

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

Angefertigt am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie

Max Rubner-Institut, Kulmbach

(Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis)

Psychrotolerante Hefen in vakuumverpacktem Fleisch

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Constanze Erl-Höning

geb. Höning

aus Weiden in der Oberpfalz

München 2014

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Müller

Tag der Promotion: 08. Februar 2014

Meiner Familie

A. bidest	Aqua bidestillata
A. dest.	Aqua destillata
ASU	Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren
ATP	Adenosin-Triphosphat
a_w -Wert	Wasseraktivität
BAG	Bundesamt für Gesundheit, Schweiz
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin
bp	Basenpaare
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht
cm ²	Quadratcentimeter
DHL-Agar	Desoxycholate-Hydrogen-Sulfide-Lactose-Agar
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
g	Gramm
GYP-Agar	Glucose-Yeastextract-Pepton-Agar
ICMSF	International Commission on Microbiological Specification for Foods of the International Union of Microbiological Societies
KbE	Koloniebildende Einheit
LAL-Wasser	Hochreines Wasser für Molekularbiologie
MEA ⁺ -Agar	Malzextrakt-Agar mit Novobiocin
ml	Milliliter
MRI	Max Rubner-Institut
MRS-Agar	Lactobacillus-Agar nach de Man, Regosa und Sharpe
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
rDNA	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
STD I-Agar	Standard I-Agar
x g	Multiplikation mit Erdbeschleunigung
YCB	Yeast Carbon Base
YGC-Agar	Yeastextract-Glucose-Chloramphenicol-Agar + Bromphenolblau
YNB	Yeast Nitrogen Base
ZIEL	Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung, Weihenstephan
µl	Mikroliter

1 Einleitung	1
2 Schrifttum	2
2.1 Eigenschaften von vakuumverpacktem Fleisch	2
2.1.1 Fleischreifungsprozess in der Vakuumverpackung	2
2.1.2 Mikrobiota auf vakuumverpacktem Fleisch.....	4
2.1.3 Haltbarkeit von vakuumverpacktem Fleisch	6
2.2 Verderb von vakuumverpacktem Fleisch	7
2.2.1 Definition und lebensmittelrechtliche Einordnung von Verderb	7
2.2.2 Nichtmikrobieller Verderb von vakuumverpacktem Fleisch	8
2.2.3 Mikrobieller Verderb von vakuumverpacktem Fleisch	9
2.3 Psychrotolerante Hefen	12
2.3.1 Begriffsbestimmung.....	12
2.3.2 Eigenschaften und Vorkommen von psychrotoleranten Hefen.....	13
2.3.2.1 Psychrotolerante Hefen in der Umwelt.....	17
2.3.2.2 Psychrotolerante Hefen in Lebensmitteln	17
2.3.2.3 Psychrotolerante Hefen in vakuumverpacktem Fleisch	22
2.3.3 Nachweis und Identifizierung psychrotoleranter Hefen.....	23
2.3.3.1 Kolonie- und Zellmorphologie	23
2.3.3.2 Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie.....	23
2.3.3.3 Molekularbiologische Untersuchung	24
2.3.3.4 Physiologische Charakterisierung.....	24
2.4 Reinigung und Desinfektion zur Inaktivierung von Hefen	26
2.4.1 Gesetzliche Vorgaben und Begriffsbestimmung.....	26
2.4.2 Reinigungs- und Desinfektionstechniken.....	26
3 Eigene Untersuchungen	28
3.1 Material	28
3.1.1 Hefestämme	28
3.1.2 Probenmaterial	29
3.2 Methoden	30
3.2.1 Marktstudie über vakuumverpacktes Fleisch.....	30
3.2.1.1 Sensorische Prüfung.....	30
3.2.1.2 Bakterioskopische Untersuchung.....	31
3.2.1.3 Bestimmung des pH- und a_w -Werts	31
3.2.1.4 Mikrobiologische Untersuchung.....	32

3.2.2 Untersuchung isolierter Hefen	33
3.2.2.1 Isolierung und Stammhaltung der Hefekolonien	34
3.2.2.2 Morphologie der Hefekolonien	35
3.2.2.3 Temperaturabhängiges Wachstum	35
3.2.2.4 FTIR-Untersuchung	35
3.2.2.5 Sequenzanalyse	36
3.2.2.6 Lichtmikroskopische Untersuchung der Hefezellen	38
3.2.3 Untersuchung nicht eindeutig identifizierter Spezies	38
3.2.3.1 Ascosporenbildung	38
3.2.3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung	38
3.2.3.3 Physiologische Charakterisierung der Hefeisolate	39
3.2.3.3.1 Aerobe Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen	39
3.2.3.3.2 Aerobe Verwertung verschiedener Stickstoffquellen	41
3.2.3.3.3 Anaerobe Verwertung von Kohlenhydrat- und Stickstoffquellen..	41
3.2.3.3.4 Wachstumsvermögen in vitaminfreiem Medium	42
3.2.3.3.5 Wachstumsvermögen bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen	42
3.2.3.3.6 Wachstumsvermögen bei erhöhter Glucosekonzentration	42
3.2.3.3.7 Ureasetest	43
3.2.3.3.8 Diazonium Blue B-Test	43
3.2.4 Challengeversuche	44
3.2.4.1 Herstellung des Inokulationspools	44
3.2.4.2 Auswahl und Vorbereitung des Probenmaterials	45
3.2.4.3 Beimpfung der Probenstücke	46
3.2.4.4 Lagerung und Verlaufskontrollen	47
3.2.5 Untersuchungen zur Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln	48
3.2.5.1 Zusammenstellung der Hefepools	48
3.2.5.2 Beimpfung der Testplättchen	49
3.2.5.3 Behandlung mit den Desinfektionslösungen und Auswertung	50
4 Ergebnisse	52
4.1 Marktstudie über vakuumverpacktes Fleisch	52
4.1.1 Sensorische Untersuchungsergebnisse	52
4.1.2 Bakterioskopische Untersuchungsergebnisse	54
4.1.3 pH- und a_w -Wert-Messergebnisse	54
4.1.4 Mikrobiologische Untersuchungsergebnisse	55

4.1.4.1 Aerobe, mesophile Keimzahl und Milchsäurebakterien	56
4.1.4.2 Enterobacteriaceen und Pseudomonaden	58
4.1.4.3 Hefen	60
4.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Marktstudie	61
4.2 Charakterisierung der isolierten Hefen	62
4.2.1 Einteilung der Hefen anhand der Koloniemorphologie	62
4.2.2 Einteilung der Hefen anhand des temperaturabhängigen Wachstums.....	65
4.2.3 Identifizierung der Hefen durch FTIR-Untersuchung	66
4.2.4 Identifizierung der Hefen durch Sequenzanalyse	68
4.2.4.1 PCR und Gelelektrophorese	68
4.2.4.2 Auswertung der Sequenzierung.....	68
4.2.5 Übersicht über die Hefeisolate der Marktstudie	70
4.3 Neubeschreibung von <i>Kazachstania psychrophila</i>	74
4.3.1 Koloniemorphologie	74
4.3.2 Temperaturabhängiges Wachstum.....	74
4.3.3 Zellmorphologie, Sprossung und Ascosporenbildung.....	75
4.3.4 Sequenzanalyse	76
4.3.5 Physiologische Charakterisierung	78
4.4 Challengeversuche	80
4.4.1 Challengeversuche mit <i>Candida</i> spp.	80
4.4.1.1 Physikalisch-chemische Parameter	80
4.4.1.2 Mikrobiologische Parameter.....	81
4.4.1.3 Sensorische Beurteilung	84
4.4.2 Challengeversuche mit <i>Mrakia</i> spp.....	86
4.4.2.1 Physikalisch-chemische Parameter	86
4.4.2.2 Mikrobiologische Parameter.....	87
4.4.2.3 Sensorische Beurteilung	91
4.4.3 Challengeversuche mit <i>Kazachstania</i> spp.....	93
4.4.3.1 Physikalisch-chemische Parameter	93
4.4.3.2 Mikrobiologische Parameter.....	94
4.4.3.3 Sensorische Beurteilung	98
4.4.4 Zusammenfassung der Challengeversuche	100
4.5 Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln	101
4.5.1 Wirksamkeit auf glatten Schneidbrettern	101
4.5.2 Wirksamkeit auf eingeritzten Schneidbrettern	102

4.5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	104
5 Diskussion	105
6 Zusammenfassung	116
7 Summary	118
8 Literaturverzeichnis.....	120
9 Tabellenverzeichnis.....	135
10 Abbildungsverzeichnis	137
11 Anhang	144
11.1 Material	144
11.1.1 Kulturelle Verfahren.....	144
11.1.2 Polymerasekettenreaktion und Sequenzierung	145
11.1.3 Physiologische Charakterisierung	147
11.1.4 Challengeversuche	149
11.1.5 Desinfektionsmittelversuche	149
11.1.6 Sonstige Materialien und Geräte	149
11.2 Marktstudie.....	151
11.3 Physiologische Charakterisierung	156
12 Danksagung	158

1 Einleitung

In den letzten Jahren hat sich im Metzgerhandwerk ein Strukturwandel vollzogen. Da nach dem EU-Hygienepaket Schlachtstätten der Zulassungspflicht unterliegen, haben besonders viele, vor allem kleinere Metzgereibetriebe, die eigene Schlachtung eingestellt.

Sie kaufen das benötigte Fleisch direkt vom Schlachthof oder vom Großhandel zu. Teils werden in diesen Bereichen Schlachtkörperhälften oder -viertel gehandelt, jedoch wird ein zunehmender Anteil weiter zerlegt und als Teilstücke verkauft. Auf diese Weise kann der Einzelhandel entsprechende Fleischstücke in der benötigten Menge beziehen und ist nicht gezwungen, alle Teile eines Schlachtkörpers zu verwerten.

Daraus resultierend gewinnt in zunehmendem Maß vakuumverpacktes Fleisch besonders im Großhandel an Bedeutung. Die Gründe für diese Art der Vermarktung liegen in der guten Haltbarkeit, der geringen Kontaminationsgefahr und der Möglichkeit der Reifung in der Verpackung. Deshalb ist vakuumverpacktes Fleisch auch gut geeignet für lange Beförderungstrecken (Husband, 1982; Seideman und Durland, 1982; Tändler und Heinz, 1970a und b).

Trotz der genannten Vorteile kann es auch bei gekühltem, vakuumverpacktem Fleisch zu Verderbsprozessen durch verschiedene Mikroorganismen kommen. Insbesondere über psychrotolerante Hefen und den Zusammenhang mit Verderbsprozessen bei vakuumverpacktem Fleisch gibt es bislang wenige wissenschaftliche Untersuchungen.

Ziel der Arbeit war es, einen Überblick über das Vorkommen und die Vielfalt der psychrotoleranten Hefenpopulation auf vakuumverpacktem Rind-, Wild-, Lamm- und Straußenfleisch zu geben und zu überprüfen, ob psychrotolerante Hefen hier einen Verderb verursachen. Dies wurde durch Challengeversuche untersucht und ebenso die Wirksamkeit von verschiedenen Desinfektionsmitteln gegenüber psychrotoleranten Hefen getestet.

2 Schrifttum

2.1 Eigenschaften von vakuumverpacktem Fleisch

2.1.1 Fleischreifungsprozess in der Vakuumverpackung

Der Reifeprozess von schlachtfischem Fleisch ist ein Vorgang, welcher dazu dient, die Verzehrseigenschaften optimal zu entwickeln. Er ist unerlässlich, um ein qualitativ hochwertiges Lebensmittel zu erhalten. Die Fleischreifung erfolgt dabei in zwei Phasen.

Die erste Phase beginnt bereits während des Abkühlens des noch warmen Fleisches nach dem Schlachten. Durch die fehlende Blut- und Sauerstoffversorgung wird anaerob Glykogen zu Milchsäure abgebaut. Dabei lässt das entstehende Laktat den pH-Wert von 7 auf unter 5,8 absinken. Solange im Muskel noch Energie in Form von Adenosin-Triphosphat (ATP) vorhanden ist, können die Aktin- und Myosinfilamente sich voneinander lösen. Nach Erschöpfung der ATP-Reserven und Beendigung der ATP-Resynthese setzt in der Muskulatur der Rigor Mortis ein (Binke, 2003; Prändl, 1988; Schwägele, 2003).

Die eigentliche Fleischreifung erfolgt nun in der zweiten Phase, in der sich der Rigor Mortis löst. Dies geschieht beim Rind etwa nach 36 bis 40 Stunden. Es kommt hierbei zur Proteolyse der myofibrillären Strukturen durch fleischeigene Enzyme wie Calpaine und Kathepsine (Koochmaraie und Geesink, 2006). Diese Auflösung der Muskelfaserstrukturen ist verantwortlich für die Fleischzartheit und setzt zudem Aminosäuren frei, welche entscheidend für die Ausbildung des typischen Aromas sind. Durch die dabei einsetzende Kollagenquellung nimmt das Wasserbindungsvermögen und somit auch die Saftigkeit des Fleisches zu (Binke, 2003; Prändl, 1988; Schwägele, 2003).

Der traditionelle Reifeprozess von Rindfleisch geschieht durch die Trockenreifung, dem sog. Abhängen der Schlachttierviertel oder -hälften im Kühlraum bei 0 °C bis + 4 °C über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen. Allerdings reifen beim „Dry-Aging“ vor allem hochwertige Teilstücke wie beispielsweise das Roastbeef über einen deutlich längeren Zeitraum von fünf bis sechs Wochen (Campbell et al., 2001; Parrish et al., 1991; Prändl, 1988; Smith, 2007). Entscheidend für eine optimale Rei-

fung sind hierbei neben der strengen Hygiene bei Schlachtung, Zerlegung und Lagerung des Ausgangsmaterials eine konstant niedrige Temperatur, eine Luftfeuchtigkeit von 75 bis 85 % und eine niedrige Luftgeschwindigkeit in den Kühlräumen (Campbell et al., 2001; Parrish et al., 1991; Savell, 2012).

Während dieser Reifungszeit treten relativ hohe Verdunstungsverluste und eine Abtrocknung der Fleischoberfläche auf. Verläuft die Trockenreifung nicht unter den entsprechenden klimatischen und hygienischen Bedingungen, kann es zu einer Vermehrung der Oberflächenkeime kommen, wodurch schmierige Auflagerungen auf dem Fleisch entstehen und dadurch die Haltbarkeit vermindert wird. (Prändl, 1988; Savell, 2012; Seideman und Durland, 1982; Tändler und Heinz, 1970a).

Im Gegensatz hierzu hat das Raumklima bei der Nassreifung, dem sog. „Wet-Aging“, einen geringen Einfluss. Bei dieser Reifungsart werden frische Fleischteilstücke in Folien unter Vakuum verpackt. Der Reifeprozess läuft dabei in der Vakuumverpackung bei Temperaturen zwischen 0 °C und + 4 °C ab (Minks und Stringer, 1972; Tändler und Heinz, 1970a und b). Höhere Temperaturen bis zu + 10 °C werden bei der Schnellreifung beschrieben, jedoch ist diese Reifungsart bedenklich, da sowohl sensorische Veränderungen, als auch eine Oberflächenkeimzahlvermehrung verstärkt werden (Tändler und Heinz, 1970a und b).

Bei Rindfleisch kann nach vollständiger Durchkühlung des Schlachtkörpers der gesamte Reifeprozess in der Vakuumverpackung erfolgen (Tändler und Heinz, 1970b). Ein Zartwerden des Fleisches ist hierbei ab einer Reifezeit von zwei bis vier Wochen zu erkennen (Heinz, 1974). Teils werden auch Reifezeiten von sechs bis acht Wochen angegeben. Im Vergleich zur Trockenreifung treten bei der Nassreifung geringere Trocknungsverluste auf (Minks und Stringer, 1972; Tändler und Heinz, 1970a). Auch ist durch die Verpackungsfolie ein Schutz vor Schmutzkontaminationen und Umgebungsmikroorganismen gewährleistet, was auch einen längeren Transport beispielsweise auf dem Seeweg ermöglicht. Hierbei kann die Transportdauer als Reifezeit genutzt werden (Heinz, 1974; Minks und Stringer, 1972; Seideman und Durland, 1982).

Auch bei der Reifung in der Vakuumverpackung ist es entscheidend, dass die Ausgangskeimbelastung der Fleischstücke durch strenge Schlacht- und Zerlegehygiene vor dem Verpacken möglichst gering ist (Heinz, 1974; Seideman und Durland, 1982; Sutherland et al., 1975; Tändler und Heinz, 1970b). Der pH-Wert von vakuumver-

packtem Fleisch sinkt von pH 7 vor der Schlachtung in Abhängigkeit vom jeweiligen Fleischteilstück während der Reifephase nach zwei bis drei Wochen auf einen Wert von pH 5,8 bis 5,2 (Heinz, 1974).

Fleisch von Schalenwild (Schwarz-, Reh-, Rot- und Damwild) benötigt im Vergleich zum Rindfleisch eine Reifezeit von vier bis 21 Tagen (Anonymus, 2012c). Die Reifezeit von drei Wochen kann nur bei einem guten Hygienestatus des Tierkörpers erreicht werden. Meist hängen die Tierkörper während der Reifung in der Decke ab. Die Verpackung unter Vakuum erfolgt vor allem für die anschließende Lagerung (Anonymus, 2012c; Froning und Gipson, 1976).

Bezüglich der Reifezeit ist Lammfleisch vergleichbar mit Wildfleisch. Durch den Verbraucher wird Fleisch, welches vier bis 16 Tage gereift ist, bevorzugt. Auch hier wird eine Reifung in Vakuumverpackung praktiziert (Martínez-Cerezo et al., 2005).

Straußenfleisch hat ähnlich anderem Geflügelfleisch eine kurze Reifezeit von 24 Stunden. Allerdings wirkt sich eine längere Reifezeit bis zu einer Woche, welche auch in einer Vakuumverpackung verlaufen kann, positiv auf die Geschmackseigenschaften aus (Marks et al., 1998; Poławska et al., 2011).

Bezüglich der Fleischqualität wird in verschiedenen Untersuchungen bei im Vakuum gereiftem Fleisch im Vergleich zu trocken gereiftem Fleisch von einer verbesserten Zartheit gesprochen. In Bezug auf die Schmackhaftigkeit besitzt nassgereiftes Fleisch ein säuerliches und blutig-metallisches Aroma. Beim Dry-Aging treten zunehmend Röstungsaromen in den Vordergrund, was zu einer Bevorzugung durch den Verbraucher führt (Warren und Kastner, 1992). Das Rindfleischaroma bei der Vakuumreifung ist nach zehn Wochen zunächst kaum gemindert, flacht jedoch im weiteren Verlauf zunehmend ab (Tändler und Heinz, 1970a und b).

2.1.2 Mikrobiota auf vakuumverpacktem Fleisch

Auf Fleisch befinden sich zunächst mesophile, sowie psychrotolerante und psychrophile Mikroorganismen. Im Laufe der Lagerung bei Kühltemperaturen können sich jedoch hauptsächlich die psychrotoleranten und psychrophilen Mikroorganismen vermehren. Als Oberflächenkeime unter aeroben Bedingungen finden sich zum überwiegenden Teil Pseudomonaden, aber auch *Moraxella*, *Acinetobacter* und fakul-

tativ anaerobe Enterobacteriaceen (Borch et al., 1996; Gill, 1983; Gill und Newton, 1978).

Die Zusammensetzung der Mikrobiota von vakuumverpacktem Fleisch unterscheidet sich dagegen aufgrund des Ausschlusses von Sauerstoff erheblich. Während sich in den ersten Tagen nach dem Verpacken besonders Pseudomonaden auf dem Fleisch befinden, vermehren sich zunehmend fakultativ und obligat anaerobe Mikroorganismen (Gill, 1983; Gill und Newton, 1978). Im Laufe der Lagerzeit nimmt der Sauerstoffanteil in der Vakuumpackung ab. Dies führt zu einer verminderten Wachstumsrate der Pseudomonaden.

Die anaeroben Bedingungen und die Kühltemperaturen begünstigen die Vermehrung von psychrotoleranten, milchsäurebildenden Mikroorganismen. Milchsäurebakterien wie *Lactobacillus*, *Carnobacter*, *Leuconostoc* und *Pediococcus spp.* stellen schon nach kurzer Lagerzeit die dominierende Keimart dar (Bell und Garout, 1994; Gill, 1983; Gill und Newton, 1978; Heinz, 1974; Hitchener et al., 1982; Jones, 2004; Seideman et al., 1976). Die Vermehrung dieser Bakterien führt durch die Bildung von Milchsäure zu einer Senkung des pH-Werts von pH 7 vor der Schlachtung auf einen Wert von pH 5,8 und 5,2. Bei Straußenfleisch in Vakuumverpackung wurden beispielsweise in einer Untersuchung von Alonso-Calleja et al. (2004) in der ersten Woche 10^6 KbE/cm² Milchsäurebakterien nachgewiesen.

Ebenso ermöglicht das Milieu in der Vakuumverpackung kältetoleranten Enterobacteriaceen, wie zum Beispiel *Serratia liquefaciens* und *Hafnia spp.*, eine Entwicklung. Im Unterschied zu den Milchsäurebakterien werden Enterobacteriaceen jedoch durch die Kühltemperaturen stärker in ihrem Wachstum gehemmt (Grau, 1981). Zudem wird die Wachstumsrate von Enterobacteriaceen durch die Wirkung von organischen Säuren und Bacteriocinen, welche von Lactobacillen produziert werden, vermindert (Gilliland und Speck, 1975).

Da bei Wildfleisch je nach Erlegungsart oder Lage des Einschusses mit einer erhöhten Kontamination durch Enterobacteriaceen zu rechnen ist, werden hier teils hohe Keimzahlen bis 10^5 KbE/g gefunden (Anonymus, 2006b; Lenze, 1977; Türck, 2008; Winkelmayr, 2000). Auf Straußenfleisch in Vakuumverpackung lassen sich zum Teil hohe Zahlen an Enterobacteriaceen im Bereich 10^5 KbE/cm² nachweisen (Alonso-Calleja et al., 2004). Von Patterson und Gibbs (1978) konnten in vakuumverpacktem Lammfleisch nach einer Lagerzeit von sechs Wochen zahlreich kältetolerante Enterobacteriaceen gefunden werden.

Die Enterobacteriaceen werden folglich meist im Laufe der Lagerzeit von den Milchsäurebakterien verdrängt, jedoch können bei einer unhygienischen Schlachtung oder Erlegung auch hohe Keimzahlen an Enterobacteriaceen vorkommen.

Ein weiterer, häufig isolierter Keim aus vakuumverpacktem Fleisch ist *Brochothrix thermosphacta*. Dieser vermehrt sich besonders bei einer ungenügenden pH-Wert-Absenkung (Campbell et al., 1979; Gill, 1983; Grau, 1981).

2.1.3 Haltbarkeit von vakuumverpacktem Fleisch

Die Mindesthaltbarkeit eines Lebensmittels wird vom Gesetzgeber im Rahmen des § 7 der Verordnung über die Kennzeichnung von Lebensmitteln (LMKV) als das Datum angegeben, bis zu dem das entsprechende Lebensmittel unter angemessenen Aufbewahrungsbedingungen seine spezifischen Eigenschaften behält. Die Interpretation der Haltbarkeit ist in der Literatur aufgrund der subjektiven Beurteilung nicht einheitlich.

Eine Reihe an Einflussfaktoren wirken sich auf die Dauer der Haltbarkeit von vakuumverpacktem Fleisch aus. Grundsätzlich ist die Haltbarkeit von Rindfleisch am längsten. Es werden bei Lagerungstemperaturen um den Gefrierpunkt Zeiten von zehn bis über zwölf Wochen genannt (Bell und Garout, 1994; Heinz, 1974). Voraussetzung für eine solche Haltbarkeit aus mikrobiologischer Sicht ist eine günstige Ausgangskeimbelastung. Trotz dieser langen Haltbarkeit von mehr als zwölf Wochen muss sensorisch ab einer Lagerzeit von zehn Wochen eine Abnahme der Geschmackseigenschaften in Kauf genommen werden (Heinz, 1974; Tändler und Lee, 1985).

Bei Wild- und Lammfleisch ist von einer kürzeren Haltbarkeitsdauer auszugehen. Nach einer Untersuchung von Shaw et al. (1980) sollte die Lagerung von Lammfleisch in Vakuumverpackung auf vier Wochen beschränkt werden. Die Ergebnisse der sensorischen Beurteilung waren bei einer Lagerzeit von sechs Wochen direkt bei Öffnung der Verpackung nicht auffällig, jedoch zeigten sich innerhalb von zwei Tagen nach Öffnung deutliche Verderbsanzeichen. Auch Patterson und Gibbs (1978) ermitteln in ihren Untersuchungen eine ähnliche Zeitspanne, da hier nach sechs Wochen Lagerung bei + 7 °C deutliche sensorische Abweichungen verzeichnet wurden.

Die Haltbarkeit von frischem Wildfleisch ist aufgrund der unterschiedlichen Ausgangsbedingungen hinsichtlich der Behandlung nach der Erlegung und des mikrobiologischen Status schwer festzulegen. Dabei kann durch die Vakuumverpackung die Haltbarkeit in Abhängigkeit von der Wildbrethygiene deutlich erhöht werden (Winkelmayr, 2000). In einer Studie von Boers und Dijkman (1994) wurde die Haltbarkeit von vakuumverpacktem Wildschwein bei 0 °C untersucht. Hierbei war eine nicht tolerierbare Veränderung der Fleischfarbe und des Geruchs in Abhängigkeit vom untersuchten Teilstück ab einer Lagerzeit von fünf bis zwölf Wochen zu verzeichnen.

Die Haltbarkeit von Straußenfleisch ist am kürzesten. In verschiedenen Studien werden bei vakuumverpacktem Straußenfleisch Lagerzeiten von zehn Tagen angegeben. Teils findet auch eine Lagerung im Vakuum über 40 Tage statt. Dies ist allerdings nur möglich bei Temperaturen von 0 °C bis -3 °C. (Capita et al., 2006; Fernandez-Lopez et al., 2008; Otremba et al., 1999; Poławska et al., 2011).

2.2 Verderb von vakuumverpacktem Fleisch

2.2.1 Definition und lebensmittelrechtliche Einordnung von Verderb

Dem Begriff der Mindesthaltbarkeit eines Lebensmittels ist der Begriff des Verderbs gegenüberzustellen. Verderb wird im Artikel 14 Absatz 2b der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 durch die Formulierung „für den Verzehr durch den Menschen ungeeignet“ und im Falle der Gefährdung der Gesundheit des Verbrauchers im Absatz 2a als „gesundheitsschädlich“ beschrieben. Die von Artikel 14 Absatz 2 erfassten Lebensmittel gelten als „nicht sicher“ und dürfen nicht in den Verkehr gelangen. Bei der Einordnung eines Lebensmittels als „nicht sicher“ ist zu berücksichtigen, ob es in Bezug auf den beabsichtigten Verwendungszweck für den Verbraucher gesundheitsschädlich ist oder „das Lebensmittel infolge einer durch Fremdstoffe oder auf andere Weise bewirkten Kontamination, durch Fäulnis, Verderb oder Zersetzung ausgehend vom beabsichtigten Verwendungszweck für den Verzehr durch den Menschen inakzeptabel geworden ist“. Der unbestimmte Rechtsbegriff des „nicht sicheren Lebensmittels“ muss in der Praxis entsprechend ausgelegt werden.

Gerade beim vakuumverpackten Fleisch ist die Abgrenzung von Reifung und Verderb schwierig, da die Prozesse nicht klar voneinander getrennt werden können, sondern ein fließender Übergang besteht. Somit ist die Unterscheidung, ab wann ein

Lebensmittel als verdorben gilt, in vielen Fällen nicht eindeutig zu definieren, da geringe Abweichungen vom frischen Zustand noch nicht als Verderb bezeichnet werden (Wiegner, 1985). Ebenso haben die subjektive Empfindung des Verbrauchers sowie kulturell verschiedene Essgewohnheiten einen Einfluss auf die Beurteilung des jeweiligen Lebensmittels. Im Allgemeinen können Veränderungen der Fleischoberfläche, der inneren Beschaffenheit sowie sensorische Auffälligkeiten in Bezug auf Geruch und Geschmack, welche zunehmend von der allgemeinen Verkehrsauffassung abweichen, als Verderbsprozesse erfasst und bewertet werden. Hierbei ist aufgrund substantieller Veränderungen die Verzehrseignung für den Menschen nicht mehr gegeben (Fehlhaber, 2004).

Bei den Verderbsprozessen können mikrobielle sowie nichtmikrobielle Ursachen unterschieden werden.

2.2.2 Nichtmikrobieller Verderb von vakuumverpacktem Fleisch

Nichtmikrobielle Faktoren können biologischer, physikalischer und chemischer Natur sein (Fehlhaber, 2004).

Von biologischem Verderb wird gesprochen, wenn die Verzehrseignung des Lebensmittels durch Parasiten, wie z.B. Milben, Larven, Sarkosporidien und Finnen oder aber durch Schädlinge, wie Nagetiere und Insekten herabgesetzt wird. Diese können in der Vakuumverpackung einen Verderb verursachen, wenn sie zusammen mit dem Fleisch von Verpackungsfolie umhüllt wurden. Während der Lagerung ist der äußere Einfluss durch Schädlinge nur bei Zerstörung der Folie möglich. Zum biologischen Verderb zählen auch physiologische Abweichungen wie beispielsweise der Sexualgeruch beim Eber (Fehlhaber, 1992; Fehlhaber, 2004; Kiermeier, 1981).

Unter physikalischem Verderb lassen sich zunächst vielfältige Umwelteinflüsse wie Luftsauerstoff, Licht, Temperatur und Feuchtigkeit zusammenfassen. Diese können zu Farbveränderungen, Austrocknung oder Aufquellen des Produkts führen. Auch technologisch bedingte Fehler fallen unter diesen Begriff wie beispielsweise Verkohlungen durch zu intensive Erhitzung und der durch fehlerhafte Lagerung entstehende Gefrierbrand. Lagerungsbedingte Verunreinigungen durch Staub, Schmutz oder Fremdkörper sind ebenso erfasst wie Quetschungen, Druckstellen und Verpa-

ckungsbeschädigungen durch mechanische Einwirkung (Anonymus, 1999; Fehlhaber, 1992; Fehlhaber, 2004).

Unter dem chemischen Verderb versteht man autolytische Prozesse, welche durch fleischeigene Enzyme in den Muskelzellen ablaufen. Neben der Tatsache, dass diese am erwünschten Reifungsprozess des Fleisches teilhaben, verursachen sie bei ungehinderter Wirkung Verderbserscheinungen. Deren Fortschreiten wird vor allem durch eine zu hohe Umgebungstemperatur und den Enzymgehalt des jeweiligen Gewebes beeinflusst. Besonderen Einfluss haben zelleigene Enzyme im Bereich des Fettverderbs. Hier kommt es durch Lipasen zu Verderbsprozessen, welche auf hydrolytischen, desmolytischen und oxidativen Reaktionen beruhen. Die dabei frei werdenden Fettsäuren führen zu einer „Ranzigkeit“ des Fettes (Fehlhaber, 1992; Fehlhaber, 2004).

Bei Wildfleisch kann es zu einer besonderen Form des Verderbs kommen, welche als „stickige Reifung“ bezeichnet wird. Diese tritt auf, wenn das Wild nach dem Erlegen nicht unverzüglich und ausreichend gekühlt wird. Durch enzymatische Prozesse kommt es zu einer raschen pH-Wertabsenkung, einer kupferroten Verfärbung der Muskulatur und zu faulig-muffigem Geruch (Fehlhaber, 1992; Prändl, 1988).

2.2.3 Mikrobieller Verderb von vakuumverpacktem Fleisch

Fleisch ist aufgrund seiner Zusammensetzung aus Proteinen, Fetten und Kohlenhydraten ein ideales Nährsubstrat für Verderb verursachende Mikroorganismen (Fehlhaber, 2004).

Entscheidend für die Entwicklung der Verderbsmikrobiota ist unter anderem der a_w -Wert. Ein hoher a_w -Wert (0,95 - 1,0) steht für viel ungebundenes Wasser im Fleisch und begünstigt somit eine Vermehrung von Mikroorganismen. Bei einer Reifung im Vakuumbutel im Vergleich zum Abhängen kommt es zu keiner Abtrocknung der Fleischoberfläche und folglich zu keiner deutlichen Herabsetzung des a_w -Werts. Somit steht den Mikroorganismen bei vakuumverpacktem Fleisch ausreichend freies Wasser zur Verfügung und bietet mit Werten zwischen 0,995 und 0,985 gute Voraussetzungen für die Vermehrung.

Der pH-Wert hat ebenfalls einen Einfluss auf die Ausprägung der Verderbsmikrobiota. Die bei der Reifung des Fleisches durch die Glykolyse entstehende pH-

Wertabsenkung verlangsamt die Vermehrung einiger Mikroorganismen, jedoch kann ein mikrobieller Verderb nicht gänzlich verhindert werden (Fehlhaber, 2004).

Auch beeinflussen Außenfaktoren bei der Lagerung die Verderb bedingende Mikrobiota. Dabei hemmen Kühlung und Einfrieren bzw. Erhitzung das Wachstum vieler Mikroorganismen. Allerdings finden sich unter den Verderbserregern auch psychrotolerante Mikroorganismen, denen ein Überleben teils auch bei Gefriertemperaturen möglich ist. Die Generationsrate ist hier jedoch mit abnehmender Temperatur deutlich herabgesetzt (Fehlhaber, 2004; Schmidt-Lorenz, 1979)

Da nach der Verpackung im Vakuum keine Kontamination des Fleisches mehr stattfinden kann, ist die Ausgangssituation bezüglich vorhandener Oberflächenkeime des Fleisches vor dem Verpacken entscheidend für die im Laufe der Lagerungszeit eventuell auftretenden mikrobiellen Verderbsprozesse (Fehlhaber, 1992; Fehlhaber, 2004; Sutherland et al., 1975; Tändler und Heinz, 1970b).

Mikroorganismen verfügen über verschiedene Enzyme zur Verstoffwechslung der Substrate. Saccharolytische Prozesse durch Carbohydrasen laufen meist zu Beginn der Lagerzeit ab. Allerdings stehen Kohlenhydrate aufgrund der schnellen Verstoffwechslung nur begrenzt zur Verfügung. Diese führen durch die Spaltung von Kohlenhydraten zur Bildung von CO_2 , verschiedenen Säuren, Alkohole, Aldehyde, Dextrane und Levane. Diese Verderbsprozesse sind gekennzeichnet durch Gasbildung, Säuerung und schleimige Auflagerungen. Proteasen können die in Proteinen enthaltenen Aminosäuren zu biogenen Aminen (Histamin, Cadaverin, Indol oder Skatol) und H_2S oder NH_3 zersetzen. Dadurch entstehen teils starke Geruchsabweichungen. Lipolytische Prozesse können durch mikrobielle Lipasen verursacht werden. Eine Umsetzung der Fette in Glycerin und freie Fettsäuren führt zu Geruchs- und Geschmacksveränderungen durch das ranzig werden der Fettbestandteile. Durch oxidative Vorgänge von Oxidoreduktasen entstehen geruch- und geschmackliche Abweichungen sowie Farbveränderungen (Fehlhaber, 1992; Fehlhaber, 2004).

Bei vakuumverpacktem Fleisch entwickeln sich bei längerer Lagerung zunehmend Milchsäurebakterien (Kapitel 2.1.2). Milchsäurebakterien können als Starterkulturen zur Reifung beitragen und die Geschmacks- und Aromabildung positiv beeinflussen. Auch kann durch den gezielten Einsatz bestimmter Spezies der Verderbsprozess durch andere Mikroorganismen minimiert werden (Kröckel, 2012; Signorini et al., 2006). Deshalb ist bei vakuumverpacktem Fleisch ein leichter säuerlicher Geruch

und Geschmack typisch und erst bei zunehmender Intensität als Verderb zu beurteilen (Seideman und Durland, 1982; Tändler und Heinz, 1970a und b).

Jedoch können einige *Lactobacillus* spp. nach einer mehrwöchigen Lagerzeit zu Geschmacks- und Geruchsabweichungen sowie zu einer Gasbildung (CO₂) führen. Auch zeigen einzelne Stämme durch ihre Fähigkeit, Buttersäure oder Sulfmyoglobin zu bilden, ein erhöhtes Verderbspotential. Die Bildung von Sulfmyoglobin führt zu einer Vergrünung des Fleisches, da hier die Blut- und Muskelfarbstoffe (Hämo- und Myoglobin) oxidiert werden. Diese Prozesse verstärken sich mit zunehmender Lagerzeit und können dann in Abhängigkeit vom Ausmaß der Veränderungen als Verderb bezeichnet werden (Egan, 1983; Gill, 1983; Husband, 1982; Jones, 2004; Shay und Egan, 1981; Signorini et al., 2006; Sutherland et al., 1975).

Für vakuumverpacktes Fleisch finden sich in der VO (EG) Nr. 2073/2005 keine mikrobiologischen Grenzwerte. Da nicht alle Milchsäurebakterien Verderbsprozesse verursachen, sondern auch positiven Einfluss auf die Fleischreifung haben, kann nicht alleine aufgrund hoher Keimzahlen auf ein verdorbenes Produkt geschlossen werden. Zur Beurteilung des Verderbs von vakuumverpacktem Fleisch muss deshalb sowohl die mikrobiologische, als auch die sensorische Untersuchung berücksichtigt werden.

Verderbsprozesse durch Enterobacteriaceen bei unterschiedlichen Fleischarten werden von verschiedenen Autoren beschrieben. Schon Patterson und Gibbs (1978) beobachteten nicht tolerierbare Verderbsprozesse durch Mikroorganismen bei vakuumverpacktem Lammfleisch nach sechs Wochen bei einer Lagerung bei + 7 °C. In diesen Proben wurden Clostridien und Enterobacteriaceen vermehrt nachgewiesen. Verderbsprozesse, welche mit einer deutlichen Gasbildung einhergehen, werden bei vakuumverpacktem Fleisch auch durch Enterobacteriaceen beschrieben (Brightwell et al., 2007). Bei vakuumiertem Wildschweinfleisch wurde von Boers und Dijkman (1994) vor allem das Wachstum von Enterobacteriaceen für Verderbsprozesse bezüglich der Fleischfarbe und des Geruchs verantwortlich gemacht.

