen Standorten, untersucht, um den Einfluss unterschiedlicher Rohware und unterschiedlicher Herstellungsbetriebe zu untersuchen. Die verwendeten Rezepturen sowie die

Reifebedingung waren bei allen Herstellern gleich.

Die höchsten Konzentrationen wurden, unabhängig von der Salz-Zugabe, für Phenylacetaldehyd und Phenylelessigsäure bestimmt. Für den Aldehyden wurden Konzentrationen um die 1.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bestimmt mit Ausnahme von zwei Salamis (NaCl- und NO_3 -Salami), in denen mehr als 5.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bestimmt wurden und drei Salamis (NaCl-, NO_3 - und NPS-Salami), in denen nur rund 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ gefunden wurden. Ähnliches zeigte sich auch für Phenylelessigsäure. Die höchsten Gehalte (1.055 bzw. 903 $\mu\text{g}/\text{kg}$) wurden in einer NaCl- bzw. NO_3 -Wurst gemessen. In den verbleibenden Proben wurde eine Konzentration von 557 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nicht überschritten. Auf die Bildung von 3-(Methylthio)propanal hatte das Pökeln einen leicht minimierenden Effekt. Dessen Gehalte waren in den NaCl-Salamis höher als in den Salamis mit NO_3 - oder NPS-Zusatz. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass (wie schon bei den biogenen Aminen) manche Aromastoffe durch die unterschiedlichen Salzzugaben beeinflusst wurden, dass allerdings die „spontan“ eingebrachte Mikroflore einen größeren Einfluss zeigte.

Die Rohwürste mit unterschiedlichen Salzzugaben wurden auch auf die verbleibenden Nitrat- und Nitrit-Gehalte hin analysiert. Die Konzentrationen an Nitrat in den einzelnen Rohwurstproben lagen deutlich unter den vorgegebenen Richtwerten (175 mg/kg, ausgedrückt als Natriumnitrit bzw. 250 mg/kg, ausgedrückt als Natriumnitrat), weshalb die untersuchten Rohwürste hinsichtlich ihrer Nitrat- und Nitrit-Konzentrationen als unbedenklich eingestuft werden konnten.

Um einen ersten Einblick in ein eventuelles Nitrosamin-Vorkommen in Rohwurst zu gewinnen, wurde kommerziell erhältliche Salami mit Dichlormethan extrahiert, mittels SAFE destilliert und der Extrakt mithilfe eines GC-GC/MS-Systems vermessen. Dafür wurden Rohwürste mit (Würste wurden mit folgenden Verbindungen in Konzentrationen von 200–250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ gespickt: N-Nitrosodimethylamin, -diethylamin, -piperidin und -pyrrolidin) und ohne Nitrosamin-Zusatz extrahiert und analysiert. In den Spike-Experimenten wurden, mit Ausnahme von NDEA, alle Nitrosamine wiedergefunden. Folglich können mit der angewendeten Methode die ausgewählten Nitrosoverbindungen erfasst werden. Durch das Screening der nicht-gespickten Rohwurst wurde keines der ausgewählten Nitro-

samine detektiert. Dies ist auch im Einklang mit der gängigen Literaturmeinung, dass Nitrosamine überwiegend durch den Einfluss von Hitze gebildet werden, wenn entsprechende Voraussetzungen gegeben sind.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Das Aroma fermentierter Lebensmittel sowie die gesundheitliche Unbedenklichkeit stehen für Hersteller und Verbraucher an oberster Stelle. Fermentierte Fleischwaren gehören dabei zu den sensorisch attraktivsten Lebensmitteln, die gleichzeitig eine hohe Wertschöpfung ermöglichen. Die Bildung von Verbindungen, die diese Eigenschaften auf molekularer Ebene bestimmen, hängt neben dem verwendeten Rohmaterial von der verwendeten Starterkultur und den Fermentationsbedingungen ab. Die deutsche Fleischwarenindustrie ist mittelständisch strukturiert. Von den ca. 700 produzierenden Unternehmen gehören 400 zu den kleinen und mittelständischen Unternehmen. Die fleischverarbeitende Industrie in Deutschland hat einen Jahresumsatz von ca. 15 Mrd. € mit Wachstumsraten im zweistelligen Bereich und ca. 80.000 Beschäftigten.