2.3 Psychrotolerante Hefen

2.3.1 Begriffsbestimmung

Die Vorsilbe „psychro-“ stammt von dem griechischen Wort psychròs und bedeutet kalt oder kühl. Als „psychrotroph“ oder „psychrotolerant“ bezeichnet man Mikroorganismen, die bei Kühl- oder Gefrieremperaturen vital bleiben. Im heutigen Sprachgebrauch wird zunehmend der Begriff „psychrotolerant“ verwendet. Zeigen sie sogar bevorzugt unter diesen Bedingungen eine Vermehrung, so werden sie als psychrophil bezeichnet (Morita, 1975).

Psychrotolerante Mikroorganismen wachsen am besten bei + 25 °C bis + 30 °C. Eine mäßige Vermehrung wird jedoch auch bei tieferen (bis - 5 °C) und höheren Temperaturen (bis + 35 °C) beobachtet. Bei psychrophilen Organismen liegt das Wachstumsoptimum bei niedrigeren Temperaturen von + 12 °C bis + 15 °C. Deren Vermehrung unterbleibt hingegen bei Temperaturen über + 15 °C bis + 20 °C. Auch bei Temperaturen um den Gefrierpunkt (+ 5 °C bis - 5 °C) bleiben psychrophile Hefen vital und zeigen ein deutliches Wachstum (Fehlhaber, 1992; Schmidt-Lorenz, 1979).

Im Sprachgebrauch werden die beiden Begriffe teils synonym verwendet, da diese nicht allgemein gültig definiert sind. Deshalb liegt dieser Arbeit die Einteilung bezüglich der Begriffsverwendung von „psychrophil“ und „psychrotolerant“ entsprechend Tabelle 1 zu Grunde.

Tabelle 1: Einteilung von Mikroorganismen nach ihren Temperaturanforderungen in Bezug auf ihr Wachstumsvermögen (nach Anonymus, 1980; Fehlhaber, 1992; Krämer, 2002; Schmidt-Lorenz, 1979)

Keimgruppe	Temperatur in °C		
	Minimum	Optimum	Maximum
psychrophil	- 5 bis + 5	+ 12 bis + 15	+ 15 bis + 20
psychrotolerant	- 5 bis + 5	+ 25 bis + 30	+ 30 bis + 35
mesophil	+ 5 bis + 10	+ 30 bis + 45	+ 35 bis + 47
thermophil	+ 40 bis + 45	+ 55 bis + 65	+ 60 bis + 90

Die Abbildung 1 nach De Lorenzo (2010) zeigt die fließenden Übergänge der Wachstumsbereiche von kälteliebenden, mesophilen und thermophilen Mikroorganismen. Im Rahmen der Anpassung an vorherrschende Umweltbedingungen können Keime

ihr Wachstumsoptimum verändern und beispielsweise von einem mesophilen Wachstumsbereich zu einem bevorzugten Temperaturbereich in Gefrierpunktnähe übergehen.

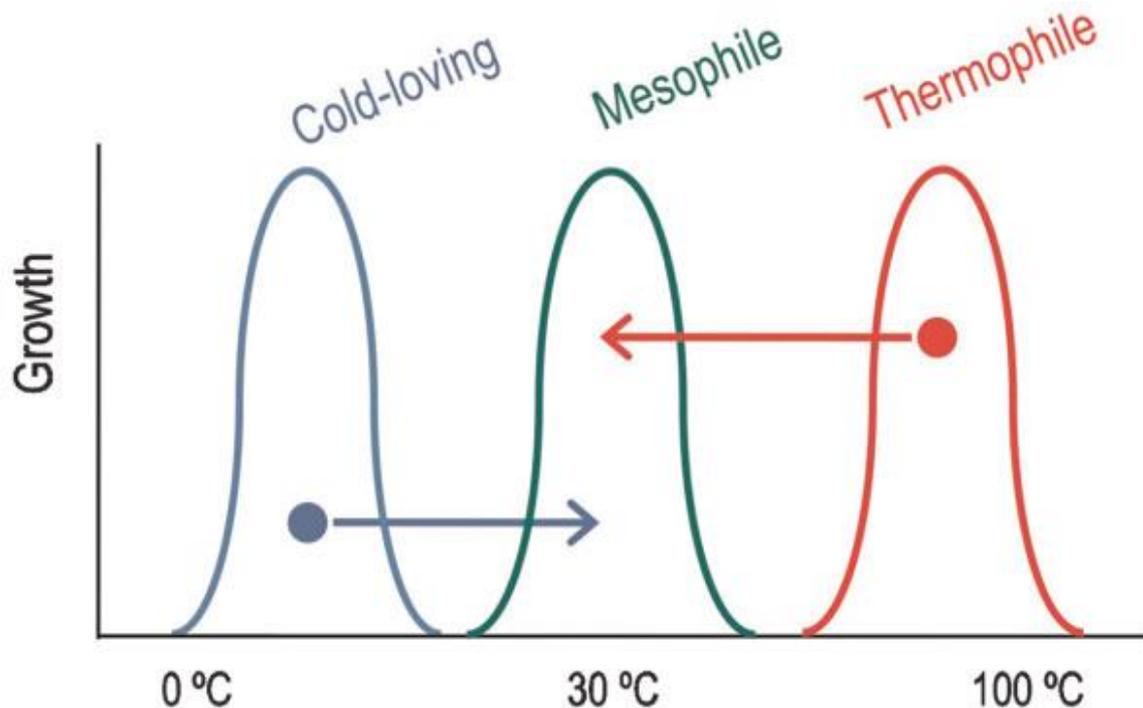


Abbildung 1: Unterschiedliche Temperaturbereiche, in denen verschiedene Mikroorganismen ein Wachstum zeigen (De Lorenzo, 2010)

2.3.2 Eigenschaften und Vorkommen von psychrotoleranten Hefen

Hefen gehören in das Reich der Pilze und sind einzellig. Die taxonomische Zuordnung von Hefen erfolgt anhand ihrer morphologischen, physiologischen, biochemischen und molekularbiologischen Eigenschaften (Barnett et al., 2000; Deák, 2008; Lodder, 1970; Phaff et al., 1966).

Hefen sind Eumycota und zählen zu den höheren Pilzen (Abbildung 2). Hefen gehören hierbei den Abteilungen der Ascomycota (Schlauchpilze), Basidiomycota (Ständerpilze) und Deuteromycota (Fungi imperfecti) an (Hibbett et al., 2007; Rolle und Mayr, 2007).

Hefezellen haben eine Größe von 6 bis 10 μm . Die Zellen sind rundlich bis oval. Wachsen sie auf definierten Nährböden sind die Kolonien meist vom cremiger, feuchter oder schleimiger Konsistenz mit weiß-beiger Farbe. Teils kommen auch rötliche Pigmente (*Rhodotorula* spp.) vor (Müller, 1961; Phaff et al., 1966).

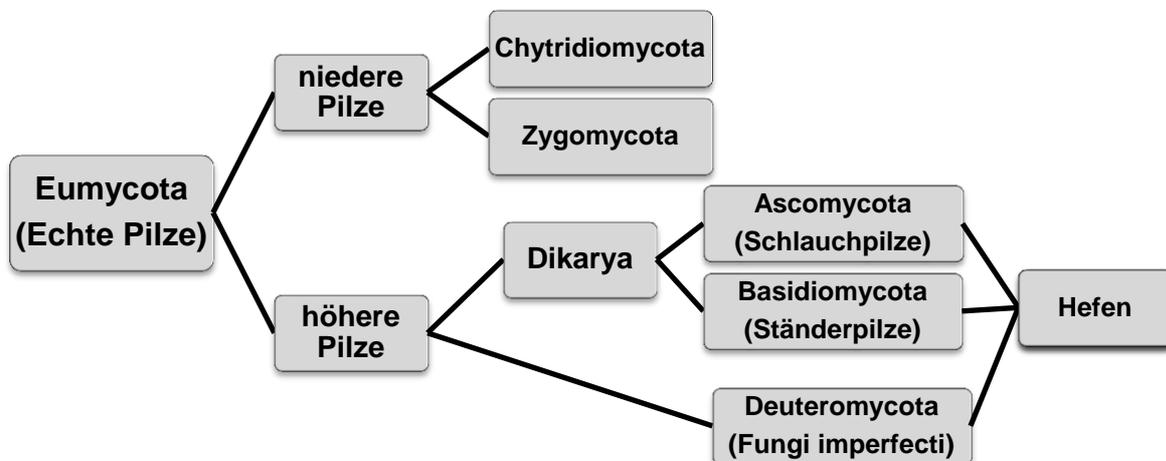


Abbildung 2: Übersicht über die Systematik der echten Pilze und taxonomische Einordnung der Hefen (nach Hibbett et al., 2007; Rolle und Mayr, 2007)

Hefen vermehren sich durch Sprossung oder Teilung. Die Sprossung ist ein ungeschlechtlicher Vermehrungsvorgang, bei der die Mutterzelle eine Tochterzelle durch eine Ausstülpung der Zellwand bildet. Die Art der Sprossung ist je nach Spezies verschieden. Eine Sprossung kann an einer Stelle (unipolar), an beiden Polen (bipolar) oder sogar an mehreren Stellen (multilateral) der Mutterzelle beobachtet werden (Moore, 1998; Müller, 1961; Phaff et al., 1966). Die Mutter- und Tochterzellen können sich entweder frühzeitig voneinander trennen oder aber in einem Sprossverband verbunden bleiben. Bleiben die Tochterzellen in Verbänden mit den Mutterzellen, findet man auch eine Knospenbildung an Stielen oder eine Elongation der Sprosszellen. Es bilden sich hierdurch fadenförmige Zellgeflechte, welche als Pseudomycel bezeichnet werden. Auch zeigen einige Hefen ein echtes Mycel durch die Bildung von Hyphen. Weiterhin können die Knospungszellen ungeschlechtliche Sporen bilden. Es entstehen sog. Arthro- bzw. Ballistokonidien durch Septierung der Hyphen bzw. durch Abschnürung (Moore, 1998; Müller, 1961; Phaff et al., 1966).

Neben der ungeschlechtlichen Vermehrung finden sich auch sexuelle Fortpflanzungsformen, welche als Ascosporen bezeichnet werden. Die Sporulation findet bei Hefen vor allem statt, wenn ein Nährstoffmangel vorliegt. Dabei kommt es zu einer meiotischen Teilung einer Hefezelle mit dem Ergebnis der Ascusbildung. In Abbildung 3 ist eine Ascuszelle dargestellt, in der sich vier haploide Keimzellen, die Ascosporen befinden (Moore, 1998; Phaff et al., 1966).



Abbildung 3: Ascosporenbildung einer Hefezelle mit Ascus (1) und Ascospore (2); (A = Ascus, eigene, schematische Darstellung; B = Ascus, Bild aus eigenen Untersuchungen)

Zudem kann anhand der Art dieser sexuellen Vermehrung eine taxonomische Einteilung in Ascomyceten (zwei konjugierte, diploide Ascosporen) und Basidiomyceten (sexuelle Teliospore und asexuelle Endosporen) vorgenommen werden. Diese zeigen eine geschlechtliche Vermehrung, wohingegen bei der Gruppe der Deuteromyceten (Fungi imperfecti) lediglich eine ungeschlechtliche Fortpflanzung beobachtet werden kann. Sporen stellen bei Hefen allerdings nicht wie bei Bakterien Dauerformen dar, sondern dienen der Verbreitung. Anhand der Art der Teilung und der Bildung von unterschiedlichen Sporenformen kann eine Hefe beschrieben und kategorisiert werden (Barnett et al., 2000; Moore, 1998; Müller, 1961; Phaff et al., 1966).

Der a_w -Wert hat einen großen Einfluss auf das Vorkommen und Überleben von psychrotoleranten Hefen. Der optimale Wert für das Wachstum von Hefen liegt zwischen 0,98 und 0,95. Unterhalb von 0,8 können nur noch wenige Hefen wachsen (Deák, 2008). Bezüglich des pH-Werts bevorzugt ein Großteil der Hefen einen leicht sauren Bereich zwischen pH 4,5 und 5,5. Über diesen optimalen pH-Wert-Bereich hinaus ist das Wachstum auch bei pH 3 bis 8 zwar möglich, aber reduziert (Deák, 2008). Pitt (1974) beschrieb, dass einige Arten wie beispielsweise *Pichia membranifaciens* und *Kazachstania exiguus* sogar in der Lage sind bei pH 1,3 - 1,7 zu wachsen. Nach Aono (1990) sind *Rhodotorula glutinis* und *mucilaginososa* sowie *Cryptococcus laurentii* äußerst tolerant gegenüber basischen pH-Werten bis zu 10.

Hefen können sich sowohl unter aeroben, als auch anaeroben Bedingungen entwickeln. Die wichtigsten Substrate zur Energiegewinnung bei Hefen sind Kohlenhydrate. Dabei können diese bei Anwesenheit von Sauerstoff zu CO_2 und Wasser ver-

stoffwechselt werden. Diese Assimilation kann von jedem einzelnen Hefestamm für ein bestimmtes Spektrum an Kohlenstoffquellen stattfinden. Unter anaeroben Verhältnissen kann eine Fermentation (Gärung) von Kohlenhydraten unter Entstehung von Alkohol und CO₂ erfolgen (Müller, 1961; Phaff et al., 1966).

Die meisten Hefen wachsen bei mittleren Temperaturen von + 24 °C bis + 48 °C, wobei es sich meist um mesophile, teils um psychrotolerante Spezies handelt. Thermotolerante und thermophile Hefen können bei höheren Temperaturen wachsen. Ebenso finden sich psychrophile Hefen, welche auch bei sehr niedrigen Temperaturen eine Vermehrung zeigen (Deák, 2008). Sowohl die psychrophilen als auch die psychrotoleranten Mikroorganismen besitzen eine Toleranz gegenüber Kälte und bleiben somit auch bei Kühl- oder Gefriertemperaturen lebensfähig und können sich sogar vermehren. Auf höhere Temperaturen reagieren sie empfindlich. In Folge dessen sinkt die Vermehrungsrate oder die Organismen sterben ab. In der Umwelt sind solche Hefen daher bevorzugt in kalten Habitaten zu finden (Deák, 2008; Phaff et al., 1966). Viele Hefegattungen haben Vertreter mit psychrotoleranten Eigenschaften:

- *Bullera*
- *Candida*
- *Cryptococcus*
- *Cystofilobasidium*
(auch: *Rhodospiridium*)
- *Debaryomyces*
- *Geotrichum*
- *Kluyveromyces*
(heute: *Kazachstania*)
- *Mrakia*
- *Metschnikowa*
- *Pichia*
- *Saccharomyces*
- *Sporidiobolus*
- *Sterigmatomyces*
- *Torulopsis*
- *Trichosporon*
- *Yarrowia*
- *Zygosaccharomyces*

In diesen Gattungen existieren auch einzelne psychrophile Vertreter wie beispielsweise *Candida austromarina* oder *Cystofilobasidium capitatum*. Die Arten der Gattung *Mrakia* zeichnen sich alle durch ihr psychrophiles Wachstum aus (Barnett et al., 2000; Deák, 2008;).

2.3.2.1 Psychrotolerante Hefen in der Umwelt

Psychrotolerante Hefen werden häufig in der Umwelt gefunden, da die in Kapitel 2.3.2 erwähnten Gattungen unterschiedlichste Habitate besiedeln. Sie bevorzugen kühlere Lebensräume und werden daher im Erdboden, im Wasser und auf Pflanzen nachgewiesen.

So wurden unter anderem psychrotolerante und psychrophile Hefen der Gattung *Cryptococcus*, *Mrakia* und *Rhodotorula* in Gletschereis der italienischen Alpen (Turchetti et al., 2008) und in Gletscherschmelzwasser in Argentinien (De Garcia et al., 2007) gefunden.

2.3.2.2 Psychrotolerante Hefen in Lebensmitteln

Psychrotolerante Hefen finden sich aufgrund der vorherrschenden, optimalen Nährstoffzusammensetzung und der lagerungsbedingten Umgebungskontamination eigentlich bei frischen Früchten und Gemüse. Dabei finden sich vor allem Hefen der Gattungen *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* (Deák, 2008). In einer Untersuchung von Combina et al. (2008) wurde in Traubensaftkonzentrat ein Zusammenhang mit Verderbsprozessen durch Hefen der Gattung *Zygosaccharomyces* festgestellt.

Ebenso bieten Lebensmittel tierischen Ursprungs psychrotoleranten Hefen eine gute Lebensgrundlage und lassen sich dort zahlreich nachweisen (Tabelle 2).

In Rohmilch sind Hefen als unerwünschte Kontaminanten zu betrachten. Von Engel (1986a) wurde hier *Cryptococcus curvatus* gefunden. Fleet und Mian (1987) wiesen *Candida* spp., *Kluyveromyces* spp. (heute: *Kazachstania*) und *Rhodotorula* spp. in pasteurisierter Milch nach.

In Joghurt tauchen Hefen vorrangig als Verderbserreger auf, wobei Verderbsanzeichen ab einer Keimzahl von 10^5 bis 10^6 KbE/g auftreten und sich vor allem in Gasbildung äußern (Fleet, 1990). In Untersuchungen von Fleet und Mian (1987) wurden bis zu 10^7 KbE/g Hefen gefunden. Dominierend waren auch hier ähnlich wie in Milch *Candida* spp. und *Kluyveromyces* spp. (heute: *Kazachstania*). In fermentierten

Milchprodukten aus China wurden von Bai et al. (2010) häufig Hefen der Gattungen *Kluyveromyces* (heute: *Kazachstania*) nachgewiesen. Weiterhin wurden Hefen der Gattungen *Rhodotorula*, *Candida*, *Geotrichum*, *Debaryomyces*, *Yarrowia* und *Pichia* gefunden. Auch wurde in Joghurt von Moreira et al. (2001) psychrophile Hefen der Gattung *Mrakia* nachgewiesen.

Neben Milch und Joghurt sind Hefen häufig in Käse nachweisbar (Tabelle 2). Jedoch spielen Hefen in verschiedenen Käsesorten eine Rolle bei der Reifung und Aromabildung, können jedoch auch zu Verderbserscheinungen führen, welche meist mit Geruchs- und Geschmacksabweichungen, Veränderungen in der Konsistenz oder mit Gasbildung einhergehen (Fleet, 1990). In einer umfassenden Studie von Prillinger et al. (1999) wurden *Debaryomyces hansenii* sowie *Yarrowia lipolytica* isoliert. Verderb durch Hefen wurde bei Frischkäse beschrieben. In diesem Zusammenhang nachgewiesene Hefen stammten aus der Gattung *Candida*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Debaryomyces*, *Cryptococcus* und *Rhodotorula* (Engel, 1986b; Westall und Filtenborg, 1998).

Ebenso wie in Milchprodukten finden Hefen in Fisch und Meeresfrüchten ein ideales Substrat, weshalb sie regelmäßig auf diesen Produkten nachgewiesen werden können. Es kommen Hefen der Gattungen *Debaryomyces*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Pichia* und *Cryptococcus* vor (Diriye et al., 1993; Ross und Morris, 1965). Kobatake et al. (1992) wies bei gekühlten Meeresfrüchten psychrophile Hefen der Gattung *Yarrowia*, *Debaryomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sterigmatomyces* und *Trichosporon* nach. Hier sind Hefen als Kontaminanten anzusehen, wobei besonders bei *Yarrowia lipolytica* ein Verderbspotential durch Proteolyse erwartet werden kann. Die psychrophile Hefe *Candida curiosa* (heute: *Mrakia frigida*) wurde von Komagata und Nakase, (1965) erstmals auf Fisch beschrieben (Tabelle 2).

Bei Fleischerzeugnissen werden häufig Hefen nachgewiesen (Tabelle 2). Auch in Produkten mit hohem Salzgehalt, wie Schinken oder Speck, können sich Hefen teils gut vermehren (Phaff et al., 1966). Die Gattungen *Debaryomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* (auch: *Cystofilobasidium*) und *Sporidiobolus* konnten im Rahmen einer Studie über trocken gesalzene Fleischerzeugnisse aus

Norwegen nachgewiesen werden, wobei *Debaryomyces hansenii* und *Candida zeylanoides* die dominierenden Spezies darstellten (Asefa et al., 2009). In einer Untersuchung von Nielsen et al. (2008) wurden verschiedene Fleischprodukte auf das Vorkommen von Hefen untersucht. Es zeigte sich auch hier, dass Hefen trotz hoher Salzkonzentrationen in den Produkten regelmäßig nachgewiesen wurden. In diesen Erzeugnissen, welche unter modifizierter Atmosphäre (0,5 % O₂, 20 % CO₂ und 79,5 % N₂) verpackt wurden, konnte die Hefenzahl auf bis zu 10⁶ KBE/g ansteigen. Von Dalton et al. (1984) wurden als dominierende Spezies in Würstchen und Hackfleisch *Debaryomyces hansenii*, *Candida zeylanoides* und *Pichia membranifaciens* nachgewiesen.

In Fleischprodukten treten Hefen überwiegend unerwünscht und als Verderbserreger auf. Sie verursachen hier meist Oberflächenauflagerungen, Verfärbungen, Geschmacksabweichungen und eine Gasbildung (Loureiro und Querol, 1999). Teils tragen Hefen jedoch auch zur Reifung und Geschmacksentwicklung von Fleischerzeugnissen bei. Simoncini et al. (2007) erwähnt eine Ausbildung des typischen Aromas von trocken gesalzenem italienischem Schinken unter anderem v. a. durch *Debaryomyces* spp.

Auch auf Fleisch werden psychrotolerante Hefen verschiedener Gattungen nachgewiesen (Tabelle 2). In den oben erwähnten Untersuchungen von Fleischerzeugnissen von Nielsen et al. (2008) und Asefa et al. (2009) konnten im Ausgangsmaterial (verschiedene Teilstücke von Lamm-, Rind- und Schweinefleisch) dieselben Hefespezies wie in den hergestellten Fleischprodukten nachgewiesen werden. Es fanden sich vor allem *Candida zeylanoides*, *Candida alimentaria*, *Debaryomyces hansenii* und *Trichosporon lignicola* im Rohmaterial. Vereinzelt wurden *Candida galli*, *Rhodotorula creatinivora* und *Yarrowia lipolytica* isoliert. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die nachgewiesenen Hefen keine Kontamination der Endprodukte darstellen, sondern bereits mit dem Rohmaterial aus dem Schlachthof eingetragen werden. Untersuchungen von Baxter und Illston (1976 und 1977) zeigen, dass die Hefenpopulation von Fleisch stark der Population in der Umgebung und auf den Schlachttieren ähnelt. Die Eintragung scheint somit vorwiegend über die Umwelt und die Felle oder Häute der Schlachttiere zu geschehen (Dillon und Board, 1991). Auf den Schlachttierkörpern wurden hier überwiegend Hefen der Gattung *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Candida* und *Cryptococcus* nachgewiesen.

Bei Lammfleisch wurde durch Dillon et al. (1991) ein ähnlicher Eintragsweg vermutet. Hier wurden auf den Viehweiden, dem Fell, den Schlachttierkörpern und weiterverarbeitetem Lammfleisch *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. und *Rhodotorula* spp. gefunden. Auf Lammfleisch, welches bei - 5 °C gelagert wurde, konnten *Cryptococcus laurentii* und *infirmominimatus* sowie *Trichosporon pullulans* und *Candida zeylanoides* gefunden werden (Lowry und Gill, 1984).

Auf Geflügelfleisch und Geflügelfleischerzeugnissen finden sich Hefen der Gattungen *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* und *Yarrowia* (Diriye et al., 1993). Untersuchungen von Viljoen et al. (1998) während und nach der Schlachtung von Geflügel zeigen eine ähnliche Population. Von Ismail et al. (2000 und 2006) wurde *Candida*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* und *Yarrowia* spp. auf Geflügelfleisch und Geflügelfleischprodukten nachgewiesen. Dabei zeigte *Yarrowia lipolytica* proteo- und lipolytische Verderbseigenschaften. *Candida zeylanoides* zeigte nur eine leichte lipolytische Aktivität.

Über die Populationszusammensetzung von Hefen auf Wildfleisch finden sich keine Studien.

Tabelle 2: Übersicht über das Vorkommen von psychrotoleranten Hefegattungen auf verschiedenen tierischen Lebensmitteln (nach Asefa et al., 2009; Bai et al., 2010; Baxter und Illston, 1976 und 1977; Dalton et al., 1984; Deák, 2008; Dillon et al., 1991; Dillon und Board, 1991; Diriye et al., 1993; Engel, 1986a; Engel, 1986b; Fleet, 1990; Fleet und Mian, 1987; Ismail et al., 2000 und 2006; Kobatake et al., 1992; Komagata und Nakase, 1965; Lowry und Gill, 1984; Moreira et al., 2001; Nielsen et al., 2008; Phaff et al., 1966; Prillinger et al., 1999; Ross und Morris, 1965; Simoncini et al., 2007; Viljoen et al., 1998; Westall und Filtenborg, 1998)

Gattung	Milchprodukte	Fisch, Meeresfrüchte	Fleisch, Fleisch-erzeugnisse
<i>Candida</i>	X	X	X
<i>Cryptococcus</i>	X	X	X
<i>Cystofilobasidium</i> (auch: <i>Rhodospordium</i>)			X
<i>Debaryomyces</i>	X	X	X
<i>Geotrichum</i>	X		
<i>Kluyveromyces</i>	X		
<i>Mrakia</i>		X	
<i>Pichia</i>		X	X
<i>Rhodotorula</i>	X	X	X
<i>Sporidiobolus</i>			X
<i>Sterigmatomyces</i>		X	
<i>Torulopsis</i>			X
<i>Trichosporon</i>		X	X
<i>Yarrowia</i>	X		X

X = Vorkommen von Hefen

2.3.2.3 Psychrotolerante Hefen in vakuumverpacktem Fleisch

Über das Vorkommen von psychrotoleranten Hefen in vakuumverpacktem Fleisch existieren wenige Untersuchungen.

Kröckel (2012) weist in einer Studie nach, dass Hefen auf vakuumverpacktem Rindfleisch über die gesamte Lagerzeit von 42 Tagen auch bei Beimpfung mit Schutzkulturen aus Milchsäurebakterien eine kontinuierliche Vermehrung zeigen.

In einer Untersuchung von Kabisch et al. (2010) wurden die Hefen *Candida sake*, *Candida zeylanoides*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus laurentii* und *Debaryomyces hansenii* auf vakuumverpacktem Rindfleisch nachgewiesen. Hierbei wurden erstmals auch psychrophile Hefen der Gattung *Mrakia* auf Fleisch detektiert.

Auf vakuumverpackten Straußenfleischsteaks lassen sich bis zu 10^4 KbE/g Hefen und Schimmelpilze nachweisen (Alonso-Calleja et al., 2004). Es fanden jedoch hier keine weiteren Speziesdifferenzierungen der nachgewiesenen Hefen statt.

Bei vakuumverpacktem Lammfleisch (Patterson und Gibbs, 1978) wurden bislang nur vereinzelt Hefen gefunden, während sich über das Vorkommen von Hefen in vakuumverpacktem Wildfleisch keine Daten finden.

Es liegen jedoch keine Untersuchungen über einen Fall von Verderb durch psychrotolerante oder psychrophile Hefen bei vakuumverpacktem Rind-, Wild-, Lamm- oder Straußenfleisch vor.

2.3.3 Nachweis und Identifizierung psychrotoleranter Hefen

2.3.3.1 Kolonie- und Zellmorphologie

Zur Anzucht und Differenzierung von Hefen gibt es eine Reihe an Selektivnährböden. Diese fördern das Wachstum von Hefen und unterdrücken außerdem die Vermehrung von Bakterien und Schimmelpilzen. Als Grundmedium für die Anzucht von Hefen stehen Malzextrakt-Agar (MEA), Hefeextrakt-Glucose-Agar, Sabouraud-Glucose-Agar und Medien, welche pflanzliche Stärke (z.B. aus Kartoffel oder Mais) und eine Kohlenstoffquelle enthalten, zur Verfügung (Anonymus, 2012a; Deák, 2008; Phaff et al., 1966; van der Walt, 1970; Yarrow, 1998). Um das Wachstum der meisten Bakterien zu verhindern, kann zum einen eine Ansäuerung der Nährmedien, zum anderen der Zusatz eines Antibiotikums (z.B. Chloramphenicol, Novobiocin oder Oxytetracyclin) erfolgen (Boekhout et al., 1994; Deák, 2008; Yarrow, 1998). Durch die Beimischung eines Farbstoffs kann eine Differenzierung der Hefen durch die unterschiedliche Aufnahme der Farbpigmente in die Hefekolonien erfolgen (Boekhout et al., 1994). Die Hefen zeigen je nach Art des Nährbodens eine unterschiedliche Koloniemorphologie. Sowohl die Koloniegroße als auch die Form, Farbe und Konsistenz der Kolonien unterscheiden sich und sind charakteristisch für die jeweilige Spezies auf den einzelnen Nährböden (Barnett et al., 2000; Yarrow, 1998).

Durch die Untersuchung der Hefezellen mittels Licht- oder Elektronenmikroskop können für die einzelnen Arten die Zellgröße und -form angegeben werden. Es lassen sich auch verschiedene Formen der Zellteilung und Sporenbildung nachweisen, durch welche eine Spezies charakterisiert werden kann (Anonymus, 2012a; Barnett et al., 2000; Lodder, 1970; Phaff et al., 1966; Yarrow, 1998).

2.3.3.2 Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie

Bei der Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR) handelt es sich um eine spezielle Form der Interferenzspektroskopie. Hierbei wird von der zu untersuchenden Hefe eine Zellsuspension hergestellt, von der ein Tropfen auf eine spezielle Zink-Selenit-Platte aufgetragen und getrocknet wird. Diese Probe wird dann in den Infrarotstrahlengang eingebracht. Aus dem so erhaltenen Interferogramm wird mittels sogenannter Fourier-Transformation ein Spektrum generiert, welches mit einer Datenbank abgeglichen werden kann. Aus dieser Clusteranalyse wird die spektrale Dis-

tanz zwischen unterschiedlichen Referenzen ermittelt, wodurch eine Einordnung und Identifizierung möglich ist. Die Identifizierung mittels FTIR ist eine schnelle und kostengünstige Möglichkeit, eine große Isolatanzahl zu identifizieren. Grundlage hierfür ist eine umfassende Datenbank von Referenzspezies. Bei nicht eindeutiger Spezieszuordnung können auf Grund der spektralen Distanz dennoch Aussagen über Verwandtschaftsverhältnisse und Gattungszugehörigkeiten getroffen werden (Kümmerle et al., 1998; Wenning et al., 2002).

2.3.3.3 Molekularbiologische Untersuchung

Die molekularbiologische Untersuchung von Hefen lässt eine schnelle und zuverlässige Identifizierung zu. Bei Hefen werden vor allem zwei DNA-Regionen hierfür herangezogen. Die D1/D2-Domäne am 5'-Ende der großen Untereinheit (26S) besitzt viele Substituenten, wodurch eine Unterscheidung verschiedener Spezies möglich ist (Fell et al., 2000; Kurtzmann, 1998; Kurtzmann und Blanz, 1998; Kurtzmann und Robnett, 1998). Des Weiteren wird die ITS-Domäne zur molekularbiologischen Identifizierung verwendet (Diaz und Fell, 2000; White et al., 1990). Ein Abgleich der DNA-Sequenzen mit entsprechenden Datenbanken (z.B. NCBI und CBS) bringt eine eindeutige Zuordnung. Ist die DNA-Sequenz der untersuchten Hefe nicht in der Datenbank vorhanden, lässt sich gegebenenfalls anhand des Übereinstimmungsgrades mit verwandten Spezies eine Einordnung der Gattung vornehmen. Für einige humanpathogene *Candida* spp. existieren speziesspezifische Sonden, durch die eine schnelle Detektion möglich ist (Fell, 1993; Mannarelli und Kurtzmann, 1998).

2.3.3.4 Physiologische Charakterisierung

Bei der Identifizierung von Hefen mittels biochemischer Verfahren wird die Verwertung verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffquellen überprüft und mit Referenzstämmen verglichen. Auch die Fähigkeit der Hefen bei unterschiedlichen NaCl-, Glucose-, Chlorheximid- und Säurekonzentrationen sowie in vitaminfreiem Medium zu wachsen wird getestet. Als Charakteristikum wird auch eine Umsetzung von Harnstoff mittels Ureasetest herangezogen (Barnett et al., 2000; Boekhout et al., 1994; Yarrow, 1998).

Die Assimilationstests mit verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen können sowohl mittels flüssiger oder fester Medien durchgeführt werden. Auf festen Medien

kommt eine auxanographische Methode zum Einsatz, wobei die Hefezellen in einen Grundagar (entweder Stickstoff- oder Kohlenstoffgrundagar) suspendiert und gegossen werden. Auf diesen Agar werden die einzelnen Testsubstanzen in kristalliner Form aufgebracht. Ein Wachstum der Hefen im Bereich der einzelnen Quellen nach entsprechender Inkubation zeigt die Fähigkeit der Verstoffwechslung an (Barnett et al., 2000; Beijerinck, 1889; Yarrow, 1998). Ursprünglich wurden die Assimilationstests in flüssigen Medien in Durham-Röhrchen durchgeführt. Dabei wird eine Grundlösung (entweder Stickstoff- oder Kohlenstoffgrundlösung) mit einer definierten Menge einer Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle versetzt und eine Suspension der zu testenden Hefe zugesetzt. Nach der Inkubation von etwa zwei bis vier Wochen erfolgt in definierten Abständen eine Beurteilung der Vermehrungsfähigkeit der Hefespezies anhand der Trübung der Lösung. Diese beiden Techniken der Assimilationstests sind sehr zeit- und materialaufwändig (Barnett et al., 2000; Barnett und Ingram, 1955; Beijerinck, 1889; Wickerham und Burton, 1948; Yarrow, 1998).

Als vereinfachte Systeme sind API-Teststreifen erhältlich. Diese sind jedoch nicht primär für lebensmittelrelevante Hefen, sondern viel mehr auf humanpathogene Hefen ausgelegt. Somit ist keine zuverlässige Identifizierung der Hefen aus Lebensmitteln garantiert (Török und King, 1991).

Alternativ können für die Untersuchungen zur Verstoffwechslung verschiedener Substanzen Mikrotiterplatten verwendet werden. Der Versuchablauf ist ähnlich der Durchführung in Durham-Röhrchen, jedoch wird für die Befüllung der Wells der Mikrotiterplatten ein geringeres Volumen verwendet. Dies reduziert den Arbeitsaufwand und erleichtert die Ablesung (Seiler und Busse, 1988).

2.4 Reinigung und Desinfektion zur Inaktivierung von Hefen

2.4.1 Gesetzliche Vorgaben und Begriffsbestimmung

Im EU-Hygienepaket werden durch die Verordnung (EG) Nr. 178/2002 allgemeine Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts vorgegeben. Dabei regelt Verordnung (EG) Nr. 852/2004 die allgemeine Hygiene in Lebensmittelbe- und verarbeitenden Betrieben, wohingegen Verordnung (EG) Nr. 853/2004 sich auf die spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs bezieht. Mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel finden sich in der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005. Im Rahmen dieser gesetzlichen Grundlagen wird gefordert, dass Lebensmittelunternehmer Anlagen und Ausrüstungen in angemessener Weise reinigen und desinfizieren und die Lebensmittel unter angemessenen Hygienebedingungen hergestellt werden müssen.

Der Begriff der Reinigung stellt die Entfernung unerwünschter Substanzen von Oberflächen, Räumen, Vorrichtungen und Geräten dar. Als ein „Verfahren zur Abtötung von Mikroorganismen auf ein Niveau, das weder gesundheitsschädlich ist, noch die Qualität der Lebensmittel beeinträchtigt“ wird der Begriff der Desinfektion nach DIN 10516 (2009) definiert. Bezogen auf die Keimzahl wird bei Desinfektion eine Reduktion um mehrere log-Stufen angesehen (Anonymus, 2006a).

Bei sämtlichen Hygienekonzepten geht allen Desinfektionsmaßnahmen eine gründliche Reinigung voran. Dies ist besonders in Schlacht- und Zerlegebetrieben notwendig, da sich durch die tierischen Eiweiße Biofilme auf den Oberflächen von Wänden, Arbeitsgeräten und -flächen bilden. Dadurch sind Mikroorganismen gegenüber Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen weniger leicht angreifbar (Schliesser, 1981).

2.4.2 Reinigungs- und Desinfektionstechniken

Um Hefen mittels Hitze einwirkung zu inaktivieren, bedarf es einer Temperatur zwischen + 55 °C und + 65 °C. Die Dauer der notwendigen Einwirkzeit ist abhängig von der Temperatur und liegt bei + 55 °C bei 5 bis 10 Minuten sowie bei + 65 °C unter einer Minute. Die Werte variieren je nach Spezies und Stamm der entsprechenden Hefe (Deák, 2008).

Im Gegensatz zur Hitze einwirkung kommt es bei der Kälteeinwirkung der Hefezellen nicht so rasch zu einem Absterben der Zellen. Die Zahl der vitalen Zellen nimmt zwar

im Laufe des Gefrierprozesses deutlich ab, jedoch tolerieren psychrophile Spezies auch sehr niedrige Temperaturen bis zu -5 °C . Allerdings führen gerade bei meso- und thermophilen Hefen Kühl- und Gefriertemperaturen zu einem zunehmend verlangsamten Wachstum. Eine Abtötung durch eine entsprechende Kühlung oder durch Tiefgefrieren ist besonders bei psychrotoleranten und psychrophilen Organismen nicht sichergestellt (Deàk, 2008).

Neben der Hitzeeinwirkung und der Kälteexposition stehen zahlreiche, chemische Mittel für die Inaktivierung von Hefen zur Verfügung. Grundlegend für eine zufriedenstellende Reinigung und Desinfektion unter Verwendung von chemischen Methoden ist die Beachtung der für das jeweilige Produkt vorgeschriebenen Konzentration, dessen Einwirkzeit und ein ausreichendes Nachspülen mit Trinkwasser zur Vermeidung von Rückständen. Die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln kann durch verschiedene Faktoren beeinträchtigt bzw. beeinflusst werden. Der Eiweißfehler mindert vor allem bei chlor- und bromabspaltenden Verbindungen, Iodophoren und Peroxidverbindungen die Wirkung. Auch die Wasserhärte, die Temperatur (Kältefehler), der pH-Wert und das Maß an Verschmutzung beeinträchtigt die desinfizierende Wirkung verschiedener Präparate. Die Einwirkzeit hat ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit. Mit steigender Konzentration der Produkte nimmt zudem die Abtötungsrate von Mikroorganismen zu. Je nach Art der vorhandenen Mikroorganismen haben die oben genannten Faktoren unterschiedlich starke Auswirkungen auf die Wirksamkeit des Desinfektionsmittels (Anonymus, 2012b; Deàk, 2008; Schliesser, 1981).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Hefestämme

Es wurden mehrere Stämme aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (DSMZ) und dem Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht (CBS) bezogen. Diese wurden aufgrund ihrer Verwandtschaft zu den nicht eindeutig identifizierbaren Isolaten gewählt und dienten als Referenzstämme für die Sequenzierung und die biochemischen Tests. Für die Challenge- und Desinfektionsmittelversuche wurden Isolate aus der Stammsammlung des Max Rubner-Instituts, Kulmbach (MRI) verwendet, welche ebenfalls von vakuumverpacktem Fleisch isoliert wurden. Die Hefen wurden mittels FTIR untersucht und als Referenzstämme in die Datenbank aufgenommen. Alle Stämme sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Hefereferenzstämme

Spezies	Bezeichnung	Stammnummer MRI
<i>Candida sake</i>	Isolat MRI	H 399
<i>Candida zeylanoides</i>	Isolat MRI	H 384
<i>Candida zeylanoides</i>	Isolat MRI	H 385
<i>Kazachstania lodderae</i>	CBS 2757	H 405
<i>Kazachstania servazii</i>	CBS 4311	H 406
<i>Kazachstania unispora</i>	CBS 398	H 439
<i>Mrakia frigida</i>	DSMZ 4634	H 397
<i>Mrakia frigida gelida</i>	DSMZ 70882	H 398
<i>Mrakia gelida</i>	Isolat MRI	H 378
<i>Mrakia gelida</i>	Isolat MRI	H 379
<i>Mrakia</i> spp.	Isolat MRI	H 380
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Isolat MRI	H 392

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

MRI: Max Rubner-Institut, Kulmbach

3.1.2 Probenmaterial

Das vakuumverpackte Fleisch wurde aus regionalen Metzgereien, Supermärkten, dem Großhandel und Schlachthöfen erworben und anschließend zur Untersuchung ohne Unterbrechung der Kühlkette ins Labor transportiert. Die Herkunft der Proben war überwiegend aus Deutschland, jedoch stammten einzelne Proben auch aus Argentinien, Südafrika, Schweiz, USA, Irland, Neuseeland und Frankreich. Bei dem beprobten Fleisch handelte es sich größtenteils um Rindfleisch, jedoch wurde auch Wild-, Lamm- und Straußenfleisch untersucht (Tabelle 4). Jede Fleischprobe erhielt eine eindeutige Codierung.

Tabelle 4: Übersicht über Fleischart und Anzahl der Proben der Marktstudie

Fleischart	Anzahl Proben	Herkunft (Anzahl Proben)
Rind	25	Argentinien (5) Deutschland (14) Irland (1) Schweiz (3) USA (2)
Wild	9	Deutschland (8) Südafrika (1)
Lamm	3	Deutschland (1) Irland (1) Neuseeland (1)
Strauß	2	Südafrika (2)
Gesamtanzahl	39	

3.2 Methoden

3.2.1 Marktstudie über vakuumverpacktes Fleisch

Das handelsübliche, vakuumverpackte Fleisch wurde einer visuellen und sensorischen Prüfung unterzogen. Weiterhin wurden die Proben auf ihre allgemeine mikrobiologische Beschaffenheit anhand der Bestimmung der aeroben, mesophilen Keimzahl, der Milchsäurebakterien, der Enterobacteriaceen und der Pseudomonaden sowie auf das Wachstum von Hefen und Schimmelpilzen bei unterschiedlichen Temperaturen (+ 4 °C und + 25 °C) untersucht. Zudem wurde der Fleischtropfsaft bakteriologisch beurteilt und physikalische Parameter, wie der pH-Wert und der a_w -Wert, bestimmt (Abbildung 4).

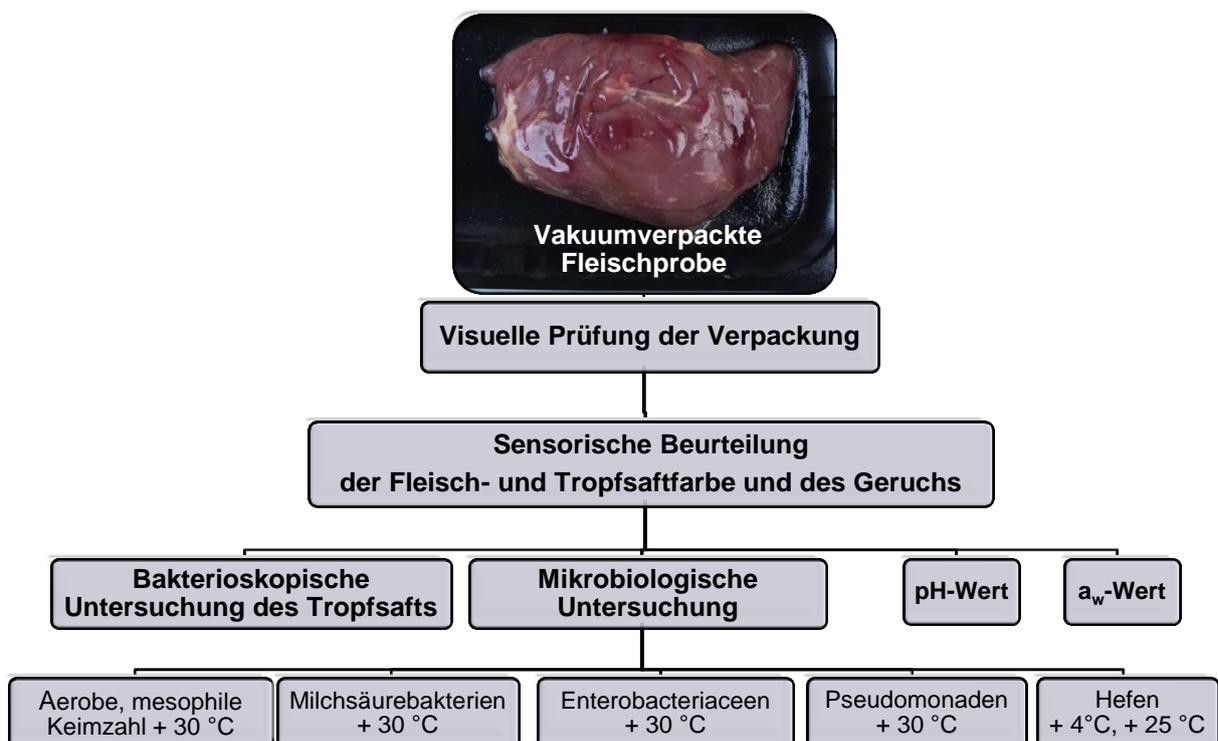


Abbildung 4: Übersichtsschema über die Vorgehensweise bei der Untersuchung der vakuumverpackten Fleischproben der Marktstudie

3.2.1.1 Sensorische Prüfung

Die verpackten Proben wurden zunächst visuell überprüft und eine eventuelle Gasbildung in der Packung dokumentiert (Abbildung 4). Nach Öffnung der Umhüllung

wurde im Rahmen einer einfach beschreibenden, sensorischen Prüfung sowohl Farbe, Geruch und Konsistenz des Fleisches als auch Farbe und Geruch des Tropfsaftes beurteilt (ASU L 00.90-6, 1997).

3.2.1.2 Bakterioskopische Untersuchung

Mittels einer sterilen Impföse wurde ein Tropfen des Fleischsaftes auf einen Objektträger aufgetragen, ein Deckglas aufgelegt und als Nativpräparat im Lichtmikroskop betrachtet. Die Zusammensetzung der mikrobiologischen Population (Hefen, Kokken, Stäbchen) wurde protokolliert.

3.2.1.3 Bestimmung des pH- und a_w -Werts

Zur pH-Wert-Messung wurde die Einstab-Glaselektrode des pH-Meters (pH 526, WTW) in die Fleischprobe eingestochen und der Wert nach 30 Sekunden abgelesen. Je Probe wurde an zwei unterschiedlichen Stellen gemessen und das arithmetische Mittel gebildet. Das Messgerät wurde arbeitstäglich mit Referenzlösungen (pH 4,00 und 7,00) bei Raumtemperatur kalibriert.

Unter Vermeidung von Lufteinschlüssen wurde die mit einer Moulinette fein zerkleinerte Fleischprobe in das dafür vorgesehene Messgefäß gefüllt. Das Gefäß wurde in ein a_w -Kryometer (AWK-20, NAGY) eingebracht und der Messwert dokumentiert. Je Fleischprobe wurden zwei Messungen durchgeführt und das arithmetische Mittel bestimmt (Rödel et al., 1989).

3.2.1.4 Mikrobiologische Untersuchung

Zunächst wurde die Vakuumverpackung mittels einer sterilen Schere geöffnet und die Fleischoberfläche für die Probenahme zugänglich gemacht. Anschließend erfolgte auf einer Fläche von 20 cm² das Abtragen der oberflächlichen Schicht des Fleisches (2 mm) mit einem sterilem Skalpell und einer sterilen Pinzette. Diese abgetragene Schicht wurde mit 20 ml 0,85 %iger NaCl-Lösung im Stomacher homogenisiert. Im Anschluss wurde eine dezimale Verdünnungsreihe dieser Lösung hergestellt. Aus den jeweiligen Verdünnungsstufen wurden je 0,1 ml der Lösung auf verschiedene Nährböden aufgebracht und ausplattiert. Je Fleischprobe wurden zwei Untersuchungsansätze durchgeführt. Jeder Nährboden wurde anschließend entsprechend inkubiert (Tabelle 5).

Tabelle 5: Nährmedien und deren Inkubationsbedingungen für die mikrobiologische Untersuchung

Keimspektrum	Nährboden	Temperatur	Zeit
Aerobe, mesophile Keimzahl	STD I-Agar	+ 30 °C	48 Stunden
Milchsäurebakterien	MRS-Agar	+ 30 °C	48 Stunden
Enterobacteriaceen	DHL-Agar	+ 30 °C	24 Stunden
Hefen und Schimmelpilze	MEA ⁺ -Agar	+ 25 °C	48 Stunden
		+ 4 °C	7 Tage

DHL-Agar: Desoxycholate-Hydrogen-Sulfide-Lactose-Agar
 MEA⁺-Agar: Malzextrakt-Agar + Novobiocin
 MRS-Agar: Lactobacillus-Agar nach de Man, Regosa und Sharpe
 STD I-Agar: Standard I-Agar

Zur Ermittlung der Pseudomonadenkeimzahl wurden alle auf dem DHL-Agar gewachsenen Kolonien mit CO-Reagenz nach Gaby und Hadley (1957) überschichtet. Die Kolonien wurden als Oxidase-positiv beurteilt, wenn sie sich innerhalb einer Minute blau verfärbten und somit als Pseudomonaden erfasst.

Die Bebrütung der MEA⁺-Platten bei + 25 °C und + 4 °C wurde zur Selektion von mesophilen und psychrotoleranten Hefen aus den Proben gewählt.

Die Keimzahl der jeweiligen Agarplatten wurde dabei mit Hilfe nachfolgender Formel berechnet (ASU L 00.00-88, 2004).

$$C = \frac{\sum c}{n_1 \times 1 + n_2 \times 0,1} \times d$$

C	gewogenes, arithmetisches Mittel der Koloniezahlen (KbE/cm ²)
$\sum c$	Summe der Kolonien aller Platten, welche zur Berechnung herangezogen werden (niedrigste und nächsthöhere auswertbare Verdünnungsstufe)
n_1	Plattenanzahl der niedrigsten, auswertbaren Verdünnungsstufe
n_2	Plattenanzahl der nächsthöheren Verdünnungsstufe
d	Verdünnungsfaktor der niedrigsten, auswertbaren Verdünnungsstufe

3.2.2 Untersuchung isolierter Hefen

Sämtliche Hefeisolate, die nach Kultivierung bei + 4 °C gewonnen wurden, wurden entsprechend der Vorgehensweise in Abbildung 5 weiter differenziert. Dazu erfolgte eine Vereinzelnung der Isolate auf MEA⁺- (Malzextrakt), GYP- (Glucose-Yeastextract) und YCG-Agar (Yeastextract-Chloramphenicol-Glucose). Um eine Differenzierung in psychrophile und psychrotolerante Spezies vorzunehmen, wurde die Wachstumsfähigkeit bei + 4 °C und + 25 °C überprüft. Neben einer morphologischen Koloniebeschreibung auf den verschiedenen Nährböden fand auch eine lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchung der Hefezellen statt. Nach der FTIR-Untersuchung wurden die Isolate zur Bestätigung sequenziert. Konnte eine Hefe auch durch die Sequenzanalyse nicht identifiziert werden, wurden umfangreiche, biochemische Tests durchgeführt.

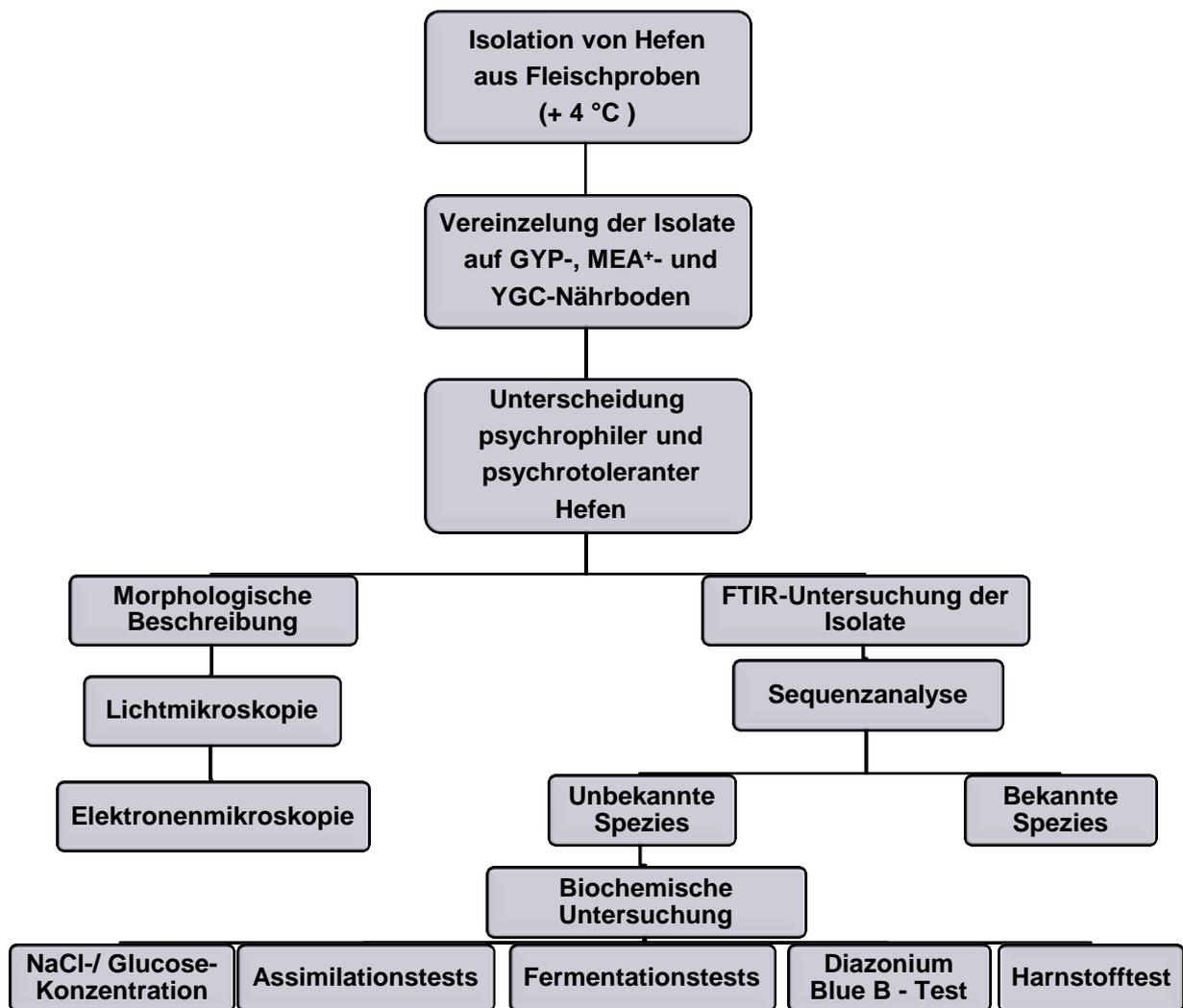


Abbildung 5: Übersicht über die Vorgehensweise bei der Untersuchungen der isolierten Hefen (GYP = Glucose-Yeastextract-Pepton-Agar; MEA⁺ = Malzextrakt-Agar + Novobiocin; YGC = Yeastextract-Glucose-Chloramphenicol-Agar + Bromphenol-blau)

3.2.2.1 Isolierung und Stammhaltung der Hefekolonien

Die isolierten, psychrotoleranten Hefen wurden bei + 4 °C über sieben Tage auf MEA⁺-Agar angezchtet und gelagert, wobei in regelmäßigen Abständen eine Überimpfung der Kulturen erfolgte, um eine Arbeit mit frischen Kulturen zu gewährleisten. Die Ausstriche wurden visuell überprüft und lichtmikroskopisch untersucht, um die Reinheit der Isolate zu gewährleisten. Außerdem wurden Gefriertrockungspräparate für eine dauerhafte Aufbewahrung in der Stammsammlung des MRI hergestellt.

3.2.2.2 Morphologie der Hefekolonien

Mittels Dreiösenaustrich wurde jedes Isolat auf einen GYP-, MEA⁺- und YGC-Nährboden subkultiviert und nach der Inkubation bei + 4 °C über 14 Tage die Morphologie der Kolonien (Farbe, Größe, Form, Rand, Profil, Oberfläche und Konsistenz) beschrieben. Die Hefen wurden anhand dieser Beschreibung in Gruppen mit gleicher morphologischer Struktur eingeteilt.

3.2.2.3 Temperaturabhängiges Wachstum

Das Wachstum der einzelnen Hefestämme wurde zudem bei + 4 °C und + 25 °C untersucht.

War nach 14 Tagen Inkubation mit den entsprechenden Temperaturen kein Bewuchs der Platten festzustellen, wurde das Ergebnis als fehlendes Wachstum gewertet. Konnte in einigen Bereichen eine Zunahme des ausgestrichenen Koloniematerials und die Entstehung kleiner Kolonien beobachtet werden, wurde es als schwaches Wachstum dokumentiert. Ein deutliches Wachstum war gegeben, wenn große, deutlich sichtbare Kolonien (> 2 mm) gefunden wurden. Bei einem Wachstum der Hefen bei + 4 °C und einem fehlenden Wachstum bei + 25 °C wurden sie als psychrophil kategorisiert. Wuchsen sie auch bei + 25 °C, zählten sie als psychrotolerant.

3.2.2.4 FTIR-Untersuchung

Als Vorbereitung für die Untersuchung mittels FTIR wurden alle Hefen auf YGC-Agar 7 Tage bei + 4 °C angezüchtet und anschließend am ZIEL (Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung, Abteilung Mikrobiologie, Weihenstephan) untersucht.

Dort wurden die Hefen für die FTIR-Untersuchung bei + 10 °C auf YGC-Agar angezüchtet. Anschließend wurde von den zu untersuchenden Hefen mit sterilem H₂O eine Zellsuspension erstellt, von der ein Tropfen auf eine Zink-Selenit-Platte aufgetragen und getrocknet wurde. Diese beschichtete Platte wurde in den Infrarotstrahlengang des Infrarotspektrometers eingebracht. Aus dem generierten Interferogramm wurde ein Spektrum erstellt, welches mit einer Datenbank abgeglichen wurde. Anhand der spektralen Distanz zwischen den Proben und unterschiedlichen Referenzstämmen und war eine Identifizierung möglich (Kapitel 2.3.3.2).

3.2.2.5 Sequenzanalyse

Für die DNA-Extraktion wurde eine Hefesuspension mit einer Konzentration von maximal $5,0 \times 10^7$ KbE/ml benötigt. Dazu wurde von einer Reinkultur eine Kolonie in Standard I-Boullion überimpft und bei + 10 °C für 72 Stunden inkubiert. Die Zellzahl des Inokulums wurde mittels Thoma-Zählkammer bestimmt und durch Verdünnung mit 0,85 %iger NaCl-Lösung eingestellt. Aus dieser Suspension wurde 1 ml entnommen und nach dem Zentrifugieren bei Raumtemperatur bei 5000 x g für 10 min der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 600 µl Sorbitolpuffer resuspendiert. Das Vorgehen entsprach dem Protokoll für die Hefenaufreinigung des DNeasy Blood and Tissue Kit® (Qiagen).

Zur Sequenzierung wurde die D1/D2-Domäne des 26S rDNA-Gens (NL 1/2-Primerpaar) und gegebenenfalls die ITS-Domäne (ITS 1/2-Primerpaar) gewählt (Diaz und Fell, 2000; Fell et al., 2000; Kutzmann und Robnett, 1998; White et al., 1990; siehe auch Kapitel 2.3.3.3).

Nach der Aufreinigung wurde das Produkt durch eine PCR vervielfältigt. Der benötigte Mastermix wurde anhand des in Tabelle 6 angegebenen Pipettierschemas hergestellt.

Tabelle 6: Mastermixherstellung für die PCR zur Sequenzierung von Hefen

Reagenz	Menge pro Ansatz (µl)	Endkonzentration
Puffer Gold	5,0	1 x
dNTP-Mix	5,0	0,2 mM
MgCl ₂	3,0	1,5 mM
Primer NL 1 oder ITS 1	1,0	0,2 mM
Primer NL 4 oder ITS 4	1,0	0,2 mM
AmpliTaq Gold	0,5	0,05 U/µl
LAL-Wasser	29,5	
Aufgereinigte DNA	5,0	

Pro Ansatz ergab sich ein Gesamtvolumen von 45 µl, zu dem jeweils 5 µl der aufgereinigten DNA zugegeben wurden.

Bei jeder PCR-Reaktion wurden eine Positivkontrolle (*Mrakia gelida*, MRI-Stamm H 378 aus der Stammsammlung des MRI) und eine Reagenzien-Negativkontrolle (LAL-Wasser) mitgeführt. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler (Tabelle 7).

Tabelle 7: Cyclerprogramm zur Vervielfältigung der Hefe-DNA zur Sequenzierung

Schritt	Zyklusanzahl	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	1 x	95 °C	10 Minuten
Denaturierung	30 x	92 °C	40 Sekunden
Annealing		55 °C	40 Sekunden
Extension		72 °C	30 Sekunden
Extension	1 x	72 °C	10 Minuten

Nach Abschluss der Polymerasekettenreaktion wurden 2,0 µl Gel-Loading-Puffer zu je 10 µl des Amplifikates in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und auf ein 2 %iges Agarose-Gel aufgetragen. In die erste und letzte Probenflasche wurden jeweils 2 µl eines DNA-Längenstandards (Ladder Quantitas 50 bp - 2 kb) eingebracht. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung bei 125 Volt über 45 min wurde das Gel in 1 %iger Ethidiumbromidlösung gefärbt und die Banden mittels UV-Transilluminator sichtbar gemacht. Durch die jeweilig ausgewählten Primer NL 1/4 und ITS 1/4 entstanden Amplifikate mit einer Größe von etwa 600 bp (Diaz und Fell, 2000; Fell et al., 2000; Kutzmann und Robnett, 1998; White et al., 1990).

Nach erfolgreicher PCR wurden die Amplifikate anhand des Protokolls des Qiaquick[®] PCR Purifikation Kits (Qiagen) aufgereinigt.

Mittels Photometer wurde die DNA-Konzentration in Eppendorfcups bestimmt und bei Bedarf auf 5 ng/µl durch Verdünnung der Amplifikatlösung eingestellt. Für die Sequenzierung wurden je 14,4 µl DNA-Lösung mit je 3,6 µl der entsprechenden Primer (NL 1/4 oder ITS 1/4) versetzt um die benötigte Primerkonzentration von 2 pmol/µl zu erhalten. Die so vorbereiteten Proben wurden an den kommerziellen Sequenzierservice Eurofins MWG Operon (Ebersberg) geschickt.

Im Anschluss wurden die erhaltenen Sequenzen mit Hilfe der NCBI Database und der CBS Database identifiziert. Die Ergebnisse beider Datenbanken wurden verglichen und zudem zur statistischen Absicherung die Amplifikation der einzelnen Isolate und deren Sequenzierung wiederholt. Um die Aufreinigung und die Sequenzierung

zu überprüfen, wurden Referenzstämme der DMSZ und des CBS (Tabelle 3) sequenziert.

3.2.2.6 Lichtmikroskopische Untersuchung der Hefezellen

Zur lichtmikroskopischen Untersuchung der Hefezellen wurden Reinkulturen der Hefen über einen Zeitraum von zwei Wochen auf einem GYP-Nährboden angezüchtet. Auf einen Objektträger wurde ein Tropfen Löfflers Methylenblau-Lösung zur Anfärbung aufgebracht und darin mittels einer sterilen Impföse eine geringe Menge an Koloniematerial verrieben. Dieser Suspensionstropfen wurde mit einem Deckglas überdeckt unter dem Lichtmikroskop betrachtet.

3.2.3 Untersuchung nicht eindeutig identifizierter Spezies

3.2.3.1 Ascosporenbildung

Zur Untersuchung der Ascosporenbildung wurden die Hefestämme 28 Tage auf 2 %igem MEA⁺-Agar bei + 10 °C angezüchtet. Die gewachsenen Kolonien wurden wie bei der morphologischen Untersuchung vorbereitet und mikroskopiert. Beim Auftreten von Ascosporen wurde die Anzahl der gebildeten Sporen pro Zelle dokumentiert (Anonymus, 2012a; Barnett et al., 2000; van der Walt, 1970; Yarrow, 1998).

3.2.3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Als Vorbereitung für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurde eine Flüssigkultur der einzelnen Isolate in STD I-Boullion (7 Tage bei + 4 °C) angelegt. Von dieser Kultur wurde 1 ml in einem sterilen Eppendorfröhrchen bei 8000 U/min für 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und in sterilem PBS (Phosphate buffered saline) durch Vortexen gewaschen. Nach dreimaliger Wiederholung wurde das abzentrifugierte Pellet in 200 µl PBS aufgenommen. Aus dieser Suspension wurde ein Tropfen auf ein Deckglas gegeben, auf das zur Fixierung Glutaraldehyd-Lösung gegeben wurde. Nach einer Fixierung über 12 Stunden wurde das Präparat gewaschen und dieser Schritt wiederholt. Anschließend erfolgte eine schrittweise Entwässerung des Präparats mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 10 min mit 30, 50, 75 und 90 %, dann je 30 min mit 96 und 100 %). Daraufhin wurden die Pro-

ben einer Kritisch-Punkt-Trocknung (CPD 030, Balzers Union) unterzogen, wobei das Wasser im Präparat gegen ein organisches Lösungsmittel ausgetauscht wird und dieses durch Erhöhung des Druckes und der Temperatur schlagartig, ohne längeren Phasenübergang, aus der flüssigen Phase in die Gasphase übergeht. Zum Schluss wurde das Präparat durch eine Goldbeschichtung für die Betrachtung im Rasterelektronenmikroskop vorbereitet.

3.2.3.3 Physiologische Charakterisierung der Hefeisolate

Die Charakterisierung erfolgte für alle Hefen, die mittels FTIR und Sequenzierung nicht eindeutig identifiziert werden konnten, anhand der Fähigkeit bestimmte Nährstoffquellen umzusetzen und unter bestimmten Bedingungen zu wachsen.

Die hierfür benötigten Lösungen YNB (Yeast Nitrogen Base), YCB (Yeast Carbon Base), vitaminfreies Medium und STD I-Nährboullion (Standard I-Nährboullion) mit unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen wurden vor Verwendung auf Sterilität überprüft. Zudem wurden bei jedem Versuchsansatz eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Positivkontrolle beinhaltete Glucose als Kohlenstoffquelle. Die Negativkontrolle enthielt keine Kohlenstoffquelle.

Die Inkubation der Versuchsansätze erfolgte jeweils bei + 10 °C (Anonymus, 2012a; Barnett et al., 2000; Barnett und Ingram, 1955; Seiler und Busse, 1988; Wickerham und Burton, 1948; Yarrow, 1998).

3.2.3.3.1 Aerobe Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen

Die Verwertbarkeit von verschiedenen Kohlenstoffquellen wurde in Minitekplatten (Orange Scientific) getestet. Die Stoffwechselleistung der Hefestämme wurde in dieser Arbeit anhand von 34 verschiedenen Kohlenstoffquellen (L-Arabinose, Cellobiose, Citrat, Ethanol, Erythriol, Galacitol, Galactose, Gluconsäure, Glucosaminhydrochlorid, D-Glucose, Glucosid, Glycerol, Hexadecan, Inulin, Lactose, Maltose, Mannitol, Melezitose, Melibiose, Methanol, Milchsäure, Myo-Inosit, Raffinose, Rhamnose, Ribitol, Ribose, Salicin, Sorbitol, Sorbose, Stärke, Succinylsäure, Sucrose, Trehalose, Xylose) überprüft.

Als Basis diente die Difco Yeast Nitrogen Base (YNB). Diese enthielt sämtliche, für das Wachstum notwendige Substanzen wie Aminosäuren, Wachstumsfaktoren, Spurenelemente, Salze und Stickstoffquellen, jedoch keinerlei Kohlenstoffquellen. Auf

100 ml der 10fach konzentrierten YNB wurde als antibiotischer Zusatz 0,1 g Chloramphenicol gegeben. Für die Untersuchung der Verwertbarkeit von Kohlenstoffquellen wurde je Kohlenstoffquelle eine 50 mM Arbeitslösung hergestellt. In einem Erlenmeyerkolben wurde die Kohlenstoffquelle in 10 ml der 10fach konzentrierten YNB teils unter leichter Erwärmung und Rühren auf einer Magnetrührheizplatte in Lösung gebracht.

Diese Lösung wurde in eine Einmalspritze gefüllt und mittels eines aufgesetzten, bakteriendichten Spritzenfilters (22 µm) in einen gereinigten und autoklavierten Erlenmeyerkolben steril filtriert. Im Anschluss daran wurden die 10 ml Lösung mit sterilem A. bidest. auf 100 ml aufgefüllt, so dass sich eine 50 mM Arbeitslösung ergab. Jede Arbeitslösung wurde auf Sterilität überprüft.

Der Ansatz dieser Testreihen erfolgte in Minitekplatten. Jede biochemische Reaktion eines Hefestammes wurde in drei unabhängigen Versuchsreihen angesetzt. Es wurde jeweils eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt.

Zunächst wurde von einem GYP-Nährboden so viel Material einer Hefekolonie mittels einer Impföse in eine physiologische Kochsalzlösung überführt, bis mit Hilfe der Thoma-Zählkammer eine Suspension von einer Konzentration von $6,0 \times 10^6$ KbE/ml ermittelt werden konnte. In den Ansätzen wurde zunächst 0,5 ml der YNB mit entsprechender Kohlenstoffquelle in die Kavitäten vorgelegt und anschließend mit 0,25 ml der Hefelösung mit einer Glaspipette aufgefüllt. In der Negativkontrolle wurde die Hefelösung nur mit YNB-Lösung gemischt. Bei der Positivkontrolle wurde als Kohlenstoffquelle Glucose verwendet.

Die Auswertung der Versuche erfolgte nach 3, 7 und 14 Tagen. Dabei wurde zunächst die Negativkontrolle dahingehend überprüft, dass keine Trübung der Lösung und somit kein Wachstum vorhanden war. Bei den Positivkontrollen musste ein Wachstum und somit eine Verwertung der Glucose sichtbar sein. Das Wachstum wurde anhand der Trübung der Ansatzlösungen in den einzelnen Kavitäten beurteilt. Eine nicht getrübbte Lösung wurde als „kein Wachstum“ erfasst (Abbildung 6 A). Schwaches Wachstum war bei einer unvollständigen Trübung der Lösung gegeben (Abbildung 6 B). Eine rasche (nach 3 oder 7 Tagen) milchige Trübung der Lösung wurde als „deutliches Wachstum“ dokumentiert (Abbildung 6 C). War eine beurteilbare Trübung erst bei der dritten Auswertung nach 14 Tagen zu sehen, wurde das Wachstum als verzögert gewertet (Anonymus, 2012a; Barnett et al., 2000; Barnett

und Ingram, 1955; Seiler und Busse, 1988; Wickerham und Burton, 1948; Yarrow, 1998).

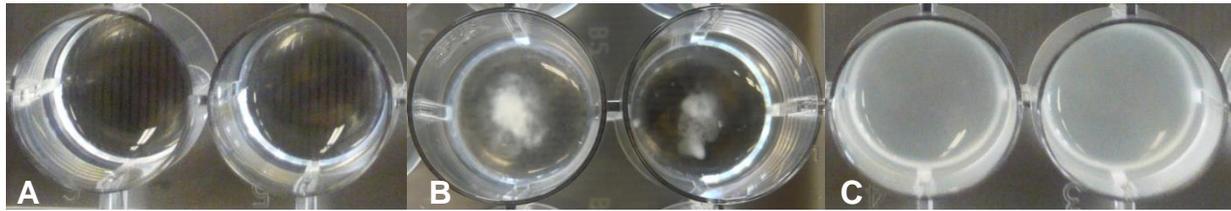


Abbildung 6: Beurteilungsschema des Hefewachstums in Minitekplatten (A = kein Wachstum; B = schwaches Wachstum; C = deutliches Wachstum; Bilder aus eigenen Untersuchungen)

3.2.3.3.2 Aerobe Verwertung verschiedener Stickstoffquellen

Analog zu den Kohlenstoffquellen wurde auch die Verwertbarkeit von Stickstoffquellen überprüft. Der Ansatz der Testlösungen, der Versuchsansatz und die Auswertung erfolgte ebenso wie in Kapitel 3.2.3.3.1 bei den Kohlenstoffquellen beschrieben, jedoch wurde als Grundlösung Difco Yeast Carbon Base (YCB) verwendet. Diese bestand aus denselben essentiellen Stoffen wie die YNB, allerdings war anstelle einer Stickstoff- eine Kohlenstoffquelle beinhaltet. Als Stickstoffquellen wurden Nitrat, Nitrit, Creatin und Creatinin verwendet. Auch hier wurde je Kohlenstoffquelle eine 50 mM Arbeitslösung hergestellt. Alle Lösungen wurden auf Sterilität überprüft (Anonymus, 2012a; Barnett et al., 2000; Barnett und Ingram, 1955; Seiler und Busse, 1988; Yarrow, 1998).

3.2.3.3.3 Anaerobe Verwertung von Kohlenhydrat- und Stickstoffquellen

Bei den Fermentationstests wurde die Verwertung bestimmter Kohlenhydratquellen (Cellobiose, Galactose, D-Glucose, Glucosid, Inulin, Lactose, Maltose, Melezitose, Melibiose, Raffinose, Stärke, Sucrose, Trehalose, Xylose) durch die einzelnen Hefestämme in Abwesenheit von Sauerstoff überprüft. Die Vorbereitung und der Ansatz erfolgte zunächst wie bei den Kohlenhydratassimilationstests in Kapitel 3.2.3.3.1 beschrieben, jedoch wurde das Gemisch aus Nährlösung und Hefesuspension in den Kavitäten der Minitekplatten mit 1 ml Paraffin überschichtet. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich unter dem Paraffin keine Lufteinschlüsse befanden. Die Auswertung erfolgte analog Abbildung 6 (Anonymus, 2012a; Barnett et al., 2000; Barnett und Ingram, 1955; Quast, 1978; Seiler und Busse, 1988; Wickerham und Burton, 1948; Yarrow, 1998).

3.2.3.3.4 Wachstumsvermögen in vitaminfreiem Medium

Die Durchführung des Wachstumstests in vitaminfreiem Medium und die Auswertung der Minitekplatten erfolgten analog Kapitel 3.2.3.3.1. Die Bestandteile des vitaminfreien Mediums wurden nach Barnett et al. (2000) eingewogen (Kapitel 11.1.3). Das Grundmedium enthielt Aminosäuren sowie Stickstoff- und Kohlenhydratquellen, jedoch wurden gänzlich Vitaminzusätze und Wachstumsfaktoren weggelassen. Zunächst wurden die Aminosäuren, Glucose und Ammoniumsulfat abgewogen, in 100 ml A. bidest gelöst und steril filtriert. Nach Einwaage der Spurenelemente und Salze wurden diese in 900 ml A. bidest gelöst und autoklaviert und mit der filtrierten Lösung gemischt. Vor Verwendung wurde das Medium auf Sterilität überprüft. (Anonymus, 2012a; Barnett et al., 2000; Barnett und Ingram, 1955; Seiler und Busse, 1988; Yarrow, 1998).