Die Ergebnisse aus diesem Projekt liefern auf vorwettbewerblicher Ebene Kriterien für eine effektive Auswahl, Kombination und Anwendung sicherer Organismen gemäß QPS-Kriterien und schaffen die Voraussetzungen für die Entwicklung neuer Produkte und die Sicherung der Vielfalt bestehender, sensorisch attraktiver Fleischwaren. Die Kombination von Stämmen und Fermentationsbedingungen erlaubt ein unternehmensspezifisches Produktspektrum, das sich aus den jeweiligen Anwendungen ergibt. Dies eröffnet kleinen und mittelständischen Unternehmen die Chance, sich zu diversifizieren und am Markt zu behaupten. Das Potenzial neuer Stämme kann über einen einfachen (PCR)-Test auf An- bzw. Abwesenheit der ermittelten Leitgene ermittelt werden. Die Verwendung von Stämmen, die biogene Amine oder Fehlaramastoffe bilden können, werden ausgeschlossen. Dadurch können Unternehmen, die Starterkulturen produzieren ebenso wie die Lebensmittelindustrie entsprechende EFSA-Richtlinien einhalten. Die Qualität fermentierter Fleischwaren kann damit entsprechend der wachsenden Verbraucheransprüche gesichert und die große Ressource einer Vielzahl bisher ungenutzter Organismen industriell erschlossen werden.

Publikationen (Auswahl):

1. Schlussbericht 2013.
2. Kreißl, J. und Schieberle, P.: Zum Einfluss von Nitritpökelsalz auf die Bildung von Aromastoffen und biogenen Aminen bei der Herstellung von Rohwurst. Jahresbericht Dt. Forschungsanst. Lebensmittelchem. (DFA), ISBN 978-3-938896-85-3, 40-43 (2014).
3. Kreißl, J. und Schieberle, P.: Influence of curing on selected aroma compounds and biogenic amines in fermented sausage. Jahresbericht Dt. Forschungsanst. Lebensmittelchem. (DFA), ISBN 978-3-938896-85-3, 147 (2014).
4. Kreißl, J. und Schieberle, P.: Einfluss von Pökelsalz auf die Bildung wichtiger Aromastoffe in Salami. Jahresbericht Dt. Forschungsanst. Lebensmittelchem. (DFA), ISBN 978-3-938896-74-7, 44-47 (2013).
5. Kreißl, J. und Schieberle, P.: Influence of curing on the formation of important aroma compounds in salami. Jahresbericht Dt. Forschungsanst. Lebensmittelchem. (DFA), ISBN 978-3-938896-74-7, 168 (2013).
6. Kreißl, J., Mayr, C., Söllner, K. und Schieberle, P.: Important aroma compounds in salami and correlations with biogenic amines. Flavour Sci. Proc. XIII Weur. Flav. Res. Symp. (Ferreira, V., Lopez, R., eds.), Acad. Press, Elsevier, Amsterdam, ISBN 978-0-12-398549-1, 133-136 (2013).
7. Freiding, S., Ehrmann, M.A. und Vogel, R.F.: Comparison of different *IlvE* aminotransferases in *Lactobacillus sakei* and investigation of their contribution to aroma formation from branched chain amino acids. Food Microbiol. 29, 205-214 (2012).
8. Freiding, S., Gutsche, K. A., Ehrmann, M. A. und Vogel, R. F.: Genetic screening of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* strains for their peptidolytic systems and amino acid metabolism, and comparison of their volatiles in a model system. Syst. Appl. Microbiol. 34, 311-320 (2011).

9. Vogel, R.: Bewertung von Starterkulturen in der Rohwurstproduktion: Am Scheideweg zwischen Aroma und Sicherheit. Tagungsband FEI-Jahrestagung 2011, 85-97 (2011).

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW
Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie
Gregor-Mendel-Str. 4, 85354 Freising
Tel.: +49 8161 71-3663
Fax: +49 8161 71-3327
E-Mail: Rudi.Vogel@wzw.tum.de

Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (DFA)
Lise-Meitner-Straße 34
85354 Freising-Weihenstephan
Tel.: +49 8161 71-2932
Fax: +49 8161 71-2970
E-Mail: peter.schieberle@lrz.tum.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.