3.2.3.3.5 Wachstumsvermögen bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen

Zunächst wurde das Wachstum der Stämme bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen bestimmt. Dazu wurde eine STD I-Boullion hergestellt, zu der unterschiedliche Mengen Natriumchlorid zugegeben wurden, um eine 5, 10 und 15 %ige Lösung zu erhalten, in Reagenzgläser abgefüllt und autoklaviert. Die Sterilität der Boullion wurde vor Beimpfung überprüft. Mit einer sterilen Platinöse wurde jeweils eine Kolonie des Hefestammes in die Lösung überimpft, gevortext und somit eine Suspension mit gleicher Trübung hergestellt. Zur Auswertung wurde ein liniertes Papier hinter die Reagenzgläser gehalten. So konnte die Stärke der Trübung bestimmt werden, welche dann in der Auswertung zur Beurteilung eines Wachstums der Hefen als Referenz herangezogen wurde. Nach zwei Wochen Inkubation bei + 10 °C wurde die Trübung der Suspension mit der Ausgangstrübung verglichen und gegebenenfalls ein Wachstum dokumentiert (Anonymus, 2012a; Barnett et al., 2000; Yarrow, 1998).

3.2.3.3.6 Wachstumsvermögen bei erhöhter Glucosekonzentration

Um das Wachstum in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration zu ermitteln, wurden GYP-Nährböden gegossen, in denen eine Glucosekonzentration von 50 % vorlag. Das Koloniematerial der zu testenden Hefe wurde mittels Dreiösenausstrichs auf den Nährboden aufgetragen und zwei Wochen bei + 10 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte analog des Versuchsaufbaus für das temperaturabhängige Wachstum (Kapi-

tel 3.2.2.3). War nach 14 Tagen Inkubation kein Bewuchs der Platten festzustellen, wurde das Ergebnis als fehlendes Wachstum gewertet. Konnte in einigen Bereichen eine Zunahme des ausgestrichenen Koloniematerials beobachtet werden, wurde es als schwaches Wachstum dokumentiert. Als deutliches Wachstum wurden große, deutlich sichtbare Kolonien (> 2 mm) gewertet. Die Inkubationstemperatur orientierte sich in diesen Versuchen an der optimalen Wachstumstemperatur der jeweiligen Hefen (Anonymus, 2012a; Barnett et al., 2000; Yarrow, 1998).

3.2.3.3.7 Ureasetest

Der Ureasetest wurde auf dem Harnstoff-Agar nach Christensen durchgeführt. Dabei wurde Koloniematerial der zu untersuchenden Hefe mittels Dreiösenausstrichs auf den Nährboden ausgebracht und eine Woche bei + 10 °C inkubiert. Der Nährboden zeigte die Umsetzung des Harnstoffs über einen Farbumschlag nach rosa. Der Ureasetest wurde somit als positiv gewertet (Barnett et al., 2000; Christensen, 1946; Yarrow, 1998).

3.2.3.3.8 Diazonium Blue B-Test

Der Diazonium Blue B-Test diente der Unterscheidung von Ascomyceten und Basidiomyceten. Dabei wurde eine Kolonie der zu untersuchenden Hefe auf einer GYP-Platte mit eiskaltem TRIS-Puffer, in welchem Fast-Blue-B-Salz aufgelöst wurde, beträufelt. Verfärbte sich nach 2 Minuten die Kolonie dunkelrot bis violett, handelte es sich um einen Vertreter der Basidiomyceten. Trat keine Verfärbung ein wurde die Hefe den Ascomyceten zugeordnet (Anonymus, 2012a; Barnett et al., 2000; Yarrow, 1998).

3.2.4 Challengeversuche

3.2.4.1 Herstellung des Inokulationspools

Ziel der Challengeversuche war es, Kenntnis über die Wachstumskinetik ausgewählter Hefeisolate der Marktstudie und der Referenzstämmen unter bestimmten Bedingungen zu erhalten und deren Verderbspotential beurteilen zu können.

Es wurden drei Pools (Tabelle 8) an Hefeisolaten gebildet, wobei die Hefen nach Gattungszugehörigkeit zugeordnet wurden. Jeder Hefestamm wurde vor Beimpfung sieben Tage in STD I-Boullion bei + 10 °C angezüchtet. Vor Versuchsbeginn wurden die Konzentrationen der Hefesuspensionen mittels Thoma-Zählkammer bestimmt und in gleichen Anteilen die Lösungen des jeweiligen Pools zusammengefügt. Somit lagen die Hefestämme in einem Verhältnis von 1 : 1 : 1 vor.

Tabelle 8: Zusammenstellung der Hefestämme für die Beimpfungspools

Pool	Spezies	Herkunft	Stammnummer MRI
Pool I	<i>Candida alimentaria</i>	Eigenes Isolat	H 422
	<i>Candida argentea</i>	Eigenes Isolat	H 423
	<i>Candida galli</i>	Eigenes Isolat	H 436
Pool II	<i>Mrakia blollopsis</i>	Eigenes Isolat	H 425
	<i>Mrakia gelida</i>	Stammsammlung MRI	H 378
	<i>Mrakia gelida</i>	Stammsammlung MRI	H 379
	<i>Mrakia</i> spp.	Stammsammlung MRI	H 380
Pool III	<i>Kazachstania</i> spp.	Eigenes Isolat	H 411
	<i>Kazachstania</i> spp.	Eigenes Isolat	H 412
	<i>Kazachstania</i> spp.	Eigenes Isolat	H 414

MRI: Max Rubner-Institut, Kulmbach

3.2.4.2 Auswahl und Vorbereitung des Probenmaterials

Als Probenmaterial wurden vakuumverpackte Rinderschwanzrollen gekühlt direkt vom Schlachthof bezogen. Um bei jedem verwendeten Fleischteilstück und bei jedem Versuchsansatz eine gleiche Ausgangsqualität zu gewährleisten und somit eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, wurde als Ausgangsware immer Fleisch mit derselben Produktspezifikation (Schwanzrolle vom Jungbullen) vom gleichen Schlacht- und Zerlegebetrieb verwendet.

Die Eröffnung der Packung erfolgte durch ein steriles Skalpell. Zunächst wurde eine Probe zur Bestimmung des mikrobiologischen Status jeder Schwanzrolle entnommen (Kapitel 3.2.1.4) und der pH- und a_w -Wert (Kapitel 3.2.1.3) ermittelt. Im Anschluss wurde die gesamte Oberfläche des Fleischstückes mit einem Ethanol getränktem Papiertuch abgetupft und anschließend mit einem Bunsenbrenner abgeflammt (Abbildung 7).

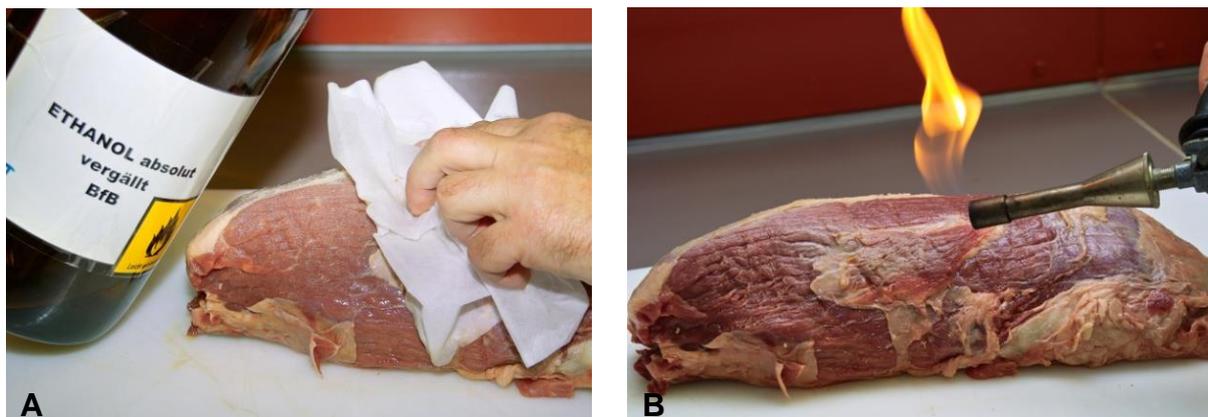


Abbildung 7: Vorbehandlung des Fleischstückes zur Reduzierung der Keime auf der Oberfläche (A = Abreiben der Fleischoberfläche mit Ethanol; B = Abflammen der Fleischoberfläche)

So wurden die Keime auf der Fleischoberfläche größtmöglich beseitigt. Im weiteren Vorgehen wurde mit einem sterilen Skalpell und Pinzette das Fleisch der Länge nach und jeweils an den Enden quer ca. 1 cm tief eingeschnitten. Nach Abflammen des Bestecks konnte nun die oberste, ca. 1 cm dicke Fleischschicht abgetragen werden. Das so entstandene Innenstück wurde unter wiederholtem Abflammen der Geräte in gleich große, 2 cm dicke Scheiben geschnitten (Abbildung 8).

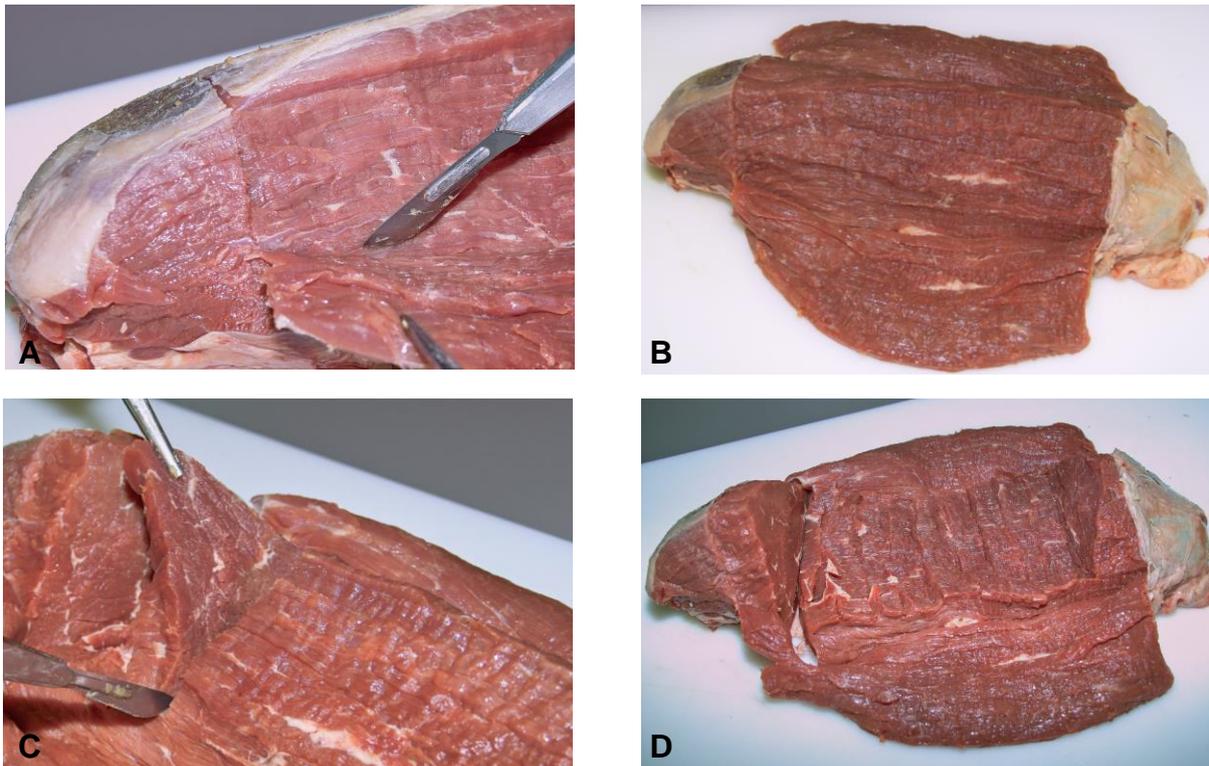


Abbildung 8: Arbeitsschritte bei der Präparation der Rinderschwanzrollen zur Gewinnung keimarmer Fleischscheiben (A = Abschälen der Fleischoberfläche; B = Abgeschälte Schwanzrolle; C = Herausschneiden der Fleischscheiben; D = Schwanzrolle nach Präparation)

3.2.4.3 Beimpfung der Probenstücke

Die Fleischstücke wurden mit einer Konzentration von 10^2 KbE/cm² beimpft. Dazu wurde von der Hefesuspension 1,0 bis 1,5 ml in Abhängigkeit von der Konzentration mittels einer sterilen Pipette auf die Fleischscheiben aufgebracht und im Anschluss mit einem Spatel auf der Fleischoberfläche verteilt (Abbildung 9).

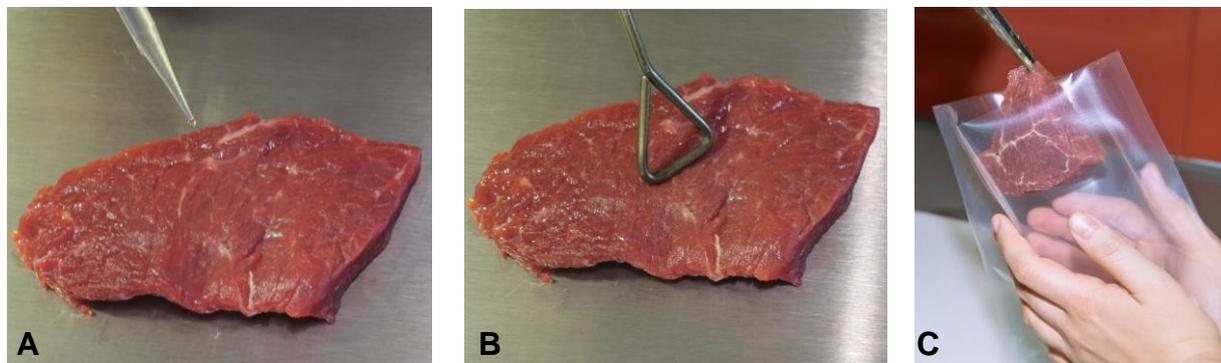


Abbildung 9: Beimpfung der keimarmen Fleischstücke mit Hefelösung (A und B) und Verpacken der Proben (C)

Zusätzlich zu den beimpften Fleischstücken wurde auch dieselbe Anzahl an unbeimpften Proben als Negativkontrollen geschnitten. Es wurden je Hefepool drei Versuchsansätze durchgeführt.

3.2.4.4 Lagerung und Verlaufskontrollen

Unmittelbar nach Beimpfung wurde jede Probe einzeln in Folie (Metzgereigenossenschaft Bayreuth) vakuumverpackt und in einem Kühlraum bei + 2 °C über einen Zeitraum von 12 Wochen (84 Tage) gelagert.

Je drei beimpfte Proben und drei unbeimpfte Kontrollproben wurden bei Versuchsbeginn am Tag 0 und dann an den Tagen 14, 28, 42, 56, 70 und 84 untersucht. Aus den drei ermittelten Werten der jeweiligen Keimzahlen von beimpften und unbeimpften Proben wurden der Medianwert und die Standardabweichung ermittelt.

Der Probenuntersuchungsgang verlief analog der Untersuchungen in der Marktstudie (Kapitel 3.2.1) und beinhaltete sowohl eine sensorische Prüfung wie auch die Bestimmung des a_w - und pH-Wertes. Bei der mikrobiologischen Untersuchung wurde die aerobe, mesophile Keimzahl, die Anzahl der Milchsäurebakterien, der Enterobacteriaceen, der Hefen und Schimmelpilzen bestimmt (Tabelle 9). Am Ende der Lagerzeit wurden die Proben 10 Minuten in Wasser gekocht und anschließend durch eine einfache beschreibende, sensorische Prüfung auf geruchliche und geschmackliche Abweichungen untersucht (ASU L 00.90-6, 1997).

Tabelle 9: Nährböden und Inkubationsbedingungen für die mikrobiologischen Untersuchungen bei Challengeversuchen

Keimspektrum	Nährboden	Temperatur	Zeit
Aerobe, mesophile Keimzahl	STD I-Agar	+ 30 °C	48 Stunden
Milchsäurebakterien	MRS-Agar	+ 30 °C	48 Stunden
Enterobacteriaceen	DHL-Agar	+ 30 °C	24 Stunden
Hefen und Schimmelpilze	MEA ⁺ -Agar	+ 4 °C	7 Tage

DHL-Agar: Desoxycholate-Hydrogen-Sulfide-Lactose-Agar

MEA⁺-Agar: Malzextrakt-Agar + Novobiocin

MRS-Agar: Lactobacillus-Agar nach de Man, Regosa und Sharpe

STD I-Agar: Standard I-Agar

3.2.5 Untersuchungen zur Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln

3.2.5.1 Zusammenstellung der Hefepools

Für diese Untersuchungen wurden zunächst wie in Tabelle 10 aufgeführt vier Hefepools gebildet.

Tabelle 10: Zusammenstellung der Hefestämme für die Desinfektionsmittelversuche

Pool	Spezies	Herkunft	Stamnummer MRI
Pool I	<i>Mrakia frigida</i>	DSMZ 4634	H 397
	<i>Mrakia frigida gelida</i>	DSMZ 70882	H 398
	<i>Mrakia gelida</i>	Stammsammlung MRI	H 378
	<i>Mrakia gelida</i>	Stammsammlung MRI	H 379
	<i>Mrakia</i> spp.	Stammsammlung MRI	H 380
Pool II	<i>Kazachstania</i> spp.	Eigenes Isolat	H 409
	<i>Kazachstania</i> spp.	Eigenes Isolat	H 411
	<i>Kazachstania</i> spp.	Eigenes Isolat	H 412
	<i>Kazachstania</i> spp.	Eigenes Isolat	H 414
	<i>Kazachstania</i> spp.	Eigenes Isolat	H 421
Pool III	<i>Candida sake</i>	Stammsammlung MRI	H 399
	<i>Candida zeylanoides</i>	Stammsammlung MRI	H 384
	<i>Candida zeylanoides</i>	Stammsammlung MRI	H 385
	<i>Filobasidium uniguttulatum</i>	Eigenes Isolat	H 418
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Eigenes Isolat	H 408
Pool IV	<i>Candida alimentaria</i>	Eigenes Isolat	H 422
	<i>Candida argentea</i>	Eigenes Isolat	H 423
	<i>Candida galli</i>	Eigenes Isolat	H 436
	<i>Pichia fermentans</i>	Eigenes Isolat	H 424

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
MRI: Max Rubner-Institut, Kulmbach

3.2.5.2 Beimpfung der Testplättchen

Die verwendeten Testplättchen wurden aus einem handelsüblichen Polyethylen-schneidebrett für den Metzgereibedarf (Metzgergenossenschaft Bayreuth) hergestellt. Es wurden daraus Quadrate mit einer Grundfläche von 50 cm² geschnitten. Der eine Teil der Plättchen behielt seine neue, glatte Oberfläche. Die Oberfläche des anderen Teils wurde mit einem Messer mehrfach eingeschnitten, um die Verhältnisse bei einem benutzten Schneidebrett zu simulieren (Abbildung 10).

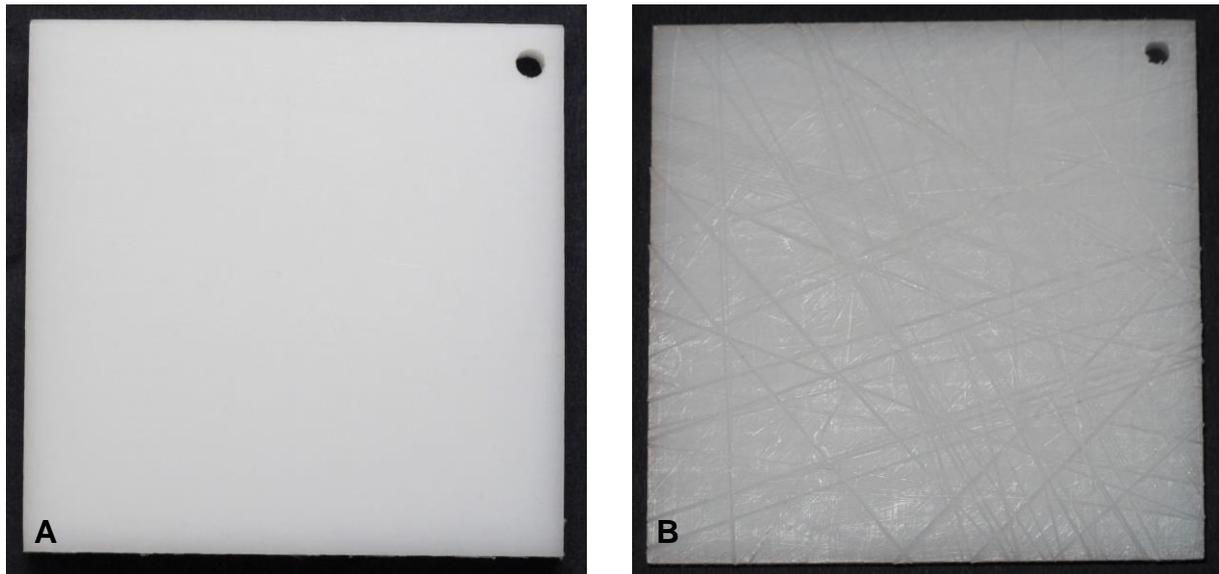


Abbildung 10: Zugeschnittene Schneidebretter (A = Testplättchen mit glatter Oberfläche; B = Testplättchen mit eingeritzter Oberfläche)

Der Versuch erfolgte in drei Ansätzen und wurde zweimal nacheinander durchgeführt. Die Hefestämme wurden in STD I-Boullion über sieben Tage bei + 10 °C inkubiert, anschließend die Konzentration der Kulturen mit Hilfe der Zählkammer nach Thoma bestimmt. Die einzelnen Hefesuspensionen wurden, wenn nötig, mit 0,85 %iger NaCl-Lösung verdünnt und zu gleichen Teilen in den jeweiligen Pool gegeben. Um eine bessere Anhaftung zu erreichen, wurde die hergestellte Suspension mit Rinderserum im Verhältnis 1:5 vermischt. Das beigemischte Rinderserum ermöglicht die Herstellung einer realistischen Situation wie im Zerlegeberieb, wobei durch das eiweißreiche, klebrige Serum eine Haftung und ein Schutz der Hefen vor den jeweiligen Desinfektionsmitteln erreicht werden kann (Böhm, 2013).

Anschließend wurden 0,1 ml dieses Inokulums mittels einer Glaspipette auf die autoklavierten Testplättchen aufgebracht (Abbildung 11) und mit einem Spatel verteilt, so

dass eine Beimpfung mit einer Konzentration von 10^3 KbE/cm² erfolgte. Die mitgeführten Negativkontrollen wurden nicht beimpft. Die Plättchen wurden über Nacht getrocknet.

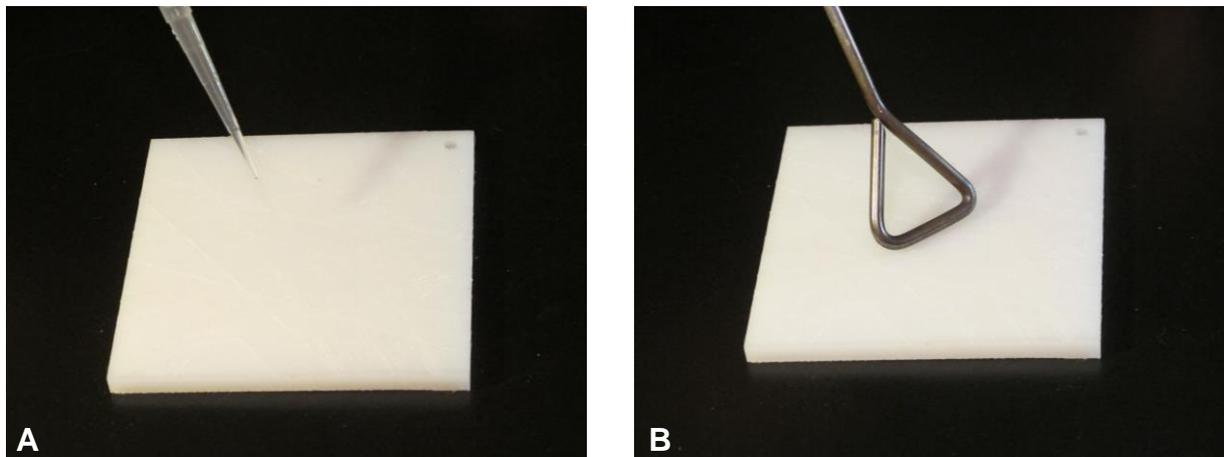


Abbildung 11: Beimpfung der Testplättchen mit 0,1 ml der Hefelösung

3.2.5.3 Behandlung mit den Desinfektionslösungen und Auswertung

Bei den verwendeten Mitteln handelte es sich um Produkte der Wirkstoffgruppen Alkohole, quartäre Ammoniumverbindungen, Peressigsäure und Aktivchlor. In Tabelle 11 sind die acht getesteten Desinfektionsmittel Antisept[®] A, Ethanol, Mucozit[®] B, Xyloquat[®] Plus, Antisept[®] PES 33, Wofasteril[®] und Steril[®] und die überprüften Einwirkzeiten und Konzentrationen aufgelistet. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben.

Tabelle 11: Wirkstoffgruppen und Einwirkzeiten verwendeter Desinfektionsmittel

Wirkstoffgruppe	Desinfektionsmittel	Konzentration	Einwirkzeit
Alkohol	Antisept [®] A	70 %	30 Minuten
	Ethanol	70 %	10 Minuten
	Mucozit [®] B	45 %	60 Minuten
Quartäre	Antisept [®] 10	1 %	60 Minuten
Ammoniumverbindungen	Xyloquat [®] Plus	2 %	15 Minuten
Peressigsäure	Antisept [®] PES 33	1,2 %	30 Minuten
	Wofasteril [®]	0,2 %	30 Minuten
Aktivchlor	Steril [®]	0,2 %	10 Minuten

Nach 12 Stunden Antrocknen der Hefesuspension erfolgte die Behandlung mit den verschiedenen Desinfektionsmitteln. Die inkubierten Plättchen wurden in Bechergläsern mit der Desinfektionslösung überschichtet, nach Ende der Einwirkzeit mit sterilem Wasser abgespült (Abbildung 12).

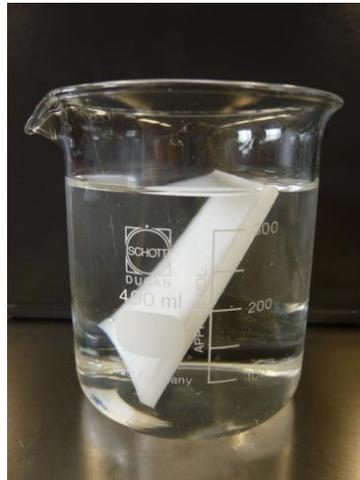


Abbildung 12: Behandlung des beimpften Testplättchens durch Eintauchen in die jeweilige Desinfektionslösung

Anschließend wurden diese in Stomacherbeutel mit 50 ml Peptonwasser überführt und 60 Sekunden per Hand geschüttelt. Aus den Beuteln wurde jeweils 1 ml der Lösung mit einer sterilen Glaspipette entnommen und auf einem MEA⁺-Nährboden ausgespatelt. Um zu kontrollieren, ob eine Wiederbelebung von Hefen, welche durch die Desinfektionsschritte geschädigt wurden, möglich war, wurde die verbliebene Lösung sieben Tage bei + 10 °C angereichert und dann ebenso angelegt. Neben der Reinigung mit den oben aufgeführten Lösungen, wurde auch ein Versuchsansatz nur mit sterilem Wasser abgespült. Außerdem wurden als Negativkontrollen unbeimpfte sowie als Positivkontrolle beimpfte Plättchen, welche nicht mit Desinfektionsmittel behandelt wurden, mitgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Marktstudie über vakuumverpacktes Fleisch

Im Rahmen der Marktstudie wurden vakuumverpackte Fleischproben auf das Vorkommen von psychrotoleranten und psychrophilen Hefen untersucht. Es handelte sich um 25 Rind-, 9 Wild-, 3 Lamm- und 2 Straußenfleischproben unterschiedlicher Herkunft.

4.1.1 Sensorische Untersuchungsergebnisse

Bei der Überprüfung der Verpackung wies keine Probe eine sichtbare Beschädigung der Folie auf.

Die Einteilung der Gasbildung erfolgte wie in nachfolgendem Schema dargestellt (Abbildung 13). In Abbildung 13 A lassen sich keine Gasblasen in der Verpackung erkennen. Waren in der Packung einzelne, kleine Gasblasen (kleiner als 1 cm) zu sehen, so wurde die Gasbildung als geringgradig beurteilt (Abbildung 13 B). Als mittelgradige Gasbildung wurden mehrere, große Gasblasen (größer als 1 cm) bewertet (Abbildung 13 C). Eine Packung, bei der die Folie über das gesamte Fleischstück aufgebläht war, wurde als hochgradige Aufgasung vermerkt (Abbildung 13 D).

Eine Gasbildung wurde in zehn Proben festgestellt. Bei vier Proben (Rind-04, Rind-05, Lamm-01, Wild-01) wurde die Gasbildung als mittelgradig beurteilt. Sechs Proben zeigten eine hochgradige Gasbildung (Rind-07, Rind-08, Rind-21, Rind-22, Rind-23, Rind-24). Eine Übersicht findet sich im Anhang in Tabelle 22.

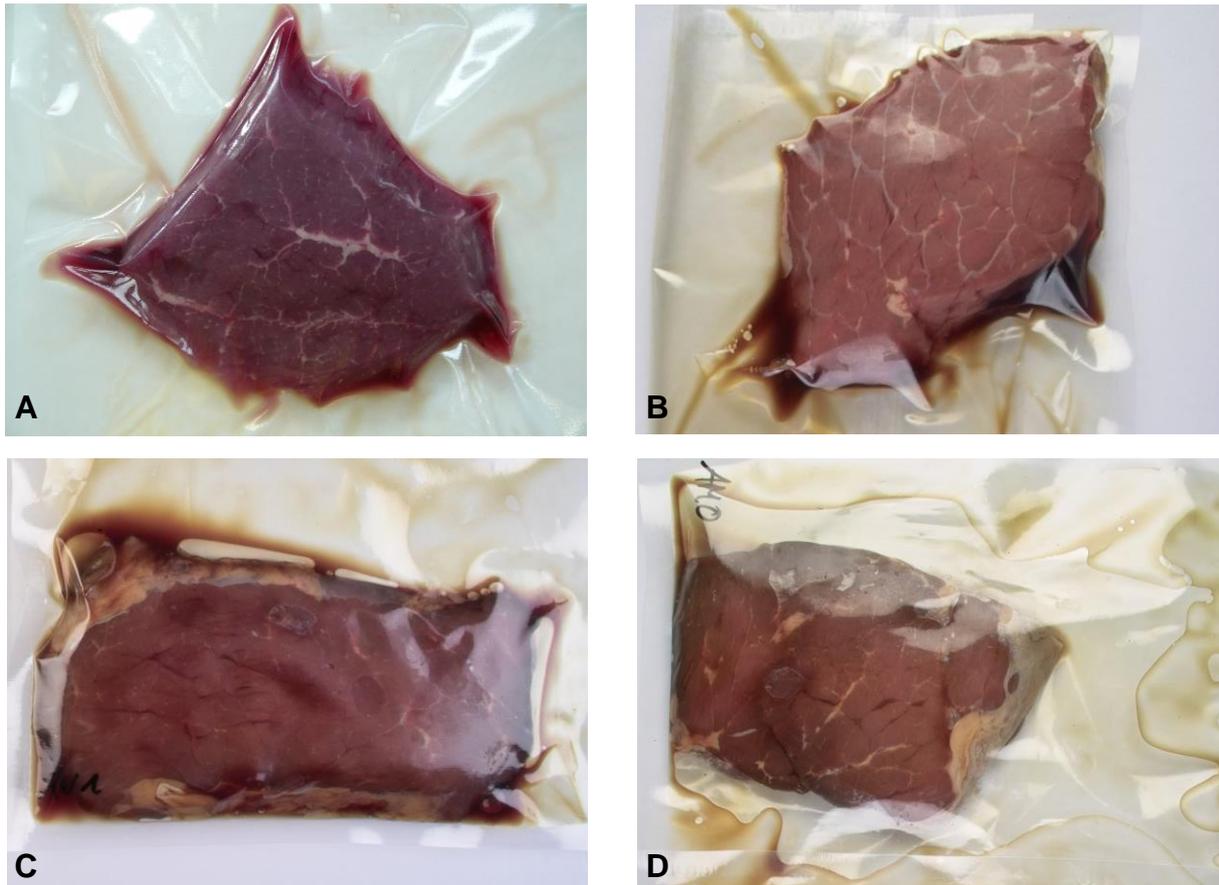


Abbildung 13: Ausmaß und Bewertung der Gasbildung beispielhaft anhand von Proben aus Challengeversuchen (A = keine Gasbildung; B = geringgradige Gasbildung; C = mittelgradige Gasbildung; D = hochgradige Gasbildung)

Bei der geruchlichen Beurteilung wurde bei den meisten Proben ein produkttypischer, leicht säuerlicher Reifegeruch festgestellt. Einige Proben zeigten davon Abweichungen. So wurde der Geruch von Probe Rind-03, Rind-04 als nicht typischer Reifegeruch, der Geruch von Probe Rind-07, Rind-08, Rind-21, Rind-22, Rind-23, Rind-24 nach fauligen Eiern und Buttersäure angegeben. Probe Rind-11 besaß einen muffigen Altgeruch, die Proben Rind-14, Lamm-01, Wild-01 rochen säuerlich-muffig und Probe Wild-08 fruchtig-säuerlich. Vier Handelsproben (Rind-19, Rind-20, Lamm-03, Wild-09) wurden als säuerlich vermerkt. Eine Übersicht findet sich im Anhang (Tabelle 22).

4.1.2 Bakterioskopische Untersuchungsergebnisse

Bakterioskopisch waren in den Fleischtropfsaftproben überwiegend kurze, mittellange und lange Stäbchen in unterschiedlichen Anteilen festzustellen. Zudem fanden sich in sechs Proben Kokken. In zwei Rindfleischproben konnten plumpe Stäbchen beobachtet werden (Rind-07 und Rind-08).

Wie in Abbildung 14 dargestellt wurden in acht Fleischtropfsaftproben Hefen nachgewiesen (Rind-02, Rind-03, Rind-04, Rind-05, Rind-18, Wild-07, Wild-08, Strauß-02). Eine ausführliche Übersicht über die lichtmikroskopischen Befunde befindet sich im Anhang (Tabelle 23).

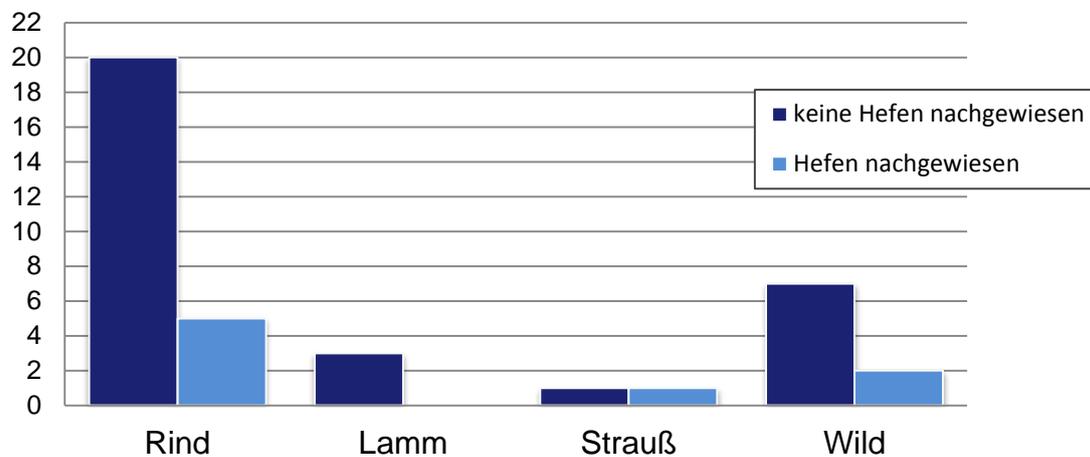


Abbildung 14: Anzahl der Fleischtropfsaftproben der Marktstudie, bei denen Hefen lichtmikroskopisch nachgewiesen werden konnten

4.1.3 pH- und a_w -Wert-Messergebnisse

Die Messwerte für den pH-Wert lagen im Bereich von 5,39 bis 6,54. Bei vier Proben (Rind-07, Rind-08, Rind-24, Strauß-01) wurde ein Wert von 6,0 bis 6,54 gemessen (Abbildung 15).

Die a_w -Werte lagen bei der überwiegenden Anzahl der Proben zwischen 0,9811 und 0,9930 (Abbildung 16). Drei Proben (Rind-10, Wild-03, Wild-08) zeigten niedrigere Werte zwischen 0,970 und 0,980. Im Anhang finden sich die Ergebnisse der beiden Versuchsansätze (Tabelle 24 und 25).

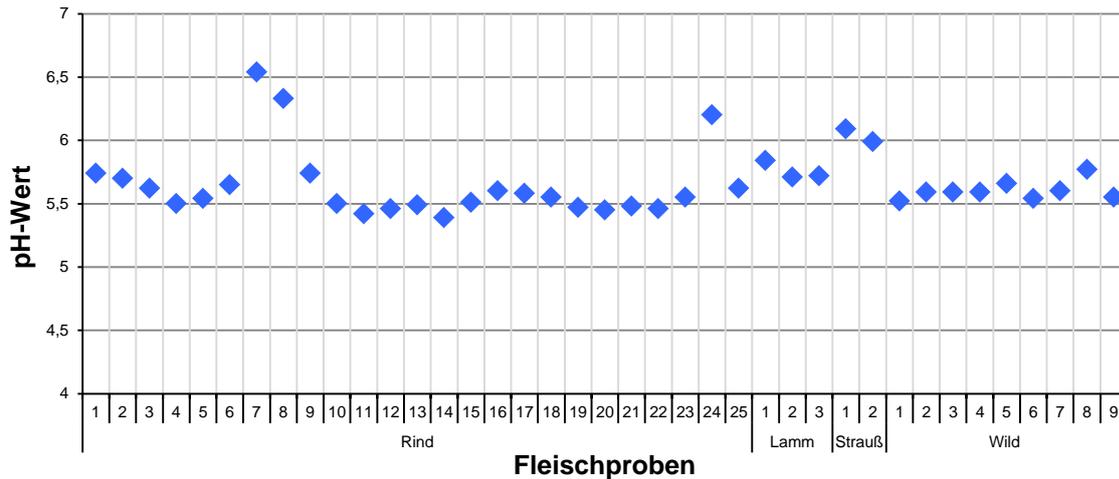


Abbildung 15: pH-Werte der untersuchten vakuumverpackten Fleischproben aus der Marktstudie (die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus den beiden Untersuchungsansätzen)

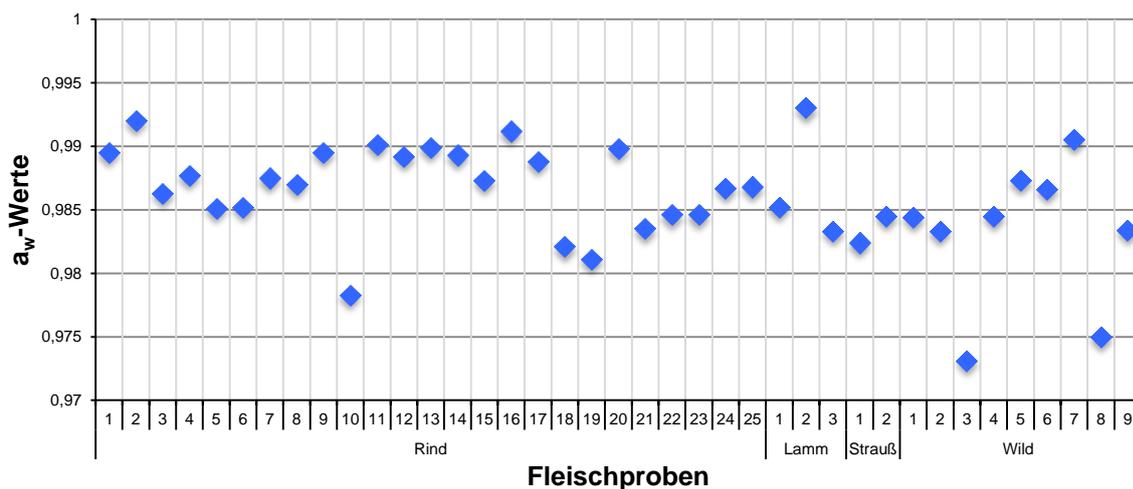


Abbildung 16: a_w-Werte der untersuchten vakuumverpackten Fleischproben aus der Marktstudie (die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus den beiden Untersuchungsansätzen)

4.1.4 Mikrobiologische Untersuchungsergebnisse

Die mikrobiologischen Untersuchungen wurden ebenso im Doppelansatz durchgeführt. In nachfolgenden Tabellen sind jeweils die Mittelwerte der beiden Ergebnisse dargestellt. Im Anhang finden sich die Ergebnisse der beiden Untersuchungen A und B (Tabelle 24 und 25).

4.1.4.1 Aerobe, mesophile Keimzahl und Milchsäurebakterien

Die aeroben, mesophilen Keimzahlen der Proben divergierten erheblich (Abbildung 17). Dabei lagen die Keimzahlen bei 21 Rindfleisch-, 2 Lammfleisch-, 2 Straußenfleisch- und 4 Wildfleischproben zwischen $1,2 \times 10^4$ KbE/cm² ($4,1 \log^{10}$ KbE/cm²) und $3,8 \times 10^7$ KbE/cm² ($7,6 \log^{10}$ KbE/cm²). Eine Rindfleischprobe (Rind-24) und eine Wildfleischprobe (Wild-07) wiesen hohe Keimzahlen von $2,1 \times 10^8$ KbE/cm² ($8,3 \log^{10}$ KbE/cm²) und $6,2 \times 10^8$ KbE/cm² ($8,8 \log^{10}$ KbE/cm²) auf. Sechs Proben (Rind-01, Rind-11, Rind-12, Wild-04, Wild-05, Wild-06) zeigten niedrige Keimzahlen zwischen $6,5 \times 10^2$ KbE/cm² ($2,8 \log^{10}$ KbE/cm²) und $6,2 \times 10^3$ KbE/cm² ($3,8 \log^{10}$ KbE/cm²) auf. Bei je einer Lamm- und Wildfleischprobe befanden sich die Werte unter der quantitativen Nachweisgrenze von 10^2 KbE/cm².

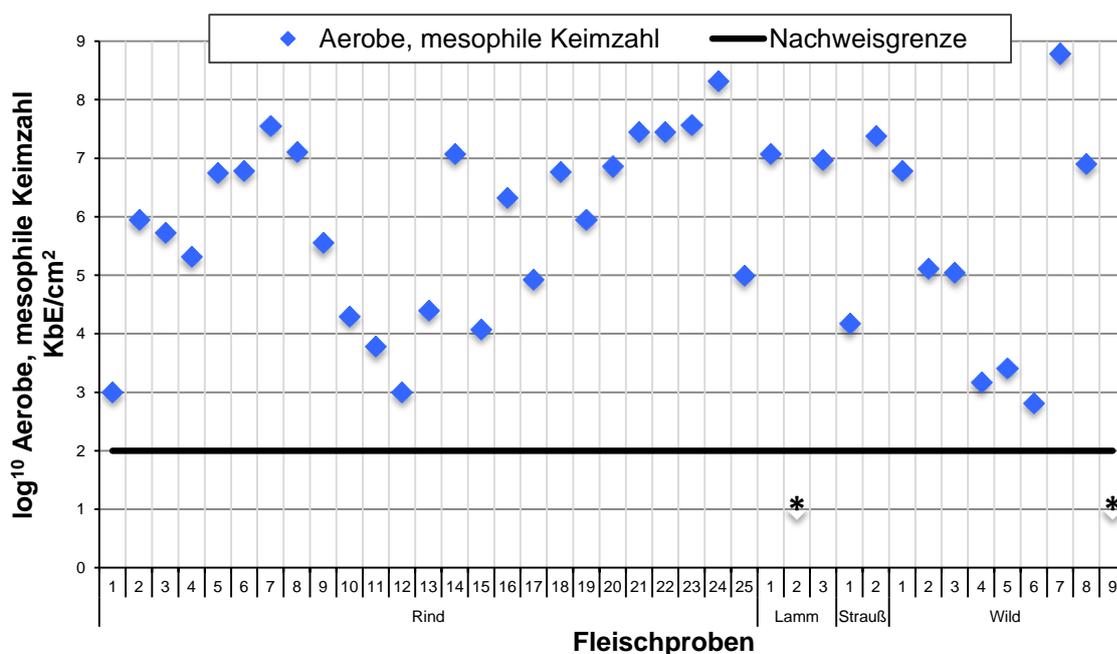


Abbildung 17: Aerobe, mesophile Keimzahl (KbE/cm²) der untersuchten Proben aus der Marktstudie (die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus den beiden Untersuchungsansätzen; * Proben, für die keine Werte existieren, da deren Keimzahl unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze von 10^2 KbE/cm² liegt)

Die aerobe, mesophile Keimzahl setzte sich überwiegend aus Milchsäurebakterien zusammen. Bei 32 Proben lagen die Keimzahlen zwischen $1,0 \times 10^3$ KbE/cm² ($3,0 \log^{10}$ KbE/cm²) und $1,5 \times 10^8$ KbE/cm² ($8,1 \log^{10}$ KbE/cm²). Die Probe Rind-24 enthielt $1,5 \times 10^8$ KbE/cm² ($8,2 \log^{10}$ KbE/cm²). Eine Rind- und zwei Wildfleischproben wiesen eine niedrige Milchsäurebakterienanzahl auf, wobei die Werte zwischen $1,5 \times 10^2$ KbE/cm² ($2,2 \log^{10}$ KbE/cm²) und $3,5 \times 10^2$ KbE/cm² ($2,5 \log^{10}$ KbE/cm²). Unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze lagen eine Rind-, eine Lamm- und zwei Wildfleischproben (Abbildung 18).

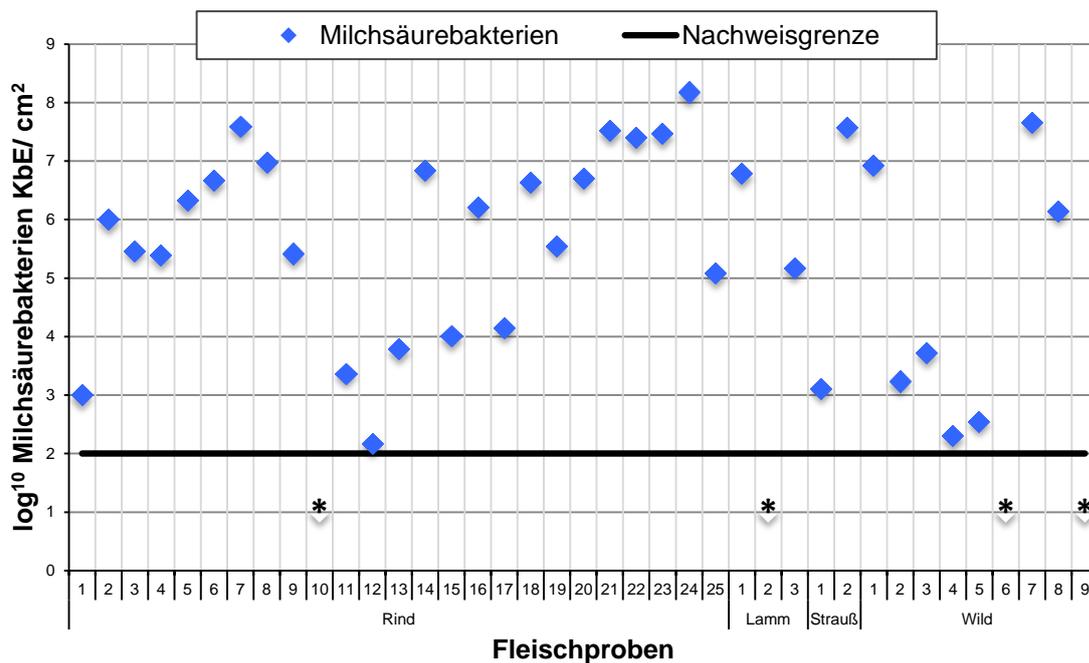


Abbildung 18: Milchsäurebakterienanzahl (KbE/cm²) der untersuchten Proben aus der Marktstudie (die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus den beiden Untersuchungsansätzen; * Proben, für die keine Werte existieren, da deren Keimzahl unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze von 10^2 KbE/cm² liegt)

4.1.4.2 Enterobacteriaceen und Pseudomonaden

Die Enterobacteriaceenanzahl lag bei 16 Proben (11 x Rind, 1 x Lamm, 1 x Strauß, 3 x Wild) unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze. Auch wurden hohe Werte von $1,9 \times 10^7$ KbE/cm² ($7,3 \log^{10}$ KbE/cm²) bei Probe Rind-24 und Probe Wild-07 von $5,3 \times 10^7$ KbE/cm² ($7,7 \log^{10}$ KbE/cm²) festgestellt. Die restlichen Werte der Fleischproben lagen im Bereich von $1,0 \times 10^2$ KbE/cm² ($2,0 \log^{10}$ KbE/cm²) und $4,0 \times 10^5$ KbE/cm² ($5,6 \log^{10}$ KbE/cm²) (Abbildung 19).

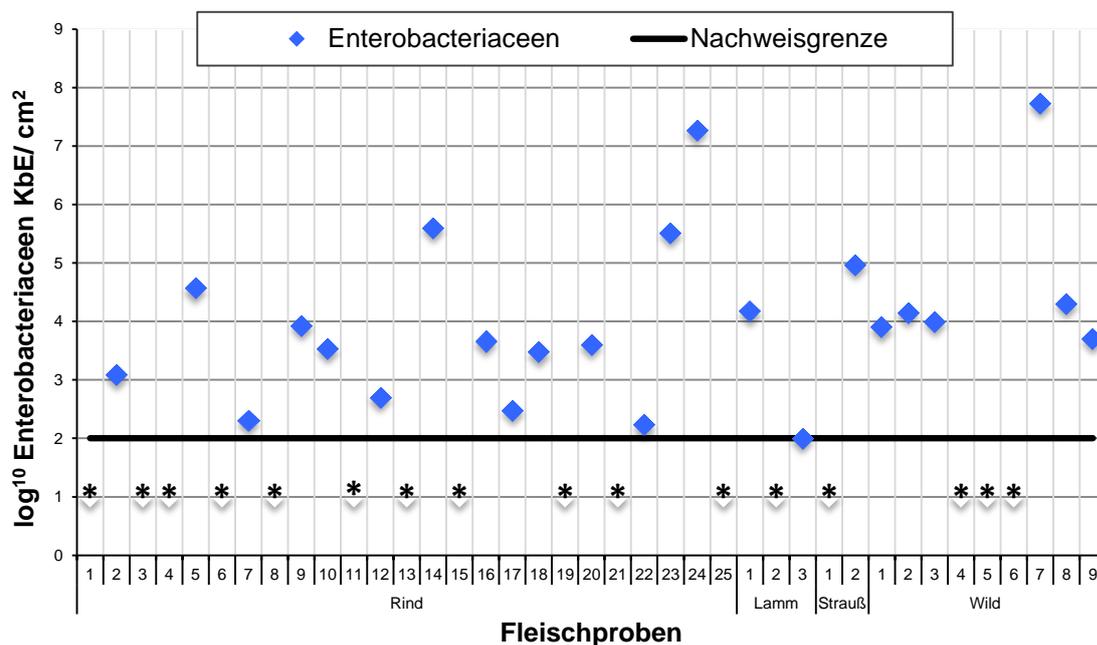


Abbildung 19: Enterobacteriaceenanzahl (KbE/cm²) der untersuchten Proben aus der Marktstudie (die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus den beiden Untersuchungsansätzen; * Proben, für die keine Werte existieren, da deren Keimzahl unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze von 10^2 KbE/cm² liegt)

Die Keimzahl der Pseudomonaden lag bei 19 Proben (16 x Rind, 1 x Lamm, 1 x Strauß, 1 x Wild) unterhalb der Nachweisgrenze. Eine Wildfleischprobe (W-07) zeigte eine hohe Keimzahl über 10^7 KbE/cm². Die restlichen Fleischproben wiesen Keimzahlen von $3,8 \times 10^2$ KbE/cm² ($2,6 \log^{10}$ KbE/cm²) und $1,2 \times 10^6$ KbE/cm² ($6,1 \log^{10}$ KbE/cm²) (Abbildung 20).

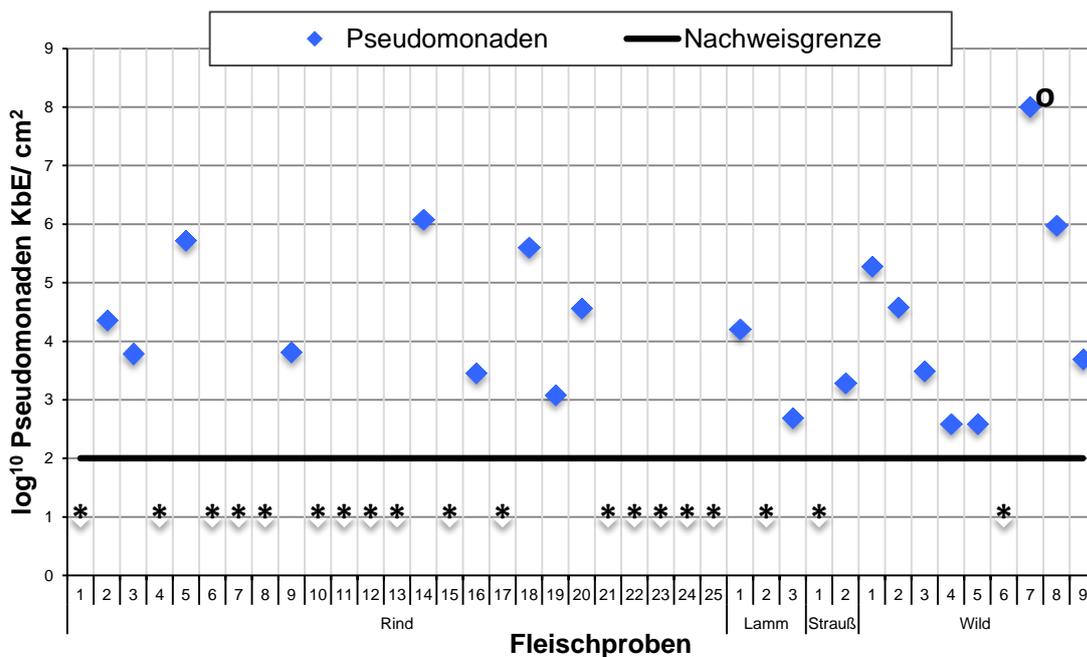


Abbildung 20: Pseudomonadenanzahl (KbE/cm²) der untersuchten Proben aus der Marktstudie (die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus den beiden Untersuchungsansätzen; * Proben, für die keine Werte existieren, da deren Keimzahl unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze von 10^2 KbE/cm² liegt; ● der Wert von Wildprobe 7 wurde aufgrund der hohen Keimzahl von $> 10^7$ KbE/cm² aus Darstellungsgründen mit 10^8 KbE/cm² angegeben)

4.1.4.3 Hefen

Insgesamt wurden bei einer Inkubationstemperatur von + 25 °C 19 Proben (11 x Rind, 2 x Lamm, 1 x Strauß, 5 x Wild) positiv auf Hefen untersucht. Davon konnten in 18 Handelsproben mesophile Hefen in Keimzahlen von $1,0 \times 10^2$ KbE/cm² ($2,0 \log^{10}$ KbE/cm²) bis $1,0 \times 10^3$ KbE/cm² ($3,0 \log^{10}$ KbE/cm²) nachgewiesen werden. Eine Wildprobe (Wild-07) wies eine hohe Anzahl von $6,4 \times 10^7$ KbE/cm² ($7,8 \log^{10}$ KbE/cm²) auf. 20 Proben lagen unterhalb der Nachweisgrenze (Abbildung 21).

Bei einer Inkubationstemperatur von + 4 °C konnten in 13 Handelsproben Hefen nachgewiesen werden und somit bei fast einem Drittel der Gesamtprobenzahl. Dabei lagen die meisten positiven Proben (4 x Rind, 1 x Strauß, 5 x Wild) bei einer Keimzahl zwischen 10 KbE/cm² ($1,0 \log^{10}$ KbE/cm²) und $7,0 \times 10^3$ KbE/cm² ($3,8 \log^{10}$ KbE/cm²). In zwei Rindfleischproben lagen Hefen in Keimzahlen von $2,2 \times 10^5$ KbE/cm² ($5,3 \log^{10}$ KbE/cm²) und $4,4 \times 10^5$ KbE/cm² ($5,6 \log^{10}$ KbE/cm²) vor. Eine Wildfleischprobe wies mit $4,0 \times 10^8$ KbE/cm² ($8,6 \log^{10}$ KbE/cm²) die höchste Keimzahl auf (Abbildung 22).

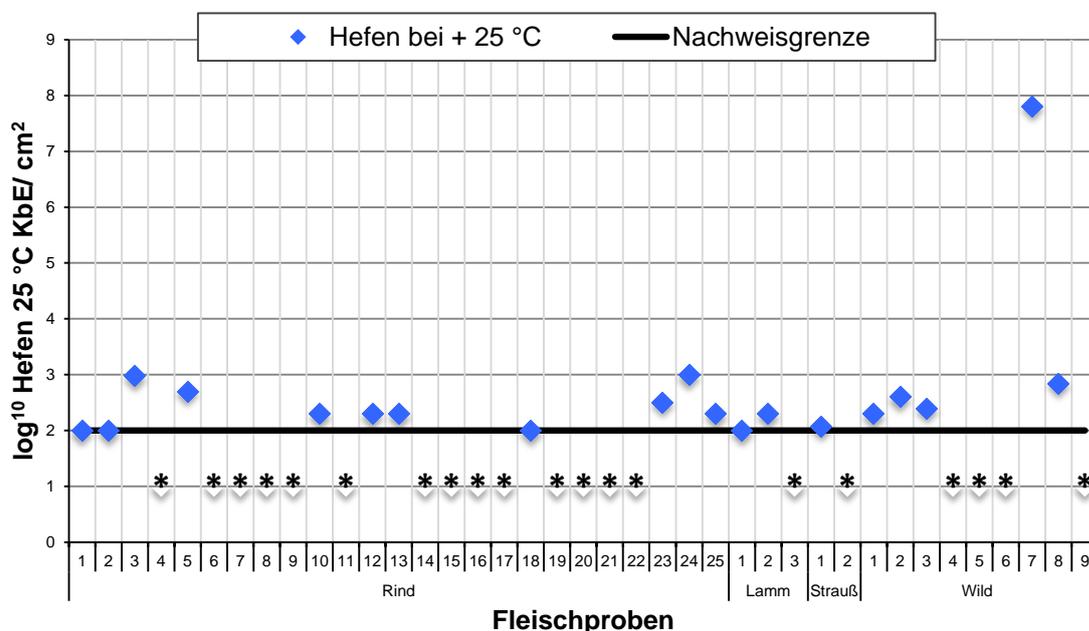


Abbildung 21: Hefeanzahl (KbE/cm²) der untersuchten Proben aus der Marktstudie bei + 25 °C (die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus den beiden Untersuchungsansätzen; * Proben, für die keine Werte existieren, da deren Keimzahl unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze von 10^2 KbE/cm² liegt)

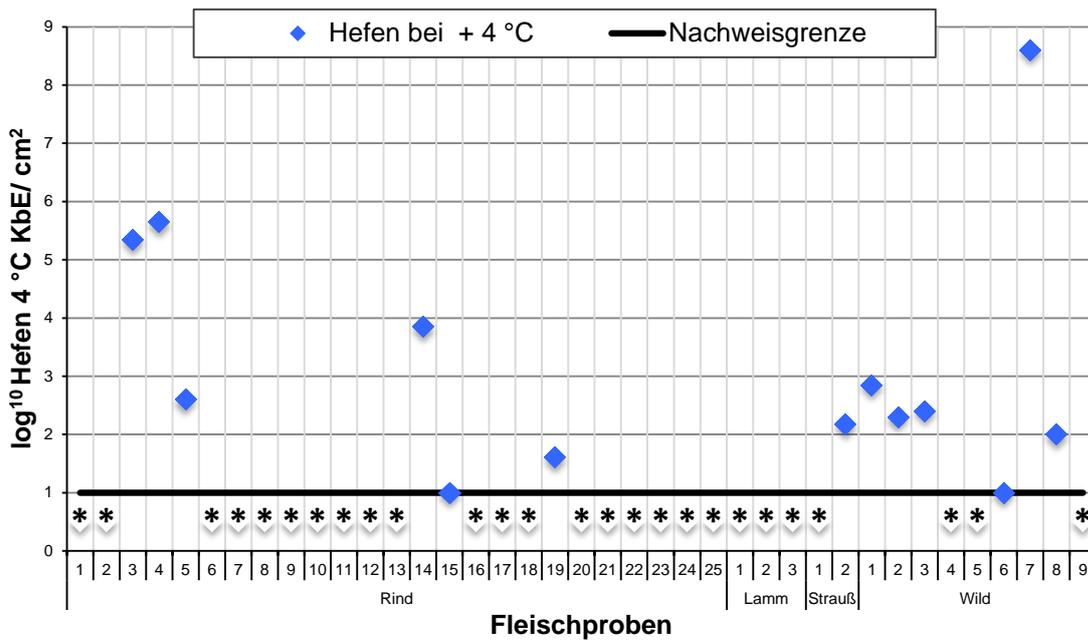


Abbildung 22: Hefeanzahl (KbE/cm²) der untersuchten Proben aus der Marktstudie bei + 4 °C (die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus den beiden Untersuchungsansätzen; * Proben, für die keine Werte existieren, da deren Keimzahl unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze von 10 KbE/cm² liegt)

4.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Marktstudie

Bei Straußenfleisch waren in einer Probe (Strauß-02) psychrotolerante Hefen nachgewiesen. In je sechs Rind- (Rind-03, Rind-04, Rind-05, Rind-14, Rind-15, Rind-19) und Wildfleischproben (Wild-01, Wild-02, Wild-03, Wild-06, Wild-07, Wild-08) ließen sich psychrotolerante Hefen finden (Abbildung 23).

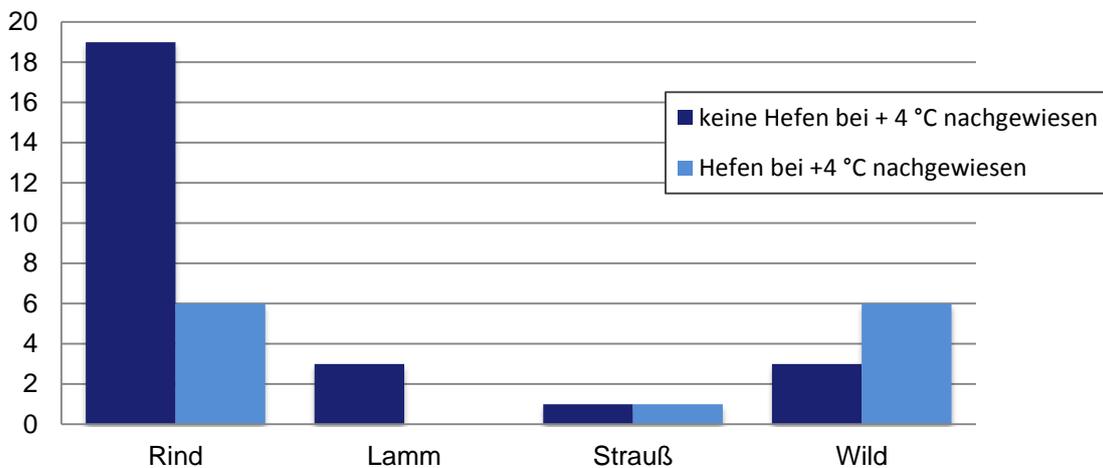


Abbildung 23: Übersicht zum Nachweis psychrotoleranter Hefen bei Fleischproben aus der Marktstudie, die bei + 4 °C isoliert wurden

4.2 Charakterisierung der isolierten Hefen

Die bei + 4 °C gewachsenen Kolonien der Marktstudie wurden nach der Auswertung in aufgezeigtem Schema (Abbildung 24) auf drei Nährböden (MEA⁺, GYP und YGC) überimpft.

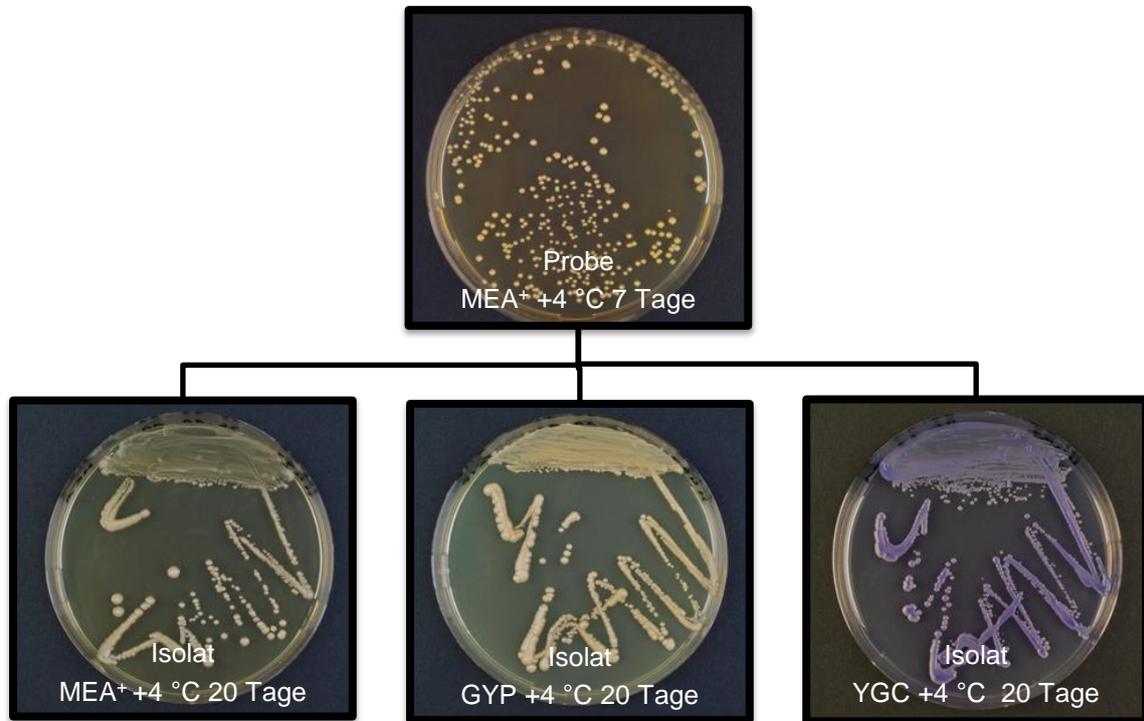


Abbildung 24: Vereinzlung eines Isolates von der MEA⁺-Platte der Handelsprobe auf drei unterschiedlichen Nährböden (MEA⁺ = Malzextrakt-Agar + Novobiocin; GYP = Glucose-Yeastextract-Pepton-Agar; YGC = Yeastextract-Glucose-Chloramphenicol-Agar + Bromphenol-blau)

4.2.1 Einteilung der Hefen anhand der Koloniemorphologie

Zur morphologischen Beschreibung wurden die GYP-, MEA⁺- und YGC-Nährböden (Abbildung 24) herangezogen. Nach 20 Tagen wurde die Kolonief orm jedes Isolates auf den Nährböden beschrieben und anhand dieser Beschreibung in Isolatgruppen, welche dieselben Eigenschaften bezüglich der Koloniemorphologie aufwiesen, zusammengefasst. Dabei konnte im direkten Vergleich der Isolate untereinander diese Eingruppierung durch das unterschiedliche Wachstum der einzelnen Isolate auf den drei verschiedenen Nährböden vorgenommen werden. Es konnten insgesamt 18 Isolatgruppen ermittelt werden (Tabelle 12).

Am deutlichsten konnte zunächst die Ausprägung eines roten Pigments auf den MEA⁺-, GYP- und YGC-Nährböden bei fünf Isolatgruppen (8, 9, 10, 17 und 18) fest-

gestellt werden. Die Gruppen 8, 9 und 10 zeigten eine orangene Koloniefarbe, während Gruppe 17 und 18 orange-apricotfarben waren. Gruppe 8 zeigte einen gelb-orangen Farbton. Isolate der Gruppe 18 waren im Vergleich zu Gruppe 17 auch auf dem MEA⁺-Nährboden in der Konsistenz schleimig.

Einen deutlich ausstrahlenden Kolonierand konnte man bei zwei Isolatgruppen (1 und 14) auf den GYP-, MEA⁺- und YGC-Nährboden erkennen. Auf dem MEA⁺-Nährboden war die Kolonieoberfläche der Gruppe 14 gehirnwindungsartig eingezogen. Isolatgruppe 3 zeigte auf dem GYP-Nährboden einen ausstrahlenden Rand.

Ein weiteres Isolat (6) zeigte eine schleimig, fließende Konsistenz des Koloniematerials auf dem MEA⁺-Agar.

Isolatgruppe 12 zeigte auf den GYP-Nährboden einen beige-gelblichen Farbton.

Die kleinen Kolonien der Isolatgruppe 13 zeigten auf dem GYP-Nährboden eine beige-apricot, auf dem MEA⁺-Nährboden eine beige und auf dem YGC-Nährboden durch das dem Nährboden zugesetzte Bromphenolblau eine blaue Farbe.

Die oben beschriebenen Isolatgruppen 1, 3, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 17 und 18 zeigten deutliche und charakteristische Merkmale der Koloniemorphologie. Jedoch konnten auch die weiteren Isolatgruppen im direkten Vergleich der drei Nährböden miteinander anhand der Koloniegröße, -farbe und -form voneinander abgegrenzt werden.

Tabelle 12: Einteilung der Isolate anhand der Koloniemorphologie (Farbe, Konsistenz, Kolonieforn) auf MEA⁺-, GYP- und YGC-Nährböden

Isolatgruppe	GYP-Nährboden	MEA ⁺ -Nährboden	YGC-Nährboden
1	weiß, cremig, ausstrahlend und gletscherartig	beige-gelb, cremig, ausstrahlend und stufig	weiß, cremig, ausstrahlend und gletscherartig
2	hellbeige, cremig, rund	hellbeige, cremig, rund	hellbeige, cremig, rund
3	weiß, cremig, ausstrahlend	beige, cremig, rund	hellbeige, cremig, rund
4	beige, cremig, rund	hellbeige, cremig, rund	hellbeige-bläulich, cremig, rund
5	hellbeige, cremig, rund	hellbeige, cremig, rund	hellbeige, cremig, rund
6	gelblich, cremig, rund	hellbeige, schleimig-fließend, rund	beige-bläulich, cremig, rund
7	beige, cremig, rund	hellbeige, cremig, rund	weiß, cremig, rund
8	orange-gelb, cremig, rund	orange-gelb, cremig, rund	orange-gelb, cremig, rund
9	*	*	orange-gelb-bläulich, schleimig, rund
10	*	*	orange, cremig, rund
11	hellbeige, cremig, rund	weiß, cremig, rund	hellbeige-bläulich, cremig, rund
12	beige-gelblich, cremig, rund	hellbeige, cremig, rund	weiß, cremig, rund
13	beige-apricot, cremig, rund	beige, cremig, rund	blau, cremig, rund
14	hellbeige, cremig, ausstrahlend	weiß, cremig, gehirnwundungsartig, ausstrahlend	weiß, cremig, ausstrahlend
15	weiß, cremig, rund	beige, cremig, rund	weiß, cremig, rund
16	*	*	weiß, cremig, rund
17	hellapricot, schleimig-fließend, rund	orange, cremig, rund	rosa-apricot, schleimig-fließend, rund
18	apricot, schleimig-fließend, rund	orange-rot, schleimig, rund	rosa-apricot, schleimig-fließend, rund

GYP-Agar: Glucose-Yeastextract-Pepton-Agar

MEA⁺-Agar: Malzextrakt-Agar + Novobiocin

YGC-Agar: Yeastextract-Glucose-Chloramphenicol-Agar + Bromphenolblau

* Eine Weiterverimpfung und Anzucht war im weiteren Versuchsverlauf nicht mehr möglich, weshalb nicht alle Untersuchungen durchgeführt werden konnten

4.2.2 Einteilung der Hefen anhand des temperaturabhängigen Wachstums

Bei + 25 °C zeigten 12 Isolatgruppen (Gruppe 1, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 17 und 18) ein deutliches Wachstum (Abbildung 25 C) und eine Isolatgruppe (Gruppe 6) ein schwaches Wachstum (Abbildung 25 B). Sie wuchsen somit bei + 4 °C und + 25 °C und wurden daher als psychrotolerant eingestuft.

Als psychrophile Organismen hingegen wurden fünf Hefegruppen (Gruppe 2, 13, 14 und 15) identifiziert. Sie zeigten lediglich bei + 4 °C ein Wachstum. Bei + 25 °C war kein Wachstum (Abbildung 25 A) beobachtbar. Auf den Platten ohne Wachstum befindet sich durch den Ausstrich ebenfalls Zellmaterial, welches jedoch im Verlauf der Inkubation nicht weiter wuchs.

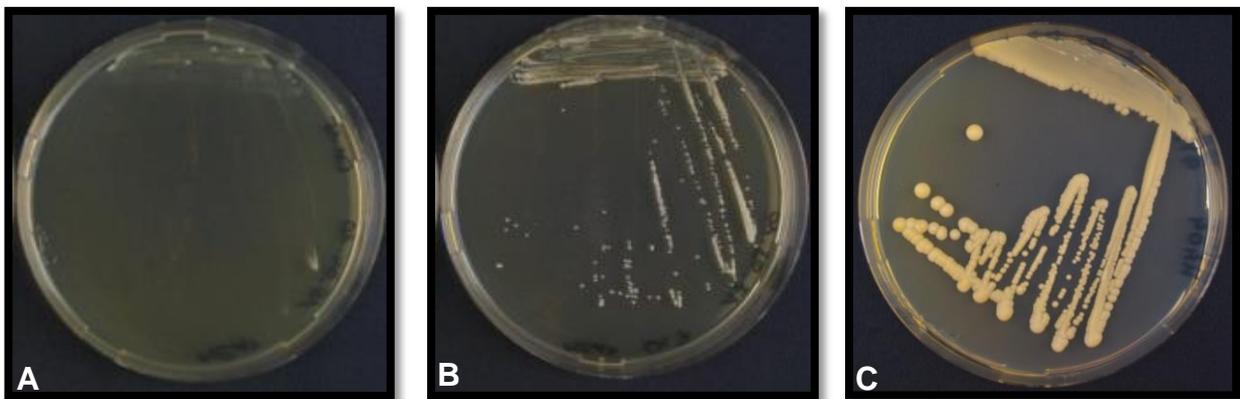


Abbildung 25: Darstellung der unterschiedlichen Bewertungen des temperaturabhängigen Wachstums von Hefekolonien (A = fehlendes Wachstum; B = schwaches Wachstum; C = deutliches Wachstum; Bilder aus eigenen Untersuchungen)

Bei den Gruppen 9, 10 und 16 konnte das Wachstum bei + 25 °C nicht mehr getestet werden, da die Isolate für weiterführende Untersuchungen nicht mehr anwuchsen. Eine Übersicht über die Untersuchungsergebnisse und die Einordnung der Isolatgruppen findet sich in Tabelle 13.

Tabelle 13: Wachstum der Hefen der Isolatgruppen bei unterschiedlichen Temperaturen (+ 4 °C und + 25 °C) auf MEA⁺-Nährboden nach 14 Tagen

Isolatgruppe	Wachstum bei + 4 °C	Wachstum bei + 25 °C
1	deutlich	deutlich
2	deutlich	fehlend
3	deutlich	deutlich
4	deutlich	deutlich
5	deutlich	deutlich
6	deutlich	schwach
7	deutlich	deutlich
8	deutlich	deutlich
9	deutlich	*
10	deutlich	*
11	deutlich	deutlich
12	deutlich	deutlich
13	deutlich	fehlend
14	deutlich	fehlend
15	deutlich	fehlend
16	deutlich	*
17	deutlich	deutlich
18	deutlich	deutlich

* Die Daten dieser Hefen fehlen, da eine Weiterverimpfung und Anzucht im Versuchsverlauf nicht mehr möglich war und deshalb nicht alle Untersuchungen durchgeführt werden konnten

4.2.3 Identifizierung der Hefen durch FTIR-Untersuchung

Für die Untersuchung durch das FTIR wurden die ausgestrichenen YGC-Nährböden herangezogen (Abbildung 24).

Zunächst konnte die morphologische Einordnung der Hefen in die 18 Isolatgruppen bestätigt werden. Von diesen Isolatgruppen wurden durch das FTIR acht eindeutig

identifiziert (*Candida sake*, *Candida zeylanoides*, *Cryptococcus curvatus*, *Debaryomyces hansenii*, *Filobasidium uniguttulatum*, *Pichia fermentans*, *Rhodotorula glutinis* und *mucilaginososa*). Die Isolatgruppen 1, 2 und 3 konnten als *Candida* spp. identifiziert werden. Die Isolatgruppe 6 konnte der Gattung *Cryptococcus*, die Isolatgruppe 13 der Gattung *Kazachstania* und die Isolatgruppe 14 der Gattung *Mrakia* zugeordnet werden. Vier Isolatgruppen (8, 9, 10 und 16) waren nicht identifizierbar (Tabelle 14).

Tabelle 14: Identifizierung der Isolatgruppen durch das FTIR

Isolatgruppe	Identifizierung (FTIR)
1	<i>Candida</i> spp.
2	<i>Candida</i> spp.
3	<i>Candida</i> spp.
4	<i>Candida sake</i>
5	<i>Candida zeylanoides</i>
6	<i>Cryptococcus</i> spp.
7	<i>Cryptococcus curvatus</i>
8	unbekannt
9	unbekannt
10	unbekannt
11	<i>Debaryomyces hansenii</i>
12	<i>Filobasidium uniguttulatum</i>
13	<i>Kazachstania</i> spp.
14	<i>Mrakia</i> spp.
15	<i>Pichia fermentans</i>
16	unbekannt
17	<i>Rhodotorula glutinis</i>
18	<i>Rhodotorula mucilaginososa</i>

4.2.4 Identifizierung der Hefen durch Sequenzanalyse

Aus den 18 Isolatgruppen wurde je ein Isolat für die Absicherung des FTIR-Ergebnisses und für die endgültige Identifizierung mittels Sequenzanalyse ausgewählt.

4.2.4.1 PCR und Gelelektrophorese

Nach der Aufreinigung der DNA ergaben sich durch die PCR mit den vier verschiedenen Primern (NL 1/4, ITS 1/4) in der Gelelektrophorese Amplifikate mit einer Länge von ungefähr 600 bp.

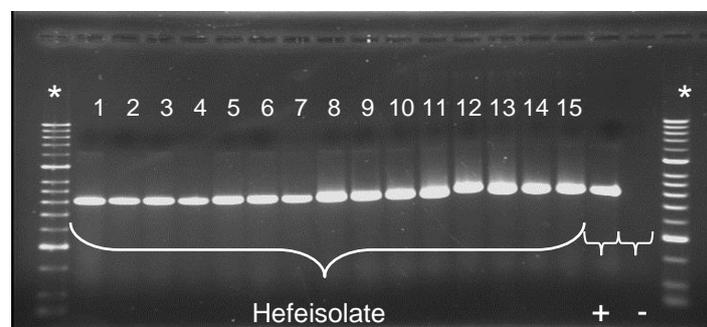


Abbildung 26: Ergebnisse der PCR von 15 Hefeisolaten für die Sequenzierung (1 - 15 = Hefeisolate; * = Längenstandard (50 bp - 2 kb); + = Positivkontrolle (*Mrakia gelida*, MRI-Stamm H 378); - = Negativkontrolle)

4.2.4.2 Auswertung der Sequenzierung

Die Sequenzierung konnte die Identifizierungsergebnisse der FTIR-Untersuchung der Isolatgruppen 4, 5, 7, 11, 12, 15, 17 und 18 bestätigen.

Die Isolatgruppe 6, bei der durch das FTIR lediglich die Gattung ermittelt wurde, konnte als *Cryptococcus carnescens* identifiziert werden.

Die aus einer Wildprobe isolierten Gruppen 8, 9, 10 und 17 wurden eindeutig (100 %) den Spezies *Cystofilobasidium capitatum*, *Cystofilobasidium infirmoinatum*, *Cystofilobasidium macerans* und *Rhodotorula creatinivora* zugeordnet.

Das Isolat der Gruppe 2 wurde zu 99 % als *Candida argentea* identifiziert. Die Hefen der Isolatgruppe 1 konnten mit einer Übereinstimmung von 100 % als *Candida alimentaria* identifiziert werden.

Aus der positiven Straußenfleischprobe (Isolatgruppe 3) ergab die Sequenzanalyse eine 98 - 100 %iger Übereinstimmung mit *Candida galli*.

Die Isolatgruppe 14, welche durch das FTIR zur Gattung *Mrakia* zugeordnet wurde, konnte mittels Sequenzierung mit einer Übereinstimmung von 99 - 99,7 % als *Mrakia blollopsis* identifiziert werden.

Die Isolatgruppe 13 wurde mit einer Übereinstimmung von 89 bis 97 % als *Kazachstania lodderae* nicht abschließend identifiziert (Tabelle 15).

Tabelle 15: Taxonomische Zuordnung der Hefeisolate auf Basis der Sequenzierungsergebnisse (D1/D2- und ITS-Domäne) sowie Nachweishäufigkeit und Fleischart der Proben

Isolatgruppe	Spezies	Übereinstimmung
1	<i>Candida alimentaria</i>	100 %
2	<i>Candida argentea</i>	99 %
3	<i>Candida galli</i>	98 - 100 %
4	<i>Candida sake</i>	100 %
5	<i>Candida zeylanoides</i>	100 %
6	<i>Cryptococcus carnescens</i>	100 %
7	<i>Cryptococcus curvatus</i>	100 %
8	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	100 %
9	<i>Cystofilobasidium infirmoinatum</i>	100 %
10	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	100 %
11	<i>Debaryomyces hansenii</i>	100 %
12	<i>Filobasidium uniguttulatum</i>	100 %
13	<i>Kazachstania</i> spp.	89 - 97 %
14	<i>Mrakia blollopsis</i>	99 - 99,7 %
15	<i>Pichia fermentans</i>	100 %
16	<i>Rhodotorula creatinivora</i>	100 %
17	<i>Rhodotorula glutinis</i>	100 %
18	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100 %

4.2.5 Übersicht über die Hefeisolate der Marktstudie

Es wurden im Rahmen der Marktstudie 18 psychrotolerante Hefen mit unterschiedlicher Koloniemorphologie isoliert.

Tabelle 16: Übersicht über die Zuordnung der Isolate zu den Proben der Marktstudie und über ihr Koloniewachstum auf GYP-, MEA⁺- und YGC-Nährboden

Isolatgruppe	Probe	GYP- Nährboden	MEA ⁺ - Nährboden	YGC- Nährboden
Isolatgruppe 1 <i>Candida alimentaria</i>	R-05			
Isolatgruppe 2 <i>Candida argentea</i>	R-05			
Isolatgruppe 3 <i>Candida galli</i>	S-02			
Isolatgruppe 4 <i>Candida sake</i>	R-03 R-14 W-07 W-08			
Isolatgruppe 5 <i>Candida zeylanoides</i>	R-03 W-02 W-03 S-02			

Fortsetzung Tabelle 16

Isolatgruppe	Probe	GYP- Nährboden	MEA ⁺ - Nährboden	YGC- Nährboden
Isolatgruppe 6 <i>Cryptococcus carnescens</i>	W-06			
Isolatgruppe 7 <i>Cryptococcus curvatus</i>	S-02			
Isolatgruppe 8 <i>Cystofilo- basidium capitatum</i>	W-07			
Isolatgruppe 9 <i>Cystofilo- basidium infirmoinatum</i>	W-07	Eine Weiterverimpfung und Anzucht war im weiteren Versuchsverlauf nicht mehr möglich, weshalb nicht alle Untersuchungen durchgeführt werden konnten		
Isolatgruppe 10 <i>Cystofilo- basidium macerans</i>	W-07	Eine Weiterverimpfung und Anzucht war im weiteren Versuchsverlauf nicht mehr möglich, weshalb nicht alle Untersuchungen durchgeführt werden konnten		

Fortsetzung Tabelle 16

Isolatgruppe	Probe	GYP- Nährboden	MEA ⁺ - Nährboden	YGC- Nährboden
Isolatgruppe 11 <i>Debaryomyces hansenii</i>	W-03			
Isolatgruppe 12 <i>Filobasidium uniguttulatum</i>	R-03			
Isolatgruppe 13 <i>Kazachstania spp.</i>	R-03 R-04 R-19			
Isolatgruppe 14 <i>Mrakia blollopsis</i>	W-01 W-07			
Isolatgruppe 15 <i>Pichia fermentans</i>	R-05			

Fortsetzung Tabelle 16

Isolatgruppe	Probe	GYP- Nährboden	MEA ⁺ - Nährboden	YGC- Nährboden
Isolatgruppe 16 <i>Rhodotorula creatinivora</i>	W-07	Eine Weiterverimpfung und Anzucht war im weiteren Versuchsverlauf nicht mehr möglich, weshalb nicht alle Untersuchungen durchgeführt werden konnten		
Isolatgruppe 17 <i>Rhodotorula glutinis</i>	R-15			
Isolatgruppe 18 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	R-03			
<p>GYP-Agar: Glucose-Yeastextract-Pepton-Agar MEA⁺-Agar: Malzextrakt-Agar + Novobiocin YGC-Agar: Yeastextract-Glucose-Chloramphenicol-Agar + Bromphenolblau</p>				

4.3 Neubeschreibung von *Kazachstania psychrophila*

Die Spezies der Isolatgruppe 13 konnte durch die bisherigen Untersuchungen nicht eindeutig identifiziert werden. Aus diesem Grund erfolgten weitergehende Untersuchungen, durch welche festgestellt wurde, dass es sich hierbei um eine neue Art, *Kazachstania psychrophila* sp. nov., handelt (Kabisch et al., 2013).

4.3.1 Koloniemorphologie

Die Kolonien der Isolatgruppe 13 wuchsen auf GYP- und MEA⁺-Nährböden beige-apricot- bzw. beigefarben, auf YGC-Agar zeigten sie durch das dem Nährboden zugesetzte Bromphenolblau eine blaue Farbe. Die Konsistenz des Koloniematerials war auf allen Nährböden cremig, die Kolonien wuchsen rund, besaßen eine Größe von 3 bis 4 mm und hatten einen glatten Rand. Auf MEA⁺- und YGC-Agar zeigten sie eine glänzende Oberfläche, wohingegen auf GYP-Agar die Oberfläche matt erschien (Abbildung 27).

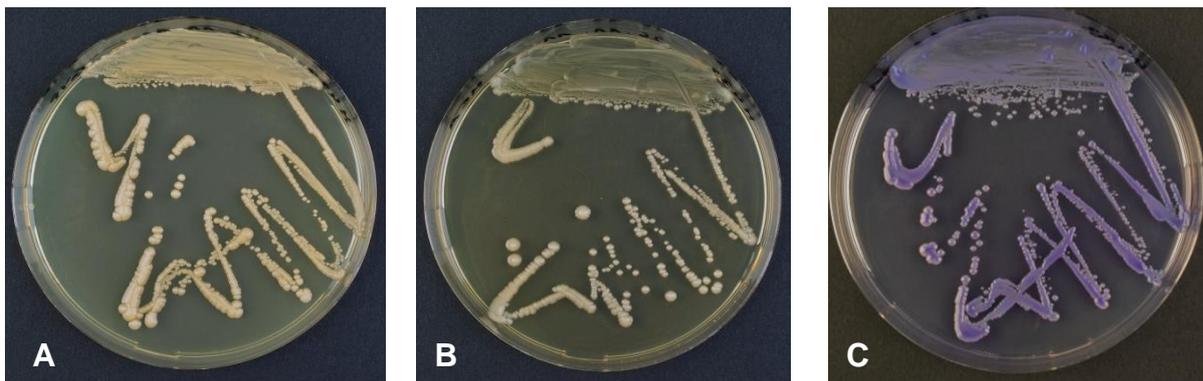


Abbildung 27: Wachstum von *Kazachstania psychrophila* (Isolatgruppe 13) auf unterschiedlichen Nährböden nach Inkubation bei + 4 °C über 20 Tage (A = GYP (Glucose-Yeast-Pepton-Agar); B = MEA⁺ (Malzextrakt-Agar + Novobiocin); C = YGC (Yeast-Glucose-Chloramphenicol-Agar))

4.3.2 Temperaturabhängiges Wachstum

Die Isolate von *Kazachstania psychrophila* zeigten bei + 4 °C und + 10 °C ein deutliches Wachstum. Bei + 25 °C konnte kein Wachstum mehr beobachtet werden. Im Gegensatz zu den Referenzstämmen zeigte *Kazachstania psychrophila* damit psychrophile Eigenschaften.

Eine Übersicht der Ergebnisse des temperaturabhängigen Wachstums der einzelnen Isolate findet sich im Anhang (Tabelle 26).

4.3.3 Zellmorphologie, Sprossung und Ascosporenbildung

Im Elektronenmikroskop wurden Hefezellen von *Kazachstania psychrophila* mit einer Größe von 3,5 - 5,7 x 2,4 - 4,5 µm vermessen. Die ovalen bis ellipsoiden Hefezellen einzeln, paarweise oder in kleinen Zellverbänden vor (Abbildung 28 A, B und C).

Kazachstania psychrophila zeigte eine asexuelle Vermehrung durch multilaterale Sprossung. Abbildung 28 A, B und C zeigen Mutter- und Tochterzellen in unterschiedlichen Stadien der Sprossung. An den Sprossungsstellen der Mutterzellen fanden sich Sprossungsnarben (Abbildung 28 A). Eine Pseudohyphenbildung durch Elongation einer Hefezelle ist auf Abbildung 28 D (4) zu erkennen.

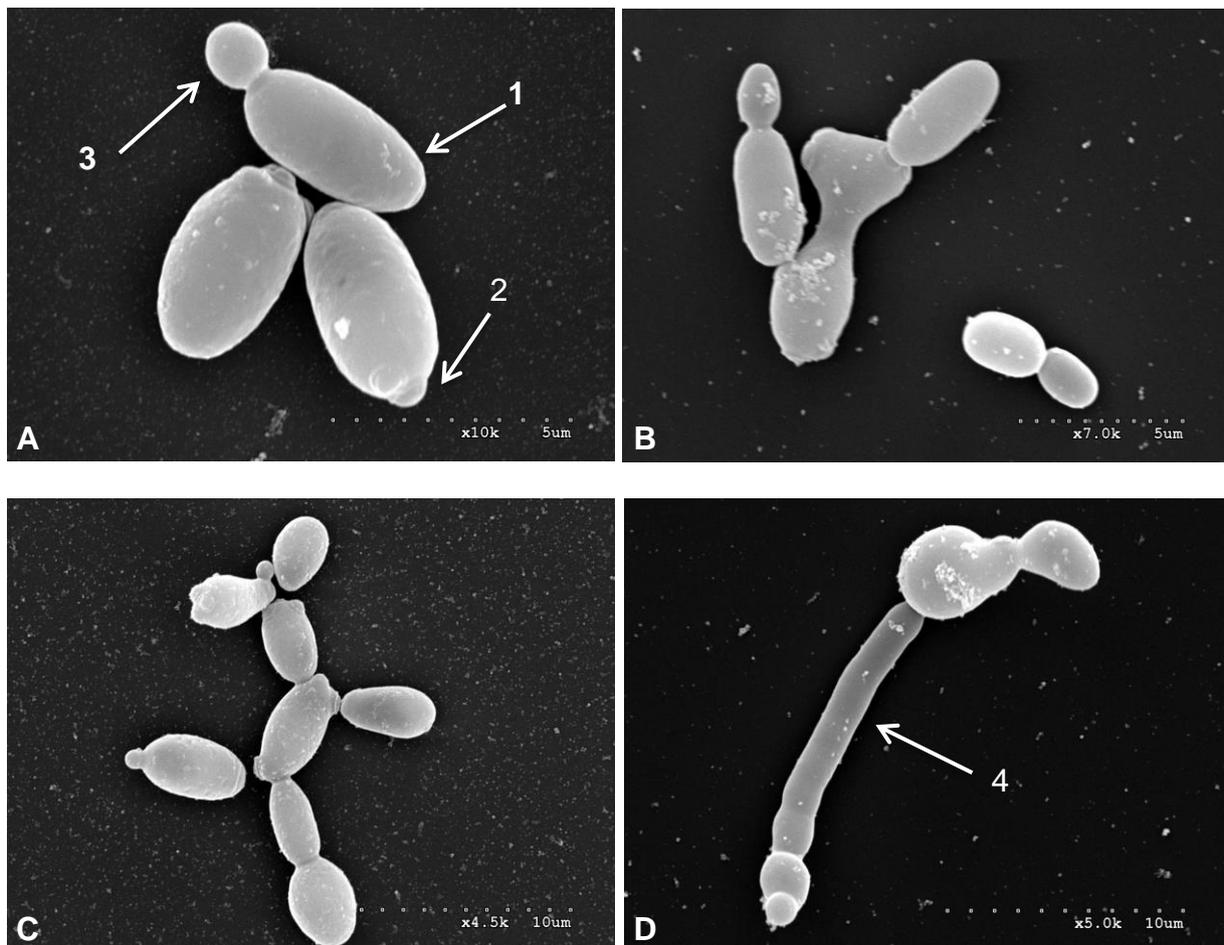


Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Kazachstania psychrophila* (A = Mutterzellen (1) mit Sprossnarben (2) und Tochterzellen (3); B = Hefezellen in verschiedenen Stadien der Sprossung; C = Verband aus Hefezellen; D = Pseudohyphe (4)); Vergrößerung: A = 10000fach; B = 7000fach; C = 4500fach; D = 5000fach

Kazachstania psychrophila zeigte auch eine Ascosporenbildung. Es befanden sich zwei bis vier Ascosporen in einem Ascus (Abbildung 29).

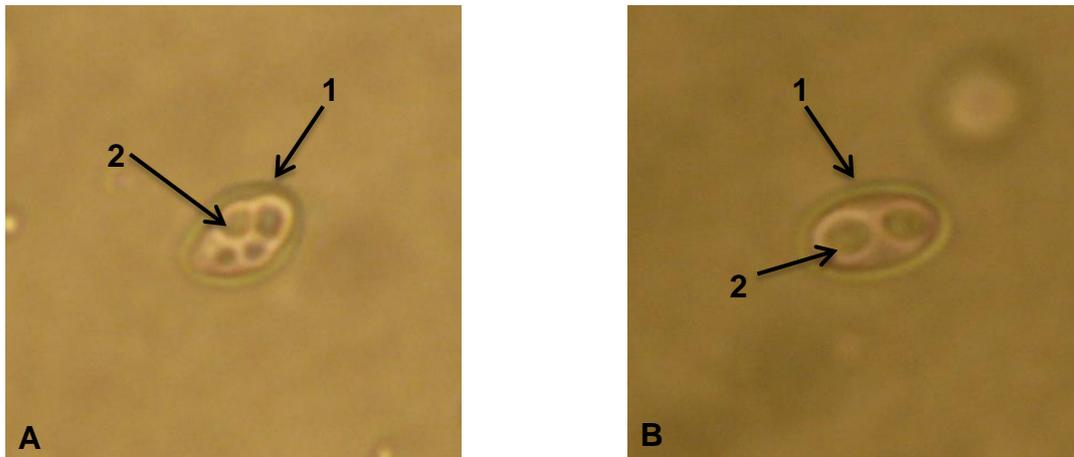


Abbildung 29: Bildung von Ascosporen von *Kazachstania psychrophila* nach Anzucht auf 2 %igem Malzextrakt-Agar bei + 10 °C über 28 Tage (A = Hefezelle (1) mit vier Ascosporen (2); B = Hefezelle (1) mit zwei Ascosporen (2))

4.3.4 Sequenzanalyse

Von allen Isolaten der Isolatgruppe 13 wurde die DNA isoliert. Die durch Amplifikation mit den Primer NL1/4 und ITS 1/4 erhaltenen PCR-Produkte wurden sequenziert und die erhaltene Sequenz mit den Datenbanken CBS und NCBI abgeglichen (Kapitel 3.2.2.5). Dies ergab eine Zugehörigkeit zur Gattung *Kazachstania*. Die höchste Übereinstimmung bei der D1/D2-Region konnte bei *Kazachstania lodderae* (97 %), *Kazachstania ichnusensis* und *unispora* (96 %) erzielt werden. Der Abgleich der ITS-Region ergab eine Übereinstimmung von 99 und 100 % bei zwei unkultivierbaren Kompostpilzen. *Kazachstania lodderae* (89 %), *Kazachstania kunashirensis* (87 %) und *Kazachstania piceae* (84 %) waren aus der Gattung *Kazachstania* mit der höchsten Übereinstimmung angegeben.

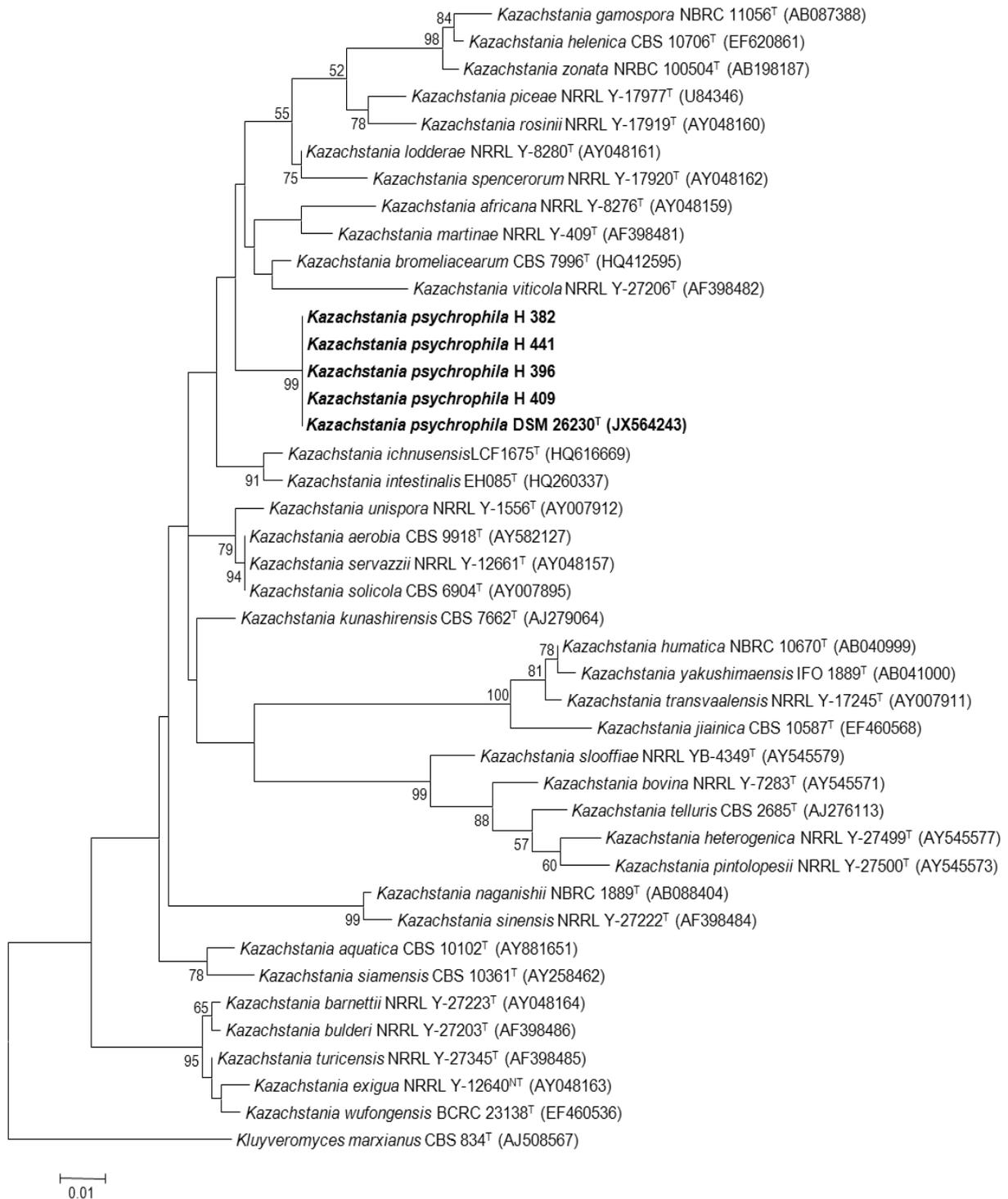


Abbildung 30: Stammbaum basierend auf der D1/D2-Region der großen Unter-einheit (26S) des rDNA-Gens, welcher die Verwandtschaft zwischen *Kazachstania psychrophila* und anderen *Kazachstania*-Spezies (Typ-Stämme) (nach Kabisch et al., 2013)

4.3.5 Physiologische Charakterisierung

Zur Charakterisierung und Identifizierung von *Kazachstania psychrophila* wurden die physiologischen Stoffwechselfähigkeiten herangezogen. Die drei Hefestämme (*Kazachstania unispora* CBS 398; *Kazachstania lodderae* CBS 2757 und *Kazachstania servazii* CBS 4311) wurden als Referenz herangezogen.

Eine ausführliche Übersicht über die Ergebnisse der physiologischen Charakterisierung der einzelnen Isolate findet sich im Anhang (Tabelle 26).

Bei der Untersuchung der aeroben Stoffwechselfähigkeiten konnten die Kohlenstoffquellen Galactose, Gluconsäure, Glucose, Glycerol, Raffinose, Sucrose, Trehalose, Milchsäure (schwach) und Succinylsäure (schwach) assimiliert werden. Nicht assimiliert wurden L-Arabinose, Cellobiose, Citrat, Ethanol, Erythriol, Galacitol, Glucosaminhydrochlorid, Glucosid, Hexadecan, Inulin, Lactose, Maltose, Mannitol, Melezitose, Melibiose, Methanol, Myo-Inosit, Rhamnose, Ribitol, Ribose, Salicin, Sorbitol, Sorbose, Stärke, Xylose. Die vier getesteten Stickstoffquellen Nitrat, Nitrit, Creatin und Creatinin konnten nicht assimiliert werden (Tabelle 17).

Unter anaeroben Bedingungen konnten die Kohlenstoffquellen Galactose, Glucose, Maltose (schwach), Raffinose, Sucrose, Trehalose fermentiert werden. Cellobiose, Glucosid, Inulin, Lactose, Melezitose, Melibiose, Stärke und Xylose wurden nicht fermentiert (Tabelle 17).

Bei einer NaCl-Konzentration von 5 % und 10 % konnte ein deutliches Wachstum festgestellt werden, bei einer Konzentration von 16 % war ein schwaches Wachstum zu erkennen (Tabelle 17).

Ein Wachstum in vitaminfreiem Medium und bei einer Glucosekonzentration von 50 % wurde nicht beobachtet. Der Ureasetest und der Diazonium Blue B Test verliefen negativ.

Tabelle 17: Übersicht ausgewählter Ergebnisse der physiologischen Charakterisierung von *Kazachstania psychrophila*

Assimilation Kohlenstoffquellen			
L- Arabinose	-	Melezitose	-
Cellulose	-	Melibiose	-
Citrat	-	Methanol	-
Ethanol	-	Milchsäure	(+)d
Erythriol	-	Myo-Inosit	-
Galacitol	-	Raffinose	+
Galactose	+	Rhamnose	-
Gluconsäure	+	Ribitol	-
Glucosaminhydrochlorid	-	Ribose	-
D-Glucose	+	Salicin	-
Glucosid	-	Sorbitol	-
Glycerol	+	Sorbose	-
Hexadecan	-	Stärke	-
Inulin	-	Succinylsäure	(+)d
Lactose	-	Sucrose	+
Maltose	-	Trehalose	+
Mannitol	-	Xylose	-
Assimilation von Stickstoffquellen			
Nitrat	-	Creatin	-
Nitrit	-	Creatinin	-
Fermentation			
Cellulose	-	Melezitose	-
Galactose	+	Melibiose	-
D-Glucose	+	Raffinose	+
Glucosid	-	Stärke	-
Inulin	-	Sucrose	+
Lactose	-	Trehalose	+
Maltose	(+)	Xylose	-
Temperaturabhängiges Wachstum			
	+ 4 °C		+
	+ 10 °C		+
	+ 25 °C		-
NaCl-Konzentration			
	5 %		+
	10 %		+
	16 %		(+)
+ deutliches Wachstum (+) schwaches Wachstum - kein Wachstum d verzögertes Wachstum			

4.4 Challengeversuche

4.4.1 Challengeversuche mit *Candida* spp.

4.4.1.1 Physikalisch-chemische Parameter

Der pH-Wert lag am Tag der Beimpfung bei 5,65 und blieb bei den beimpften Proben bis zu Tag 42 auf diesem Niveau. Ab Tag 42 konnte eine deutliche Abnahme bis Tag 56 auf 5,27 festgestellt werden. Anschließend stieg der pH-Wert bis zum Tag 84 leicht an und erreichte in beimpften Fleischstücken Werte von 5,42.

Der Anfangswert bei den Kontrollen lag ebenfalls bei 5,65. Bis Tag 56 sank der Wert auf 5,21 und erreichte am Tag 84 einen Endwert von 5,3 (Abbildung 31).

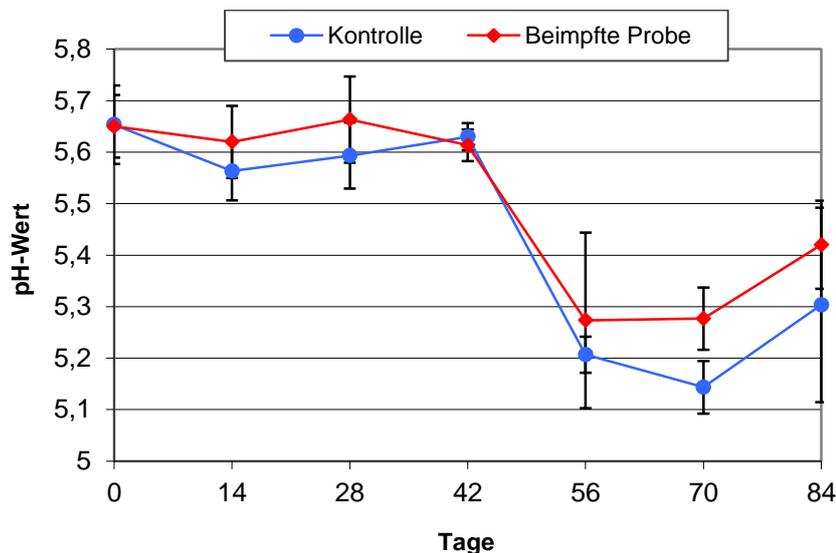


Abbildung 31: Verlauf der pH-Werte der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Candida* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung)

Der a_w -Wert lag zu Beginn bei den beimpften Proben bei 0,9890 und fiel bis Tag 28 bei den beimpften Proben auf 0,9870. Der Anfangswert lag bei den Kontrollen bei 0,9891 und sank auf 0,9881 am Tag 28. Im weiteren Verlauf nahmen diese Werte gleichermaßen bis auf 0,9860 (Kontrolle) und 0,9858 (beimpfte Probe) ab (Abbildung 32).

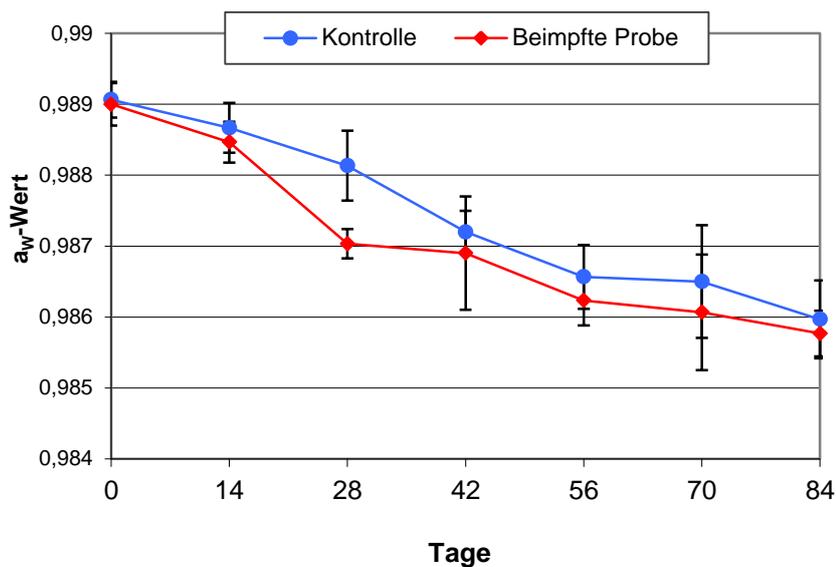


Abbildung 32: Verlauf der a_w -Werte der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Candida* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei +2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung)

4.4.1.2 Mikrobiologische Parameter

Die aerobe, mesophile Keimzahl der beimpften Proben stieg von 30 KbE/cm² ($1,5 \log^{10}$ KbE/cm²) am Tag 0 bis auf einen Wert von $4,5 \times 10^4$ KbE/cm² ($4,7 \log^{10}$ KbE/cm²) am Tag 14. Am Tag 28 wurde ein Wert von $2,6 \times 10^6$ KbE/cm² ($6,4 \log^{10}$ KbE/cm²) ermittelt. Mit zunehmender Lagerzeit stieg die Keimzahl und erreichte am Tag 42 Werte von $8,9 \times 10^7$ KbE/cm² ($7,9 \log^{10}$ KbE/cm²) und am Tag 84 von $3,2 \times 10^9$ KbE/cm² ($9,5 \log^{10}$ KbE/cm²).

Bei den Kontrollproben lag am Tag 0 die Keimzahl unter der quantitativen Nachweisgrenze und stieg bis Tag 28 auf $3,6 \times 10^6$ KbE/cm² ($6,6 \log^{10}$ KbE/cm²) und weiter bis Tag 84 auf $1,7 \times 10^9$ KbE/cm² ($9,2 \log^{10}$ KbE/cm²) (Abbildung 33).

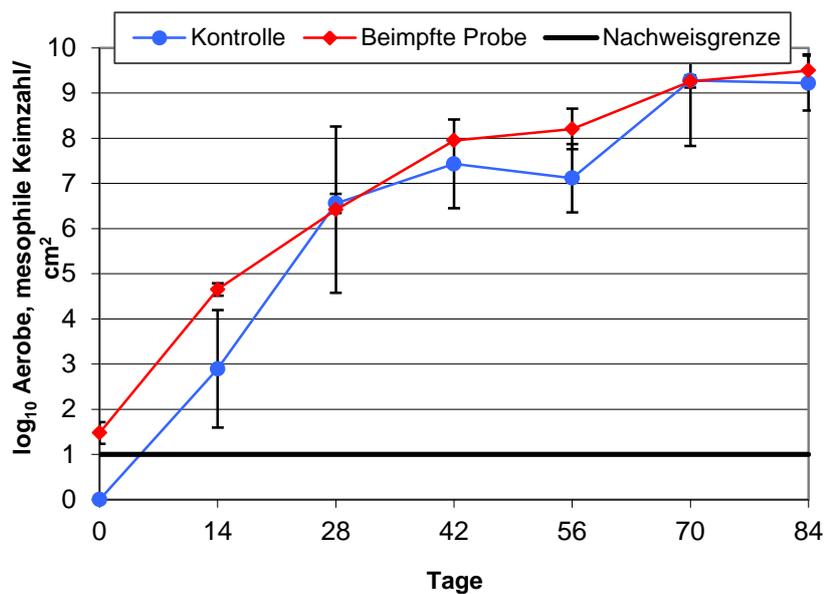


Abbildung 33: Verlauf der aeroben, mesophilen Keimzahl der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Candida* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²)

Analog hierzu zeigte sich der Verlauf der Milchsäurebakterienkeimzahlen sowohl bei den beimpften Fleischproben als auch bei den Kontrollen. Die Keimzahlen der beimpften Fleischstücke stiegen von 20 KbE/cm² (1,3 log¹⁰ KbE/cm²) zu Beginn auf 2,2 x 10⁶ KbE/cm² (6,3 log¹⁰ KbE/cm²) am Tag 28. Am Tag 84 zeigten die inokulierten Proben einen Wert von 3,5 x 10⁹ KbE/cm² (9,5 log¹⁰ KbE/cm²).

Am Tag 0 war bei den Kontrollproben kein direkter Nachweis der Milchsäurebakterien möglich. Bis Tag 42 stieg die Keimzahl stetig auf 5,6 x 10⁷ KbE/cm² (7,7 log¹⁰ KbE/cm²) an. Nach einem Abfall auf 6,6 x 10⁶ KbE/cm² (6,8 log¹⁰ KbE/cm²) am Tag 56 nahm die Keimzahl anschließend bis Tag 84 auf 1,1 x 10⁹ KbE/cm² (9,0 log¹⁰ KbE/cm²) zu (Abbildung 34).

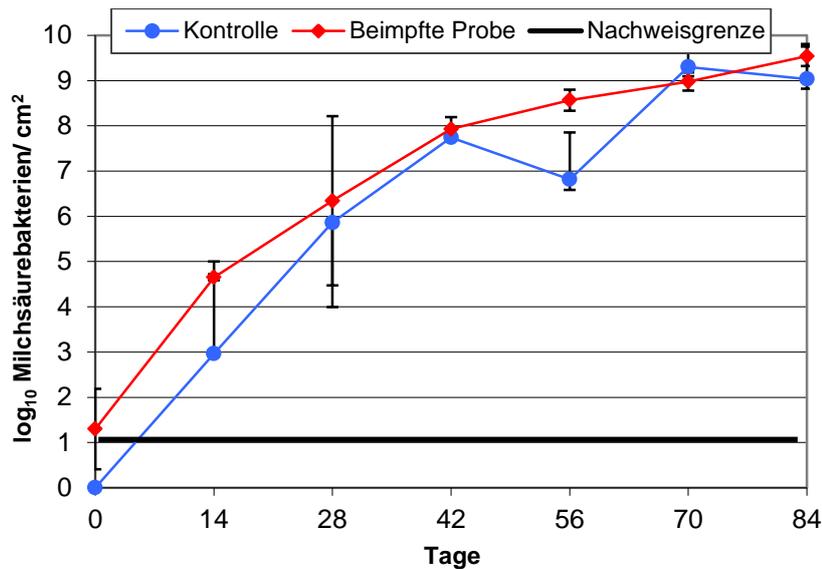


Abbildung 34: Verlauf der Keimzahl der Milchsäurebakterien der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Candida* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²)

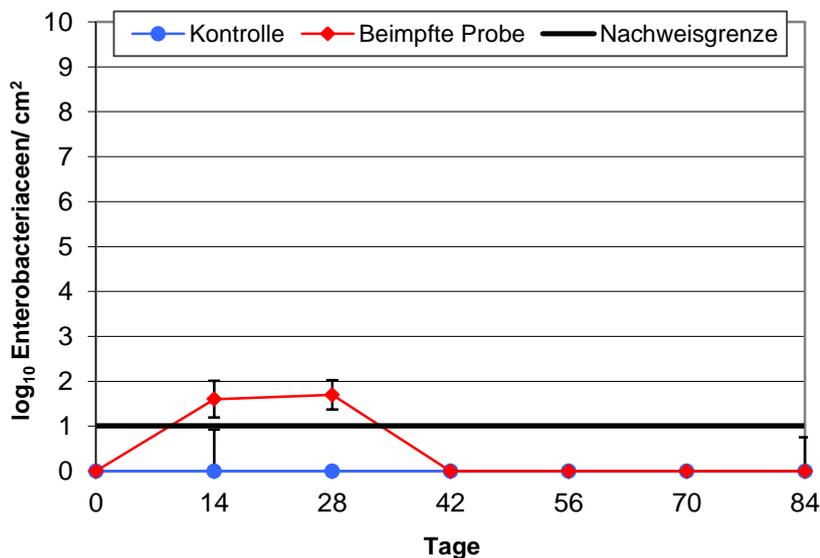


Abbildung 35: Verlauf der Keimzahl der Enterobacteriaceen der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Candida* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²)

Enterobacteriaceen ließen sich nur an den Tagen 14 und 28 bei den beimpften Fleischproben in Keimzahlen von 40 KbE/cm² ($1,6 \log^{10}$ KbE/cm²) und 50 KbE/cm² ($1,7 \log^{10}$ KbE/cm²) nachweisen. Die Enterobacteriaceenzahl lag über den gesamten Zeitraum bei den Kontrollproben unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze (Abbildung 35).

Die *Candida* spp. wurden in einer Konzentration von $2,0 \times 10^2$ KbE/cm² ($2,3 \log^{10}$ KbE/cm²) auf das Fleisch aufgeimpft. Anschließend stieg die Keimzahl bis zum Tag 42 auf $2,1 \times 10^6$ KbE/cm² ($6,3 \log^{10}$ KbE/cm²) und blieb auf diesem Niveau. Am Tag 84 war eine Keimzahl von $3,3 \times 10^6$ KbE/cm² ($6,5 \log^{10}$ KbE/cm²) zu ermitteln. In den Negativkontrollen wurden bis zum Tag 84 keine Hefen nachgewiesen (Abbildung 36).

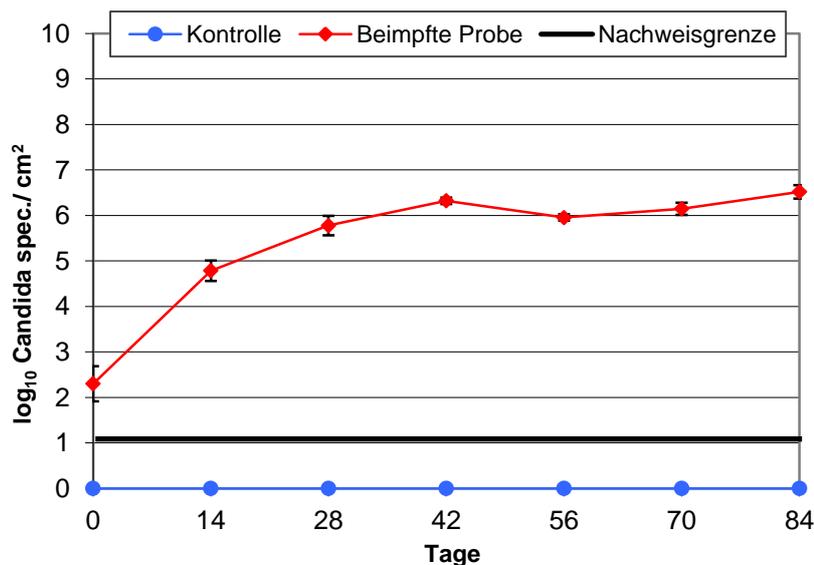


Abbildung 36: Verlauf der Keimzahl der Hefen der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Candida* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²)

4.4.1.3 Sensorische Beurteilung

Ab der fünften Lagerwoche waren bei einigen beimpften Proben Gasblasen zu beobachten. Das Volumen der Gasblasen nahm bis zum Ende der Lagerzeit noch

zu (Abbildung 37). Die Gasbildung wurde als mittelgradig bewertet. Einzelne Kontrollproben zeigten ab Woche 10 ebenfalls kleine Gasbläschen.

Die Farbe des Fleischsaftes veränderte sich sowohl bei den beimpften Proben als auch bei den Kontrollproben von rötlich bis hin zu einer dunkelroten bis rotbraunen Farbe (Abbildung 37).

Im Laufe der Lagerzeit entwickelte sich bei beimpften und unbeimpften Proben ein säuerlicher Geruch. Die beimpften Proben rochen jedoch ab Lagerwoche 8 zunehmend muffiger. Am Ende der Lagerzeit konnte zudem ein fruchtiger, alkoholischer Geruch wahrgenommen werden. Es konnte auch eine leicht säuerliche Geschmacksabweichung der Proben nach dem Kochen ermittelt werden.

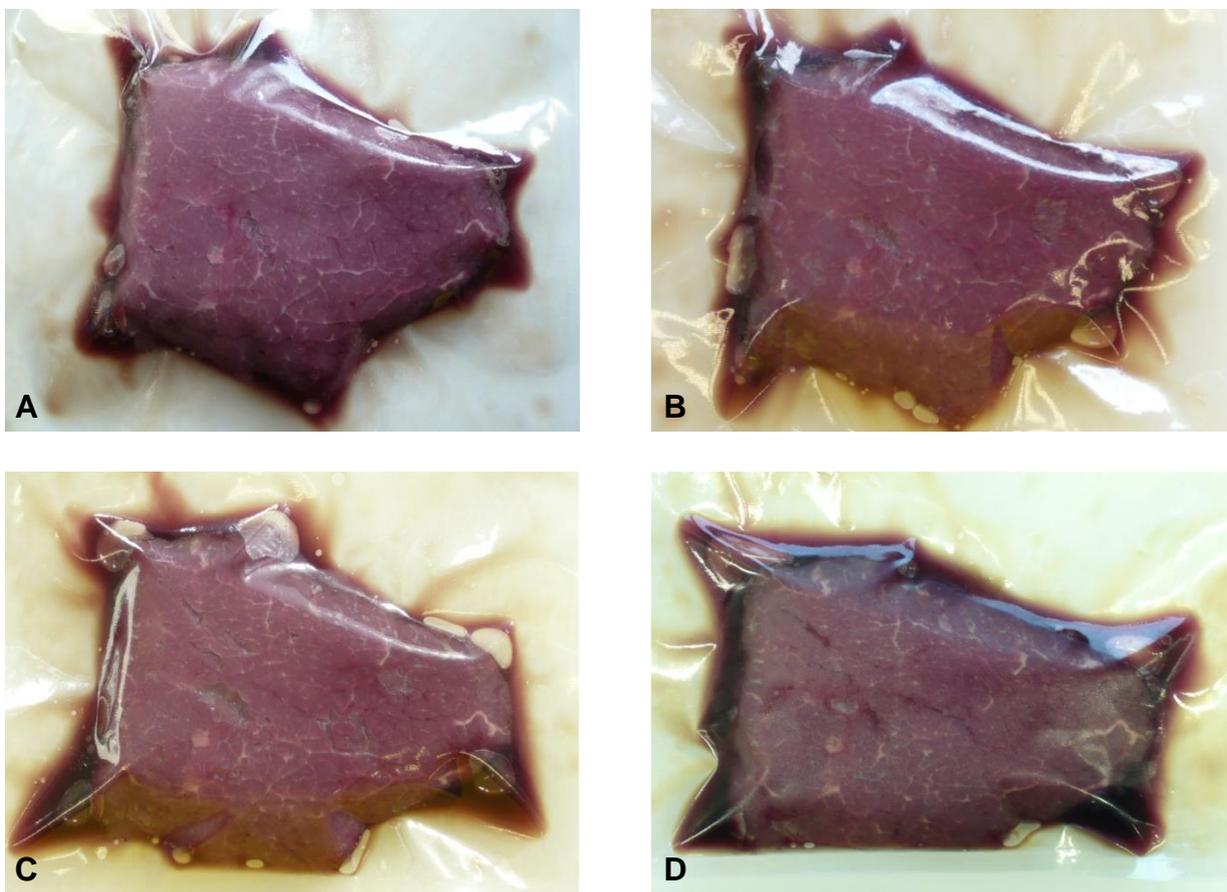


Abbildung 37: Veränderung der Fleisch- und Tropfsaftfarbe sowie die Gasbildung der vakuumverpackten und mit *Candida* spp. beimpften Rindfleischproben in Woche 5 (A), 6 (B), 8 (C) und 12 (D) bei einer Lagerung über 12 Wochen bei + 2 °C

4.4.2 Challengeversuche mit *Mrakia* spp.

4.4.2.1 Physikalisch-chemische Parameter

Der pH-Wert der beimpften Proben fiel von 5,65 am Tag 0 auf 5,32 am Tag 42. Anschließend stieg dieser bis Tag 84 auf 5,48 an.

Die pH-Wertentwicklung der Kontrollproben verlief bis Tag 42 analog, wobei der Ausgangswert von 5,8 auf 5,44 sank. An Tag 56 lag der Wert bei 5,65 und fiel bis zum Versuchsende wieder auf 5,4 (Abbildung 38).

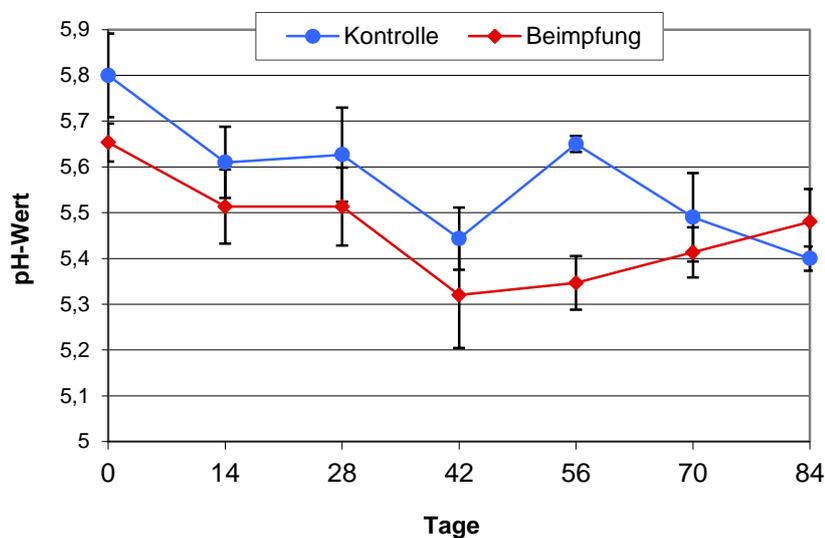


Abbildung 38: Verlauf der pH-Werte der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Mrakia* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung)

Der a_w -Wert-Verlauf zeigte innerhalb der 84 Tage einen kontinuierlichen Abfall von 0,9889 bei den beimpften Proben auf einen Endwert von 0,9858 am Tag 84.

Bei den Kontrollen nahm der a_w -Wert von 0,9883 am Tag 0 auf 0,9865 am Tag 84 ab (Abbildung 39).

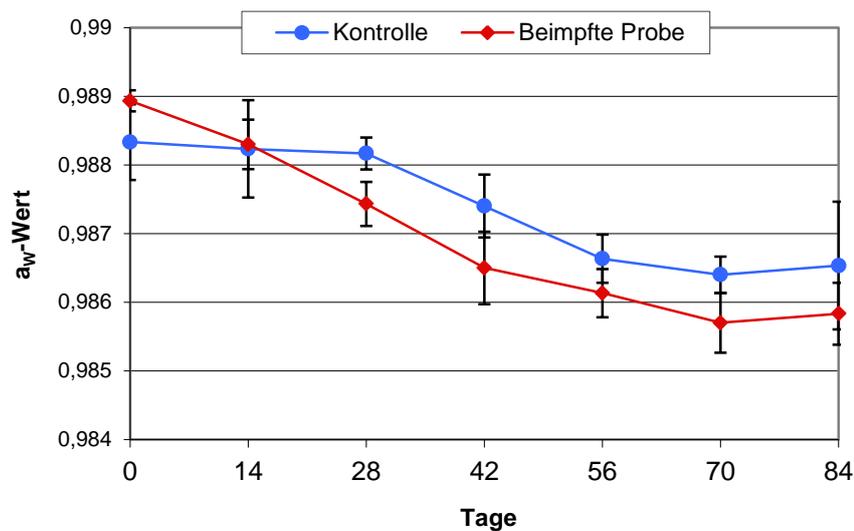


Abbildung 39: Verlauf der a_w -Werte der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Mrakia* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung)

4.4.2.2 Mikrobiologische Parameter

Am Tag 0 lagen die Werte für die aerobe, mesophile Keimzahl der beimpften und unbeimpften Proben unterhalb von 10 KbE/cm^2 ($1,0 \log^{10} \text{ KbE/cm}^2$).

Bis zum Tag 14 stieg die Keimzahl der beimpften Proben auf $7,0 \times 10^3 \text{ KbE/cm}^2$ ($3,8 \log^{10} \text{ KbE/cm}^2$) und erreichte im Versuchsverlauf am Tag 84 einen Wert von $5,7 \times 10^7 \text{ KbE/cm}^2$ ($7,8 \log^{10} \text{ KbE/cm}^2$) bei den beimpften Proben.

In den Kontrollen wurde am Tag 28 eine Keimzahl von $8,0 \times 10^3 \text{ KbE/cm}^2$ ($3,9 \log^{10} \text{ KbE/cm}^2$) nachgewiesen. Diese stieg bis Tag 56 auf $6,4 \times 10^6 \text{ KbE/cm}^2$ ($6,8 \log^{10} \text{ KbE/cm}^2$) und erreichte am Tag 84 $1,0 \times 10^7 \text{ KbE/cm}^2$ ($7,0 \log^{10} \text{ KbE/cm}^2$) (Abbildung 40).

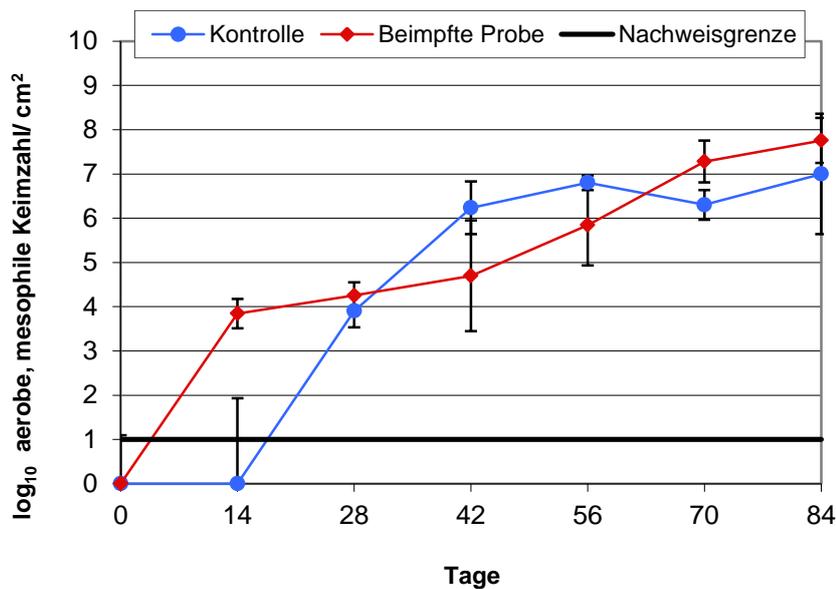


Abbildung 40: Verlauf der aeroben, mesophilen Keimzahl der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Mrakia* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²)

Die Keimzahl der Milchsäurebakterien bei den beimpften Fleischstücken lag am Tag 0 unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze. Sie nahm bis auf einen Wert von $6,5 \times 10^3$ KbE/cm² ($3,8 \log^{10}$ KbE/cm²) am Tag 14 zu und erreichte am Tag 42 Werte von $4,0 \times 10^4$ KbE/cm² ($4,6 \log^{10}$ KbE/cm²). Anschließend stieg die Keimzahl bis Tag 84 auf $8,1 \times 10^7$ KbE/cm² ($7,9 \log^{10}$ KbE/cm²).

Bei Versuchsbeginn zeigten die Kontrollproben bei den Milchsäurebakterien Keimzahlen von 30 KbE/cm² ($1,5 \log^{10}$ KbE/cm²). Im Anschluss daran stiegen sie auf $4,7 \times 10^5$ KbE/cm² ($5,7 \log^{10}$ KbE/cm²) am Tag 42 und bis Tag 84 auf einen Endwert von $2,5 \times 10^6$ KbE/cm² ($6,4 \log^{10}$ KbE/cm²) an (Abbildung 41).

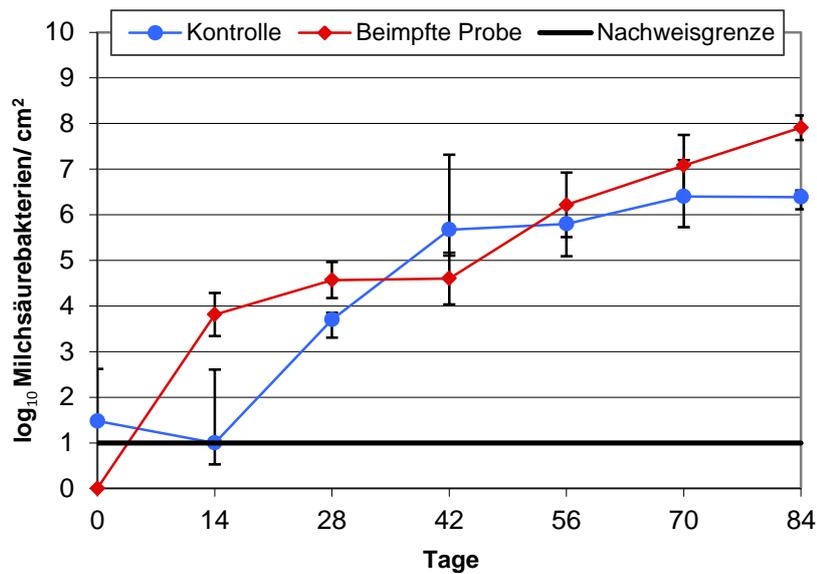


Abbildung 41: Verlauf der Keimzahl der Milchsäurebakterien der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Mrakia* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²)

Enterobacteriaceen wurden in beiden Ansätzen bis zum Tag 42 nicht nachgewiesen. An den Tagen 70 und 84 wiesen die beimpften Proben Enterobacteriaceen in Höhe von $1,0 \times 10^2$ ($2,0 \log^{10}$ KbE/cm²) und $1,0 \times 10^3$ KbE/cm² ($3,0 \log^{10}$ KbE/cm²) auf.

Auf den Kontrollproben wurde am Tag 56 eine Enterobacteriaceenzahl von 20 KbE/cm² ($1,3 \log^{10}$ KbE/cm²) festgestellt (Abbildung 42).

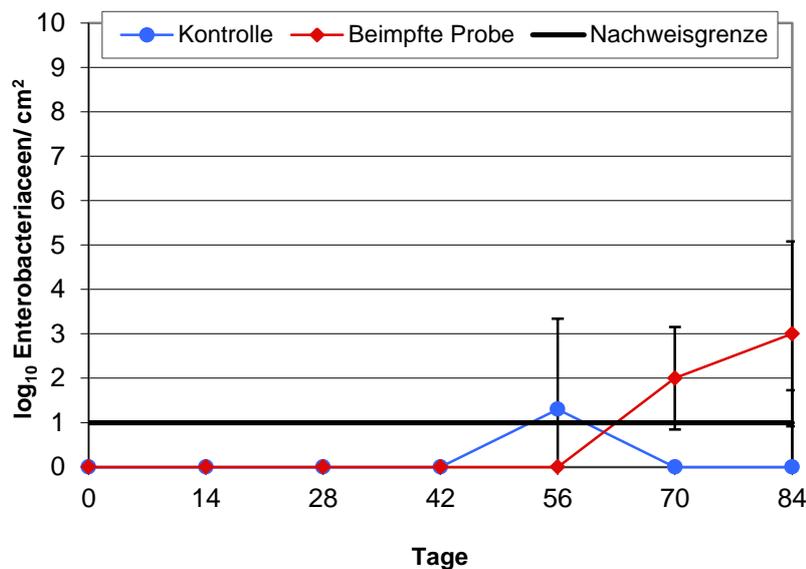


Abbildung 42: Verlauf der Keimzahl der Enterobacteriaceen der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Mrakia* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²)

Die Hefenanzahl lag bei den Negativkontrollen bis zum Tag 70 unterhalb der Nachweisgrenze von 10 KbE/cm² (1,0 log¹⁰ KbE/cm²). Am Tag 84 wurde ein Wert von 10 KbE/cm² (1,0 log¹⁰ KbE/cm²) festgestellt.

Bei den beimpften Proben stiegen die Werte von 80 KbE/cm² (1,9 log¹⁰ KbE/cm²) am Tag 0 auf Hefezahlen von 3,5 x 10³ KbE/cm² (3,5 log¹⁰ KbE/cm²) am Tag 28. Die Hefezahlen blieben ab diesem Tag relativ konstant, so dass am Tag 84 ein Wert von 1,0 x 10³ KbE/cm² (3,0 log¹⁰ KbE/cm²) nachweisbar war (Abbildung 43).

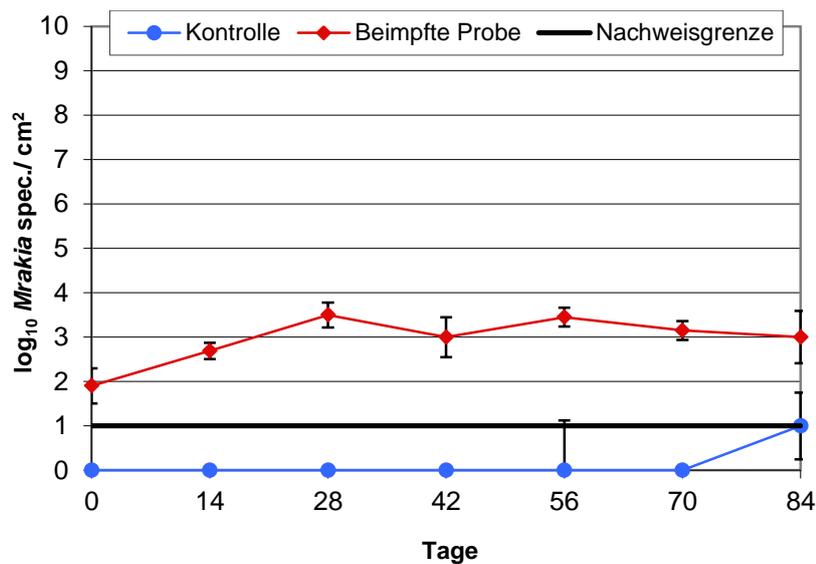


Abbildung 43: Verlauf der Keimzahl der Hefen der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Mrakia* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²)

4.4.2.3 Sensorische Beurteilung

Der fleischtypische Geruch aller Proben bekam ab der Hälfte der Versuchszeit eine leicht säuerliche Komponente. Vereinzelt wurden in beiden Probenansätzen auch kleine, einzelne Gasbläschen entdeckt. Sowohl in den beimpften, als auch in den unbeimpften Proben verfärbte sich der Tropfsaft rotbraun (Abbildung 44).

Es konnte gegen Ende der Lagerzeit ein säuerlicher, leicht hefiger Geruch bei den beimpften Proben wahrgenommen werden. Ein eindeutiger Verderbsgeruch konnte zu keiner Zeit festgestellt werden. Auch bei der Verkostung gab es keine abweichenden Befunde.

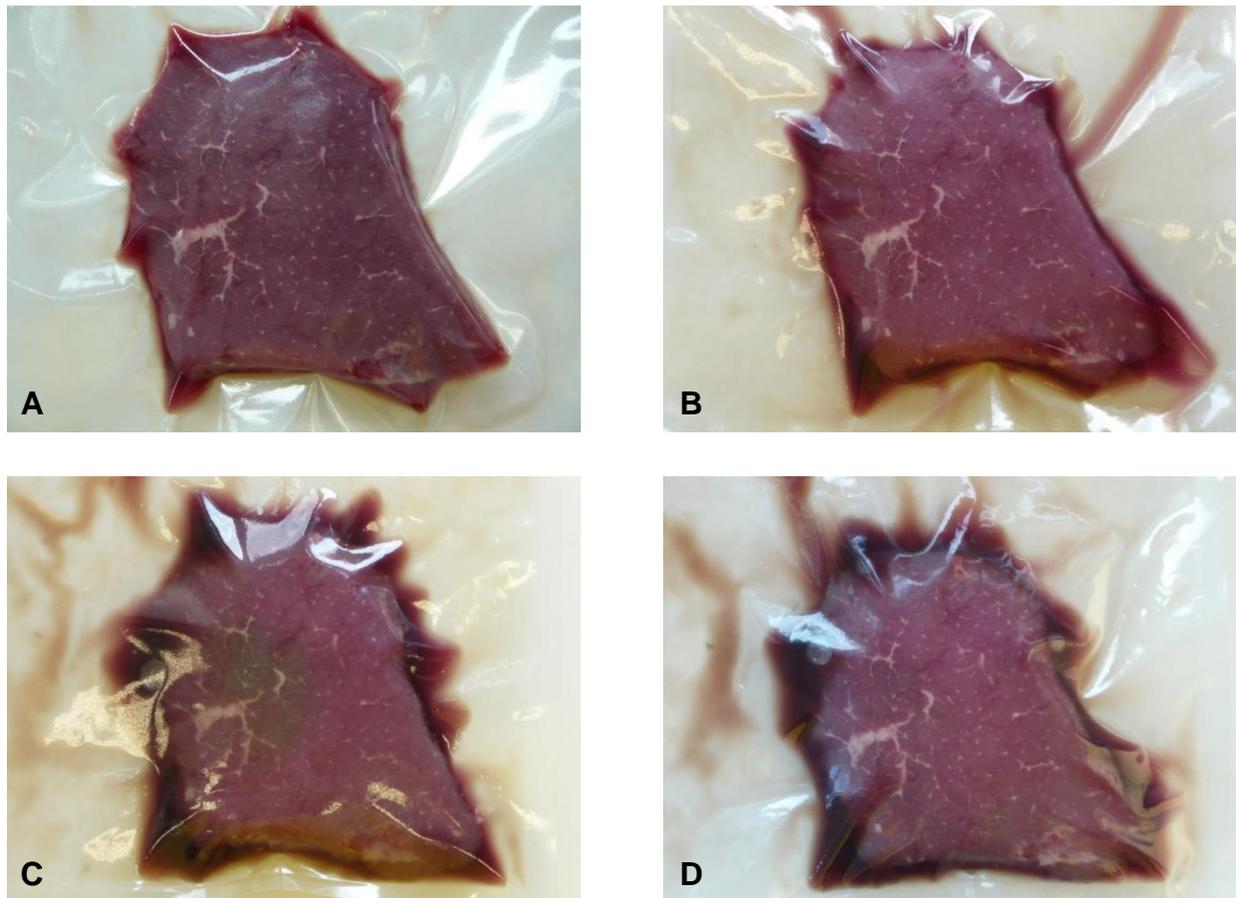


Abbildung 44: Veränderung der Fleisch- und Tropfsaftfarbe sowie die Gasbildung der vakuumverpackten und mit *Mrakia* spp. beimpften Rindfleischproben in Woche 0 (A), 4 (B), 8 (C) und 12 (D) bei einer Lagerung über 12 Wochen bei + 2 °C

4.4.3 Challengeversuche mit *Kazachstania* spp.

4.4.3.1 Physikalisch-chemische Parameter

Der Ausgangswert lag bei den beimpften Proben bei einem pH-Wert von 5,6. Der pH-Wert der beimpften Proben nahm bis Tag 28 auf Werte von 5,22 ab. Am Tag 70 wurden Werte von 5,34 und am Tag 84 Werte von 5,28 gemessen.

Am Tag 0 betrug der pH-Wert der Kontrollen 5,61. Bis zum Tag 14 stieg dieser auf 5,65 und sank anschließend bis Tag 56 auf 5,31. Der Wert der Kontrolle lag am Versuchsende am Tag 84 bei 5,4 (Abbildung 45).

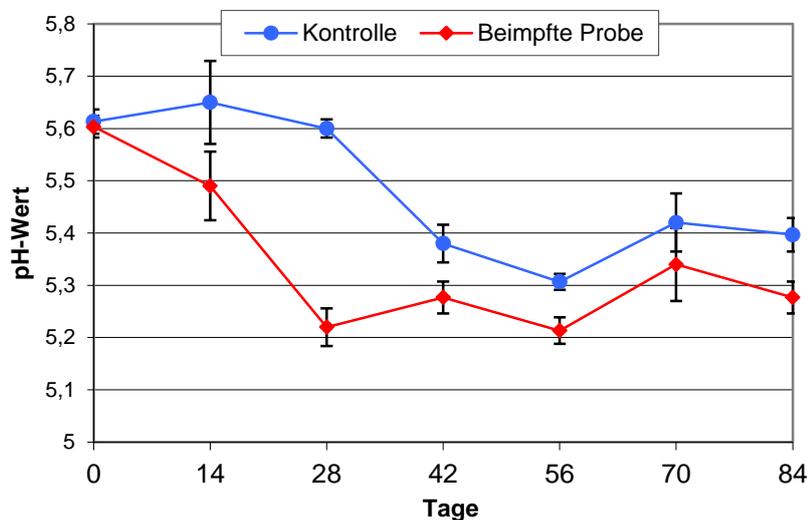


Abbildung 45: Verlauf der pH-Werte der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Kazachstania* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung)

Der a_w -Wert zu Beginn war bei beimpften und unbeimpften Proben 0,9893. Bei den beimpften Proben sank der Wert auf 0,9866 am Tag 28. Anschließend nahm dieser weiter ab und erreichte am Tag 56 Werte von 0,9855 und am Tag 84 Werte von 0,9856. In den Kontrollproben wurden am Tag 28 a_w -Werte von 0,9883 und am Tag 56 Werte von 0,9861 gemessen. Am letzten Untersuchungstag war in diesen Proben ein Wert von 0,9852 nachweisbar (Abbildung 46).

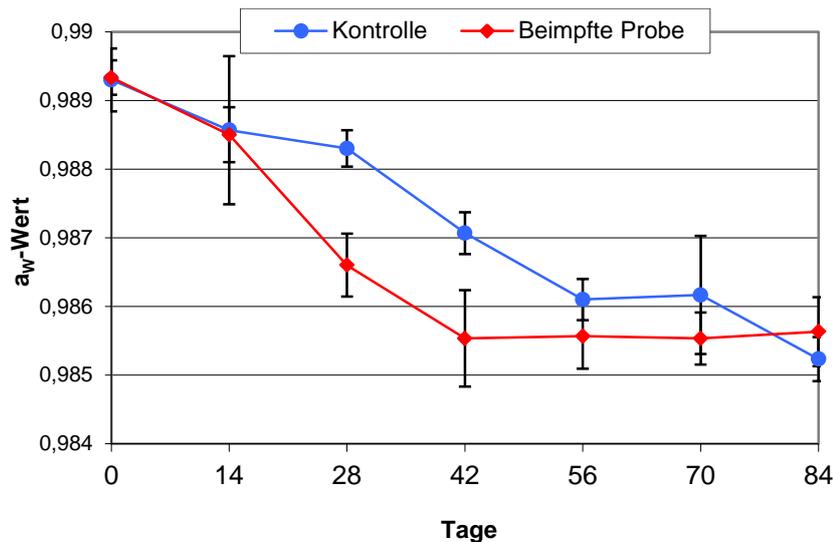


Abbildung 46: Verlauf der a_w -Werte der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Kazachstania* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung)

4.4.3.2 Mikrobiologische Parameter

Die aerobe, mesophile Keimzahl der beimpften Proben lag zu Versuchsbeginn unterhalb der Nachweisgrenze von 10 KbE/cm^2 ($1,0 \log^{10} \text{ KbE/cm}^2$). Bis zum Tag 28 nahm diese zu und erreichte Werte von $9,2 \times 10^5 \text{ KbE/cm}^2$ ($5,9 \log^{10} \text{ KbE/cm}^2$) am Tag 28 und blieb anschließend auf diesem Niveau. Am Ende der Lagerdauer am Tag 84 wurde ein Wert von $4,6 \times 10^6 \text{ KbE/cm}^2$ ($6,7 \log^{10} \text{ KbE/cm}^2$) nachgewiesen.

Bei den Kontrollen stieg die mesophile, aerobe Keimzahl von 20 KbE/cm^2 ($1,3 \log^{10} \text{ KbE/cm}^2$) zu Versuchsbeginn bis zum Tag 28 auf $8,0 \times 10^4 \text{ KbE/cm}^2$ ($4,9 \log^{10} \text{ KbE/cm}^2$) an. Bis zum Tag 84 nahm die Zellzahl auf $4,8 \times 10^6 \text{ KbE/cm}^2$ ($6,7 \log^{10} \text{ KbE/cm}^2$) zu (Abbildung 47).

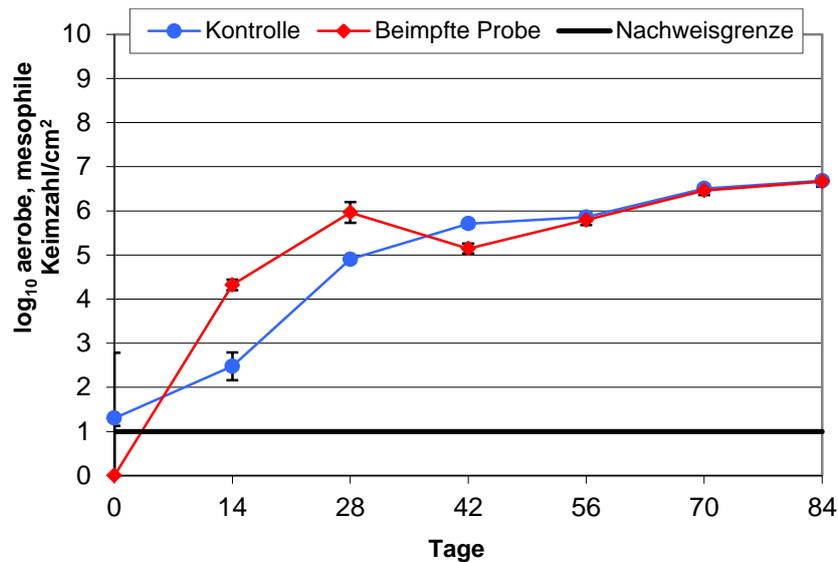


Abbildung 47: Verlauf der aeroben, mesophilen Keimzahl der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Kazachstania* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei +2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²)

Die Anzahl der Milchsäurebakterien lag am Tag 0 in den beimpften Proben und Kontrollproben unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze von 10 KbE/cm² (1,0 log¹⁰ KbE/cm²).

Die Keimzahl der inokulierten Proben stieg auf 7,2 x 10⁵ KbE/cm² (5,9 log¹⁰ KbE/cm²) am Tag 28. Bis zu Tag 84 erhöhte sich der Wert auf 2,0 x 10⁶ KbE/cm² (6,3 log¹⁰ KbE/cm²).

Die unbeimpften Fleischstücke zeigten einen Anstieg der Milchsäurebakterien auf 8,1 x 10⁴ KbE/cm² (4,9 log¹⁰ KbE/cm²) am Versuchstag 28 und 2,9 x 10⁶ KbE/cm² (6,5 log¹⁰ KbE/cm²) am Tag 84 (Abbildung 48).

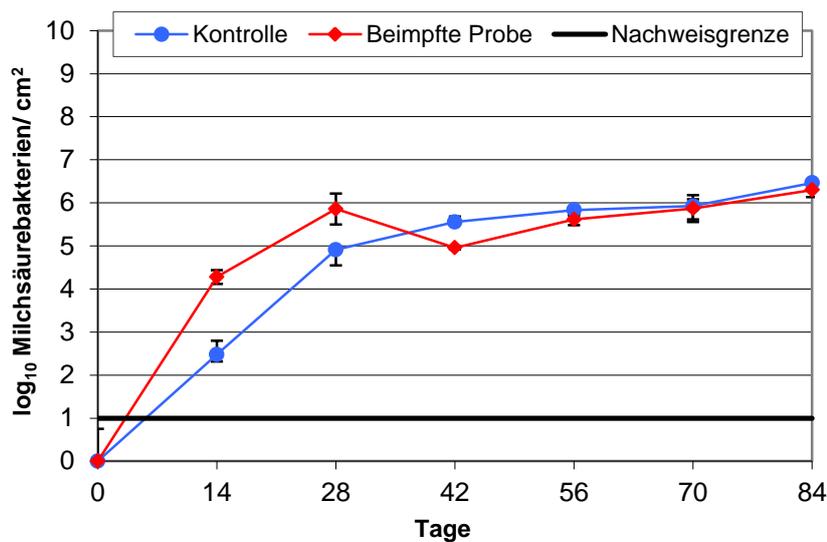


Abbildung 48: Verlauf der Keimzahl der Milchsäurebakterien der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Kazachstania* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²)

Die Zahl der Enterobacteriaceen verlief bei beiden Ansätzen analog und lag am Tag 0 unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze.

Die Keimzahl stieg am Tag 28 bei den beimpften Proben auf $1,1 \times 10^2$ KbE/cm² ($2,0 \log^{10}$ KbE/cm²) und bei den unbeimpften Proben auf $3,0 \times 10^2$ KbE/cm² ($2,5 \log^{10}$ KbE/cm²) an.

Der Wert fiel am Tag 42 bei beiden Versuchsansätzen auf 10 KbE/cm² ($1,0 \log^{10}$ KbE/cm²) und stieg bis Tag 84 auf eine Keimzahl von $3,9 \times 10^3$ KbE/cm² ($3,6 \log^{10}$ KbE/cm²) in den beimpften und auf $6,4 \times 10^3$ KbE/cm² ($3,8 \log^{10}$ KbE/cm²) bei den Kontrollen (Abbildung 49).

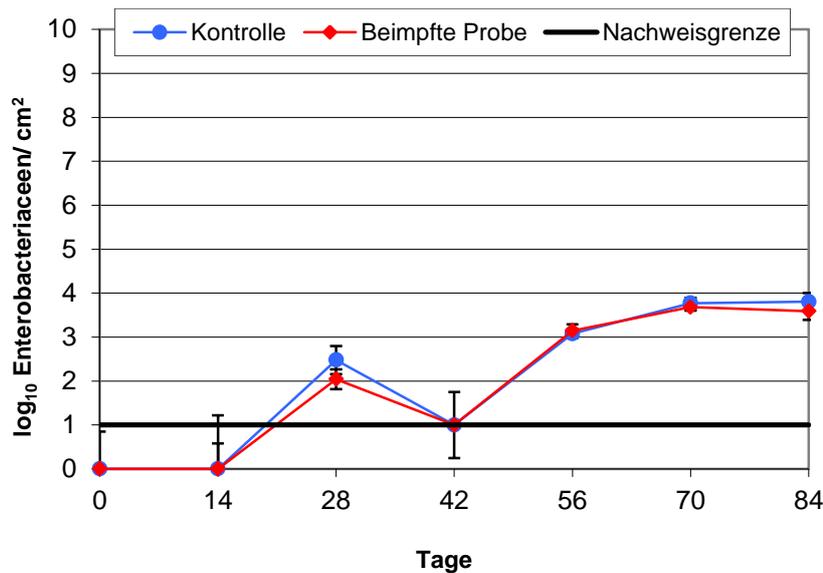


Abbildung 49: Verlauf der Keimzahl der Enterobacteriaceen der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Kazachstania* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²)

Der Anfangswert von *Kazachstania* spp. bei dem beimpften Fleischproben lag zu Beginn bei 60 KbE/cm² (1,8 log¹⁰ KbE/cm²). Die Hefenzahl stieg auf 2,9 x 10⁶ KbE/cm² (6,5 log¹⁰ KbE/cm²) an Versuchstag 28 an und blieb auf diesem Niveau. Der Endwert am Tag 84 lag bei 3,1 x 10⁶ KbE/cm² (6,5 log¹⁰ KbE/cm²).

In den unbeimpften Proben wurden Hefen nur am Tag 70 mit 10 KbE/cm² (1,0 log¹⁰ KbE/cm²) nachgewiesen (Abbildung 50).

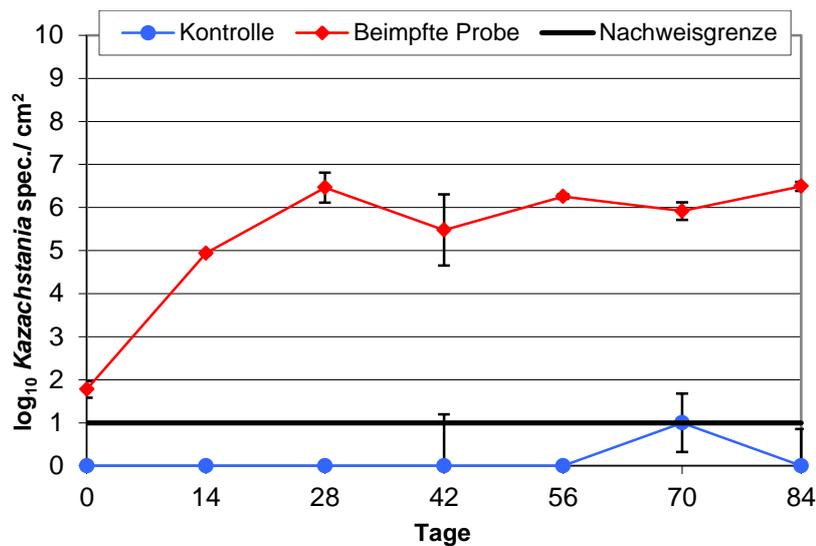


Abbildung 50: Verlauf der Keimzahl der Hefen der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Kazachstania* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²)

4.4.3.3 Sensorische Beurteilung

Ab Lagerwoche 4 zeigten die beimpften Proben eine Gasbildung, welche als mittelgradig eingestuft wurde (Abbildung 51).

Der anfänglich typische Fleischreifegeruch ging bei den Kontrollproben während der Lagerzeit in einen säuerlichen Altgeruch über. Bei den beimpften Proben hingegen ging der Reifegeruch schon ab der zweiten Lagerwoche in einen zunehmend säuerlichen und deutlich muffig-dumpfen Geruch über.

Die Farbe des Fleisches und des Fleischsaftes der beimpften Proben wurden zunehmend grünlicher (Abbildung 51).

Bei der Verkostung der Kochprobe konnten geschmackliche Abweichungen festgestellt werden.

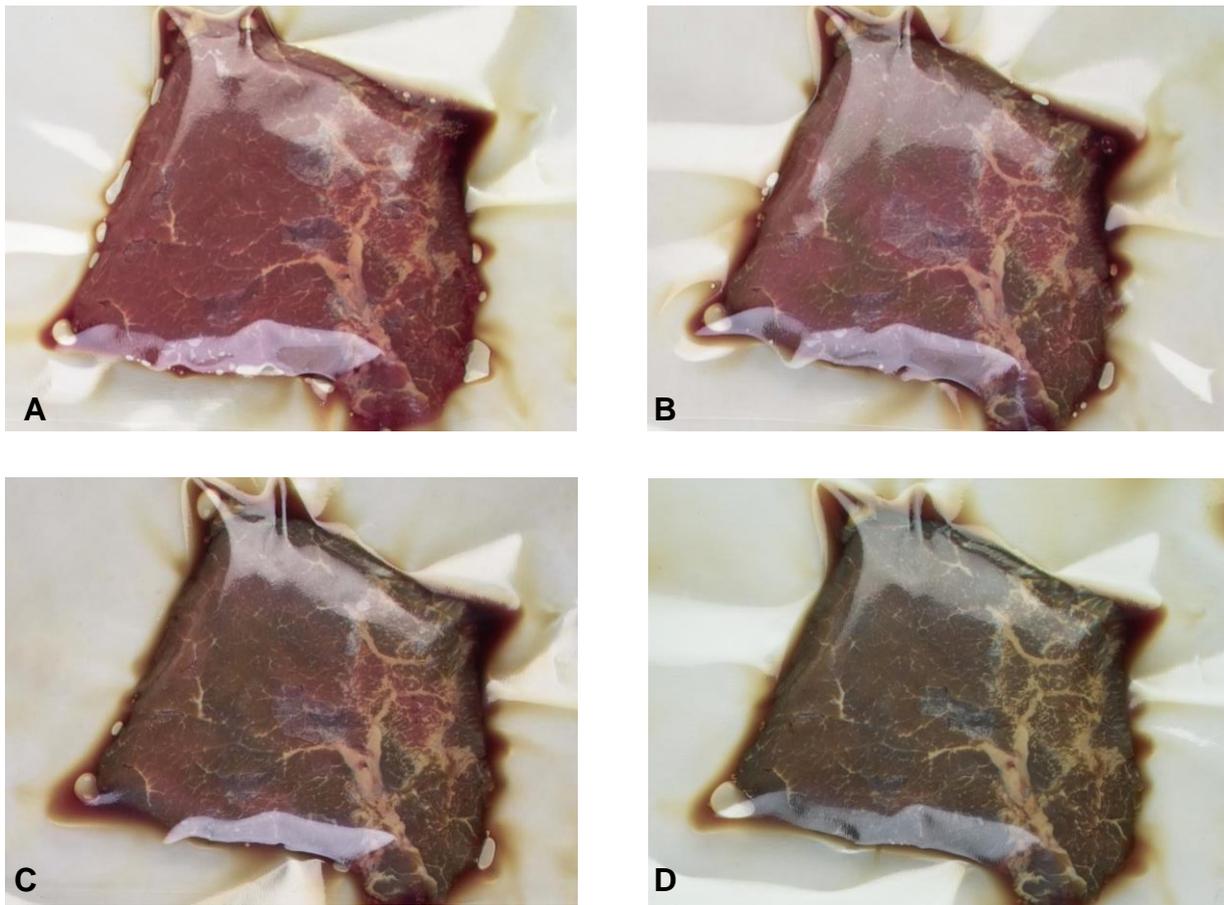


Abbildung 51: Veränderung der Fleisch- und Tropfsaftfarbe sowie die Gasbildung der vakuumverpackten und mit *Kazachstania* spp. beimpften Rindfleischproben in Woche 4 (A), 6 (B), 8 (C) und 12 (D) bei einer Lagerung über 12 Wochen bei + 2 °C

4.4.4 Zusammenfassung der Challengeversuche

Bei der Ausgangskeimzahl am Tag 0 waren in allen Challengeversuchen sehr geringe Keimzahlen nachzuweisen. Somit war es durch die Vorbereitung der Probenstücke (Kapitel 3.2.4.2) gelungen, eine keimarme Oberfläche herzustellen. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass die aufgeimpften Hefen möglichst wenig durch andere Keime beeinflusst wurden.

Es traten keine markanten Unterschiede im Verlauf der pH- und a_w -Werte auf. Auch die Entwicklung der aeroben, mesophilen Keimzahlen und der Keimzahlen der Milchsäurebakterien bei den beimpften und unbeimpften Proben verlief in den drei Challengeversuchen analog. Die Keimzahlen der Proben an Tag 0 waren sehr niedrig oder unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze. Somit konnte durch die Vorbereitung der Schwanzrollen für die Challengeversuche eine geringe Oberflächenkeimzahl der Probenstücke zu Beginn der Versuchszeit erreicht werden. Die Hefezahlen der beimpften Proben zu Beginn entsprachen der aufgeimpften Konzentration von 10^2 KbE/cm². Die sensorischen Veränderungen unterschieden sich bei den drei Challengeversuchen.

Bei der Beimpfung mit *Candida* spp. zeigten sich leichte Verderbserscheinungen, welche sich zum einen in einer mittelgradigen Gasbildung, zum anderen in einer Geruchsabweichung äußerten. Es wurde eine fruchtig-alkoholische geruchliche Veränderung der beimpften Proben nachgewiesen. Die Keimzahl der Hefen stieg in den beimpften Proben bis Tag 84 auf einen Wert von $3,3 \times 10^6$ KbE/cm² an.

Der Versuchsansatz mit *Mrakia* spp. zeigte die geringsten Abweichungen. Sowohl bei den beimpften Proben als auch bei den Kontrollproben traten überwiegend Veränderungen im Rahmen der Fleischalterung auf. Es zeigten sich vereinzelt kleine Gasblasen in Laufe der Lagerzeit. Die beimpften Proben besaßen gegen Ende der Lagerzeit einen leicht fruchtigen Geruch. Bis zum Tag 84 zeigte sich eine leichte Zunahme der Hefekeimzahl auf $1,0 \times 10^3$ KbE/cm².

Bei einer Beimpfung der Fleischstücke mit *Kazachstania* spp. zeigten sich hingegen deutliche Anzeichen von Verderb. Schon nach kurzer Zeit waren Veränderungen der Farbe, des Geruchs und eine mittelgradige Gasbildung wahrnehmbar. Die Probenstücke verfärbten sich zunehmend bräunlich und es entwickelte sich ein säuerlich-muffiger Geruch. Am Tag 84 wurde eine Keimzahl der Hefen von $3,1 \times 10^6$ KbE/cm² nachgewiesen.

4.5 Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln

4.5.1 Wirksamkeit auf glatten Schneidbrettern

Bei den glatten Schneidbrettern wurden ohne Anreicherung nur in einer Probe aus Pool III, die mit Antisept[®] A behandelt wurde, Hefen nachgewiesen. Bei der Behandlung mit sterilem Wasser waren alle Proben in Pool III und eine Probe in Pool IV positiv (Tabelle 18).

Tabelle 18: Wirksamkeit der ausgewählten Desinfektionsmittel gegenüber den unterschiedlichen Hefepools (Ansatz 1, 2, 3, 4, 5, 6), die auf Schneidbretter mit glatter Oberfläche aufgeimpft wurden (ohne Anreicherung)

Desinfektionsmittel	Pool I						Pool II						Pool III						Pool IV					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Antisept [®] 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antisept [®] A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antisept [®] PES 33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mucozit [®] B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Steril [®]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wasser	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
Wofasteril [®]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xyloquat [®] Plus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- = keine Hefen nachweisbar + = $1 - 10^2$ KbE/cm² ++ = $> 10^2$ KbE/cm²

Pool I: *Mrakia* spp.

Pool II: *Kazachstania* spp.

Pool III: *Candida* spp.; *Rhodotorula* spp.; *Filobasidium uniguttulatum*

Pool VI: *Candida* spp.; *Pichia* spp.

Nach der Anreicherung der Proben in Peptonwasser konnte die Behandlung mit sterilem Wasser nur bei je zwei Proben aus Pool II und IV eine vollständige Entfernung der Hefen bewirken, wohingegen alle anderen positiv waren. Bei der Verwendung von Antisept[®] A, Ethanol und Wofasteril[®] ergab sich jeweils bei einer Probe aus Pool I und Pool III ein Nachweis von Hefen (Tabelle 19). Eine mit Antisept[®] 10 behandelte

Probe aus Pool I war ebenfalls positiv. In Pool IV waren vier Proben nach Behandlung mit Wofasteril nach der Anreicherung positiv.

Tabelle 19: Wirksamkeit der ausgewählten Desinfektionsmittel gegenüber den unterschiedlichen Hefepools (Ansatz 1, 2, 3, 4, 5, 6), die auf Schneidebretter mit glatter Oberfläche aufgeimpft wurden (nach 7 Tagen Anreicherung)

Desinfektionsmittel	Pool I						Pool II						Pool III						Pool IV					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Antisept[®] 10	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antisept[®] A	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Antisept[®]PES 33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mucozit[®] B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Steril[®]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wasser	+	+	++	+	++	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	++	++	++	+	-	+	+	+	-
Wofasteril[®]	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+
Xyloquat[®] Plus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- = keine Hefen nachweisbar + = $1 - 10^2$ KbE/cm² ++ = $> 10^2$ KbE/cm²

Pool I: *Mrakia* spp.

Pool II: *Kazachstania* spp.

Pool III: *Candida* spp.; *Rhodotorula* spp.; *Filobasidium uniguttulatum*

Pool VI: *Candida* spp.; *Pichia* spp.

4.5.2 Wirksamkeit auf eingeritzten Schneidbrettern

Ohne Anreicherung gelang bei den eingeschnittenen Platten und der Desinfektion mit Antisept[®] A und Antisept[®] 10 in Pool I bei je einer Probe ein positiver Nachweis. Bei Pool III waren bei einer Probe nach der Behandlung mit Mucozit[®] B Hefen nachweisbar. Bei Verwendung von sterilem Wasser konnten von Pool I bei drei und von Pool II bei vier Proben keine Hefen mehr nachgewiesen werden. Bei Pool IV gelang die Entfernung von Hefen bei 5 Proben. In Pool III konnten nach der Reinigung mit Wasser in allen Proben Hefen nachgewiesen werden (Tabelle 20).

Tabelle 20: Wirksamkeit der ausgewählten Desinfektionsmittel gegenüber den unterschiedlichen Hefepools (Ansatz 1, 2, 3, 4, 5, 6), die auf Schneidebretter mit rauer Oberfläche aufgeimpft wurden (ohne Anreicherung)

Desinfektionsmittel	Pool I						Pool II						Pool III						Pool IV					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Antisept[®] 10	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antisept[®] A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antisept[®] PES 33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mucozit[®] B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Steril[®]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wasser	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
Wofasteril[®]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xyloquat[®] Plus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- = keine Hefen nachweisbar + = $1 - 10^2$ KbE/cm² ++ = $> 10^2$ KbE/cm²

Pool I: *Mrakia* spp.

Pool II: *Kazachstania* spp.

Pool III: *Candida* spp.; *Rhodotorula* spp.; *Filobasidium uniguttulatum*

Pool VI: *Candida* spp.; *Pichia* spp.

Nach der Anreicherung gelang bei Behandlung mit Antisept[®] A bei zwei Proben von Pool III und bei Mucozit[®] B bei zwei Proben von Pool I ein Nachweis von Hefen. Eine Probe aus Pool I war bei Antisept[®] PES 33 sowie eine Probe aus Pool III bei Steril[®] positiv auf Hefen. Wofasteril[®] zeigte bei je zwei Platten aus Pool III und drei Platten aus Pool IV keine vollständige Wirkung. Die Behandlung mit sterilem Wasser führte außer in einer Probe in Pool II bei allen Proben zu einem positiven Nachweis (Tabelle 21).

Tabelle 21: Wirksamkeit der ausgewählten Desinfektionsmittel gegenüber den unterschiedlichen Hefepools (Ansatz 1, 2, 3, 4, 5, 6), die auf Schneidebretter mit rauer Oberfläche aufgeimpft wurden (nach 7 Tagen Anreicherung)

Desinfektionsmittel	Pool I						Pool II						Pool III						Pool IV					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Antisept[®] 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antisept[®] A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Antisept[®] PES 33	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mucozit[®] B	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Steril[®]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wasser	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+++	+	+
Wofasteril[®]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Xyloquat[®] Plus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- = keine Hefen nachweisbar + = $1 - 10^2$ KbE/cm² ++ = $> 10^2$ KbE/cm²

Pool I: *Mrakia* spp.

Pool II: *Kazachstania* spp.

Pool III: *Candida* spp.; *Rhodotorula* spp.; *Filobasidium uniguttulatum*

Pool VI: *Candida* spp.; *Pichia* spp.

4.5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Alle verwendeten Desinfektionsmittel wiesen eine gute Wirksamkeit gegenüber Hefen auf. Auch nach Anreicherung waren nur in einzelnen Proben noch Hefen nachweisbar. Die Reinigung der glatten Plättchen ist im Vergleich zu den Plättchen mit rauer Oberfläche einfacher und der Desinfektionsmitteleinsatz war effektiver.

5 Diskussion

Hefen spielen in der Lebensmittelherstellung in vielerlei Hinsicht eine wichtige Rolle. So besitzen sie in der Herstellung von alkoholischen Getränken wie Bier und Wein eine entscheidende Funktion als Starterkulturen für die notwendigen Gärprozesse. Durch die anaerobe Verstoffwechslung der vorliegenden Kohlenhydrate bilden sie den erwünschten Alkohol. Auch bei Milchprodukten oder eingelegten und fermentierten Lebensmitteln, wie beispielsweise Gemüse und Früchten, sind unter anderem Hefen mit den zugehörigen, ablaufenden Stoffwechselprozessen an der Ausbildung von Aroma- und Geschmacksstoffen beteiligt. Im Gegensatz dazu können einige Spezies zu einem Verderb von Lebensmitteln führen. Vor allem Lebensmittel tierischen Ursprungs bieten den Hefen eine gute Lebensgrundlage. Die sensorische Veränderung der Farbe, des Geruchs und eine Gasbildung beruht auf der Verstoffwechslung von Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten und wird als Verderb beurteilt (Deàk, 2008; Diriye et al., 1993; Fleet, 1992; Ismail et al., 2000; Loureiro und Querol, 1999).

Im Bereich der Schlachtung treten Hefen als Kontaminationen auf. Die in der Literatur erwähnten, auf Fleisch vorkommenden Hefespezies ähneln sehr stark der Population, welche auch in den Schlacht- und Verarbeitungsräumen gefunden wurde. Es kommen auf unterschiedlichen Fleischarten regelmäßig psychrotolerante Hefen wie *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Debaryomyces* spp., *Rhodotorula* spp. und *Trichosporon* spp. vor (Asefa et al., 2009; Baxter und Illston, 1976 und 1977; Dalton et al., 1984; Deàk, 2008; Dillon et al., 1991; Dillon und Board, 1991; Diriye et al., 1993; Ismail et al., 2000 und 2006; Lowry und Gill, 1984; Nielsen et al., 2008; Phaff et al., 1966; Simoncini et al., 2007; Viljoen et al., 1998; siehe auch Kapitel 2.3.2.2).

Über das Vorkommen von psychrotoleranten Hefen auf vakuumverpacktem Fleisch finden sich sehr wenige Studien. In einer Untersuchung von vakuumverpacktem Rindfleisch wurde durch Sequenzierung der isolierten Hefen *Candida sake*, *Candida zeylanoides*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus laurentii*, *Debaryomyces* erstmals ein Vorkommen von *Mrakia* spp. auf Fleisch nachgewiesen (Kabisch et al., 2010). Die Gattung *Mrakia* wurde bis dahin in Gletschereis und Schmelzwasser detektiert (De Garcia et al., 2007; Turchetti et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden Rind-, Wild-, Lamm- und Straußenfleischproben lichtmikroskopisch und mikrobiologisch auf das Vorkommen von psychrotoleranten Hefen untersucht. Die isolierten Hefen wurden durch spektrometrische, biochemische und molekularbiologische Methoden genauer identifiziert.

Bei den Tropfsaftuntersuchungen der Marktstudienproben mittels Lichtmikroskopie wurden in acht Proben Hefen detektiert. Damit wurde im Tropfsaft ein erster Hinweis auf das Vorkommen von Hefen gefunden. Neben den genannten Proben wurden in weiteren, mikroskopisch unauffälligen Proben Hefen in geringen Keimzahlen festgestellt.

In vakuumverpacktem Rind-, Straußen- und Lammfleisch wurden in vorherigen Studien schon Hefen nachgewiesen (Alonso-Calleja et al., 2004; Kabisch et al., 2010; Patterson und Gibbs, 1978). Die mikrobiologischen Untersuchungen der Marktstudie bestätigen, dass psychrotolerante Hefen häufig auf vakuumverpacktem Fleisch zu finden sind. Es wurden auf 13 Proben bei einer Inkubationstemperatur von + 4 °C Hefen isoliert. Es war somit über ein Drittel der gesamten Proben mit psychrotoleranten Hefen besiedelt. Aufgegliedert in die einzelnen Fleischarten konnten bei 6 Rindfleisch-, 6 Wildfleisch- und bei einer Straußenfleischprobe psychrotolerante Hefen nachgewiesen werden. Über einen Nachweis von psychrotoleranten Hefen auf vakuumverpacktem Wildfleisch gab es bisher keine Angaben in der Literatur. Die Herkunft des positiven Fleisches war bei elf Proben aus Deutschland. Eine positive Probe (Strauß) stammte aus Südafrika sowie eine Rindfleischprobe aus den USA. Teils werden hohe Keimzahlen bis 10^8 KbE/cm² erreicht. Um eine Aussage über die Häufigkeit des Vorkommens von Hefen auf den verschiedenen Fleischsorten auch in Bezug auf die Herkunft des Fleisches zu treffen, müssten in weiteren Untersuchungen eine größere Probenanzahl analysiert werden.

Die isolierten Hefen konnten anhand ihrer Koloniemorphologie auf drei verschiedenen Nährböden (GYP, MEA⁺ und YGC) in 18 Gruppen unterteilt werden. Die Einteilung erfolgte zunächst nach Farbe, Größe, Form, Rand, Profil, Oberfläche und Konsistenz der Kolonien. Mittels FTIR wurden anschließend die Isolate der einzelnen Gruppen analysiert und miteinander verglichen. Dabei konnte zunächst die morphologische Gruppeneinteilung bestätigt werden. Auch durch die Licht- und Elektronenmikroskopie der Isolate konnten morphologische Unterschiede bezüglich der Zellform und der Sprossung ermittelt werden. Allerdings ist eine mikroskopische Differenzie-

rung der Isolatgruppen anhand der Zellmorphologie analog der Koloniemorphologie auf unterschiedlichen Nährböden nicht möglich.

Mittels FTIR wurden zunächst acht Isolatgruppen eindeutig identifiziert (*Candida sake*, *Candida zeylanoides*, *Cryptococcus curvatus*, *Debaryomyces hansenii*, *Filobasidium uniguttulatum*, *Pichia fermentans*, *Rhodotorula glutinis* und *mucilaginosa*). Diese Identifizierung konnte auch durch die folgende Sequenzierung bestätigt werden. Die Isolatgruppen 1, 2 und 3 konnten durch das FTIR als *Candida* spp. identifiziert werden. Die Isolatgruppe 6 konnte der Gattung *Cryptococcus* und die Isolatgruppe 14 der Gattung *Mrakia* zugeordnet werden. Vier Isolatgruppen (8, 9, 10 und 16) waren durch das FTIR nicht identifizierbar. Bei diesen Isolaten wurde eine eindeutige Identifizierung als *Candida alimentaria*, *Candida argentea*, *Candida galli*, *Cryptococcus carnescens*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Cystofilobasidium infirmioinatum*, *Cystofilobasidium macerans*, *Mrakia blollopsis* und *Rhodotorula creatinivora* erst durch eine Sequenzanalyse erbracht. Lediglich die Isolatgruppe 13 konnte auch hier nur als *Kazachstania* spp. identifiziert werden. Nach umfangreichen biochemischen Untersuchungen konnte diese Hefe als neue Spezies, *Kazachstania psychrophila* sp. nov., beschrieben werden (Kabisch et al., 2013).

Eine Speziesidentifizierung gelang somit weder durch die Koloniemorphologie auf den Nährböden noch durch die Zellmorphologie durch die Mikroskopie. Es waren dazu weitergehende Untersuchungen mittels FTIR, Sequenzanalyse und biochemischer Differenzierung notwendig. Das FTIR bot die Möglichkeit eine große Anzahl an Isolaten innerhalb von kurzer Zeit zu untersuchen (Wenning, 2002). Hierzu müssen jedoch zunächst möglichst viele isolierte psychrotolerante und psychrophile Hefen sowie bereits identifizierte Hefen aus Stammsammlungen mittels FTIR analysiert und in die Datenbank eingepflegt werden. Erst dann ist eine schnelle und zuverlässige Speziesidentifizierung möglich. Andernfalls müssen weitere umfangreiche biochemische und molekularbiologische Methoden durchgeführt werden. Um in Zukunft die Hefenpopulation in ihrer Gesamtheit zu erfassen und zu identifizieren, sollte eine Erweiterung der Datenbank für eine unkomplizierte und schnelle Methode wie das FTIR angestrebt werden.

Durch die Identifizierung der Isolate konnte zunächst das Vorkommen von Spezies bestätigt werden, welche laut Literatur auf Fleisch vorkommen. So fanden sich erwartungsgemäß (Kapitel 2.3.2.2) in den Proben der Marktstudie *Candida alimentaria*, *Candida galli*, *Candida sake*, *Candida zeylanoides*, *Cryptococcus carnescens*, *Cryp-*

tococcus curvatus, *Cystofilobasidium capitatum*, *Cystofilobasidium infirmoinatum*, *Cystofilobasidium macerans*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia fermentans*, *Rhodotorula creatinivora*, *Rhodotorula mucilaginosa* sowie *Rhodotorula glutinis* (Asefa et al., 2009; Baxter und Illston, 1976 und 1977; Dalton et al., 1984; Deàk, 2008; Dillon und Board, 1991; Fleet, 1992; Ismail et al., 2000 und 2006; Kabisch et al., 2010; Lowry und Gill, 1984; Nielsen et al. 2008; Péter et al., 2004; Viljoen et al., 1998).

Allerdings wurden auch Spezies gefunden, welche bis dahin noch nicht auf Fleisch nachgewiesen wurden. So wurden *Candida argentea*, *Filobasidium uniguttulatum* und *Mrakia blollopsis* identifiziert. *Candida argentea* wurde erstmals aus dem Sediment von Spülwasser in einem Bergwerk in Großbritannien isoliert und zeigt gegenüber osmotischem Stress, Säure und Metallen eine hohe Widerstandskraft (Holland et al., 2011). *Mrakia bollopsis* wurde bisher in kalten Habitaten wie Gletscherregionen nachgewiesen (Thomas-Hall et al., 2010).

Die Hefen der Isolatgruppe 13, welche mittels FTIR und Sequenzanalyse nicht eindeutig identifiziert wurden, konnten der Gattung *Kazachstania* zugeordnet werden. Diese Spezies wurde in drei Rindfleischproben aus Deutschland nachgewiesen.

Hefen der Gattung *Kazachstania* wurden vielfältig in der Umwelt gefunden. Auch im Lebensmittelbereich wurden sie schon im Zusammenhang mit fermentierten Milchprodukten und Traubenmost nachgewiesen. Ebenso konnten Hefen der Gattung *Kazachstania* in Silage und bei verschiedenen Tieren nachgewiesen werden (Bai et al., 2010; Chen et al., 2010; Lee et al., 2008; Lu et al., 2004; Nisiotou und Nychas, 2008).

Obwohl diese Spezies in vorliegender Arbeit mehrfach auf verschiedenen Proben nachgewiesen werden konnte, wurde diese Art bisher nicht beschrieben. Ein Grund hierfür liegt im Temperaturoptimum dieser Hefespezies. Bei einer Inkubation bei + 25 °C war kein Wachstum zu beobachten. Allerdings erfolgt in anderen Studien meist eine Isolation der Hefen bei dieser Temperatur, wodurch diese Spezies somit nicht erfasst wird. In vorliegender Arbeit fand die Inkubation der Hefen zusätzlich über sieben Tage bei einer Temperatur von + 4 °C statt, was den optimalen Wachstumsbereich dieser Spezies darstellt. Somit handelt es sich hierbei um eine psychrophile Hefe. Eine weitere Ursache für den bisher fehlenden Nachweis dieser Spezies ist, dass in vorangegangenen Studien teils nur eine Identifizierung der isolierten Hefen bis hin zur Gattungszugehörigkeit stattfand. Auch wurden teils zur weitergehenden Identifizierung handelsübliche Identifizierungskits (API® 20 C AUX und ID 32 C,

BioMérieux) verwendet, welche vorrangig auf pathogene bzw. humanmedizinisch relevante Hefen ausgelegt sind und deshalb andere Spezies nicht zuverlässig identifizieren können. Aufgrund dessen ist es möglich, dass die Hefenpopulation vor allem in Bezug auf psychrotolerante Spezies auf Fleisch bisher nicht in ihrer Gesamtheit erfasst werden konnte.

Die obigen Untersuchungsergebnisse lassen somit vermuten, dass sich psychrotolerante Hefen und ebenso die neubeschriebene Hefe der Gattung *Kazachstania* auf vakuumverpacktem Fleisch bei einer Isolationstemperatur von + 4 °C häufiger nachweisen lassen.

Um eine Prävalenz auf Rind-, Wild-, Straußen- und Lammfleisch umfassend beurteilen zu können, muss in einer weiteren Arbeit eine größere Anzahl an Fleischproben dieser Tierarten untersucht werden. Auch muss gerade in Bezug auf die Kontaminationsmöglichkeiten und Einschleppungswege in weiterführenden Studien der Zusammenhang zwischen der Herkunft des Fleisches und dem Nachweis von psychrotoleranten Hefen berücksichtigt und ermittelt werden. Dazu ist es notwendig, eine ausreichend große Probenanzahl aus verschiedenen Herkunftsländern zu untersuchen und gegebenenfalls durch Umgebungsproben in den Herkunftsbetrieben die Kontaminationswege zu verfolgen.

Bisher bestehen keine Zusammenhänge zwischen dem Verzehr von Fleisch, das mit psychrotoleranten Hefen kontaminiert ist, und einer Gesundheitsgefährdung für den Verbraucher. Jedoch wurde *Filobasidium uniguttulatum* im Zusammenhang mit einer Meningitis bei einem immungeschwächten Menschen beschrieben. Es wird hierbei von einer aerogenen Übertragung ausgegangen (Pan et al., 2012). In diesem Zusammenhang sollten in Bezug auf eine mögliche Verbrauchergefährdung durch die Zubereitung und den Verzehr von Fleisch, welches mit psychrotoleranten Hefen verunreinigt ist, weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Des Weiteren führt die hohe Nachweisrate psychrotoleranter Hefen zu Überlegungen bezüglich der Auswirkungen der jeweiligen Hefen auf die Fleischqualität. Ziegler (2009) weist in ihrer Arbeit auf das gehäufte Auftreten von Hefen im Zusammenhang mit Verderbsprozessen von vakuumverpacktem Rindfleisch durch *Clostridium estertheticum* hin. Es finden sich Hefen in verschiedenen Untersuchungen als Verursacher von Verderbsprozessen, die mit sensorischen Veränderungen und Gasbildung in den Verpackungen einhergehen. Hefen werden in der Literatur häufig als Konta-

minanten bei pflanzlichen Lebensmitteln oder auch bei vakuumverpackten Fleischerzeugnissen wie Schinken erwähnt (Nielsen et al., 2008; Sanz et al., 2005). Bei eingelegten und fermentierten Lebensmitteln wie zum Beispiel Oliven, Gemüse und Sauerkraut können *Saccharomyces* spp. Verderberscheinungen hervorrufen (Savard et al., 2002). Auch bei Lebensmitteln tierischen Ursprungs wie Frischkäse wurden Hefen der Gattung *Candida*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Debaryomyces*, *Cryptococcus* und *Rhodotorula* als Verderbserreger ermittelt (Engel, 1986b; Westall und Filtenborg, 1998). Sie spielen auch bei verschiedenen anderen Käsesorten eine Rolle bei der Reifung und Aromabildung, können jedoch auch zu Verderberscheinungen führen, welche meist mit Geruchs- und Geschmacksabweichungen, Veränderungen in der Konsistenz oder mit Gasbildung einhergehen (Fleet, 1990; Loureiro und Querol, 1999).

Ebenso wurde bei Fleischerzeugnissen ein Verderb durch Hefen in Form von veränderten Farb- und Geruchseigenschaften sowie schleimigen Oberflächenauflagerungen beschrieben (Fleet, 1992; Loureiro und Querol, 1999). Auf Geflügelfleisch und Geflügelfleischerzeugnissen zeigen *Yarrowia lipolytica* vorwiegend proteo- und lipolytische Verderbseigenschaften (Deàk, 2008; Ismail et al., 2000; Viljoen et al., 1998). Ein solches Verderbgeschehen bei vakuumverpacktem Fleisch, bei dem als Verursacher psychrotolerante Hefen eine zentrale Rolle spielen, ist jedoch bisher nicht beschrieben.

In dieser Arbeit wurde das Verderbspotential ausgewählter Isolate auf vakuumverpacktem Fleisch überprüft. Dabei wurden verschiedene Spezies (*Candida* spp., *Mrakia* spp. und *Kazachstania* spp.) zur Beimpfung des Fleisches gewählt. Es zeigte sich, dass die verschiedenen Hefen bei einer keimarmen Ausgangssituation mit einer geringen Anzahl an Konkurrenzmikrobiota eine unterschiedliche Wachstumskinetik besitzen. Bei Fleischproben, welche mit *Candida*-Stämmen oder mit *Kazachstania*-Stämmen beimpft wurden, zeigte sich eine starke Vermehrung der Hefen in den ersten Wochen während der Lagerung bei + 2 °C. Die Keimzahlen stiegen bis zu 10^6 KbE/cm² an. Dahingegen zeigten *Mrakia* spp. nur eine mäßige Vermehrung bis zu einer Keimzahl von 10^3 KbE/cm².

Hefen der Gattung *Candida* wurden bisher auf frischem Fleisch, in Vakuumverpackungen und Fleischerzeugnissen nachgewiesen (Asefa et al., 2009; Kabisch et al., 2010; Nielsen et al., 2008). Ein Zusammenhang von Verderbprozessen mit *Candida* spp. wurde schon bei Frischkäse beschrieben (Engel, 1986b; Westall und

Filtborg, 1998). Auf Geflügelfleisch zeigt *Candida zeylanoides* leichte lipolytische Verderbsprozesse (Ismail et al., 2000 und 2006). Die mit dem *Candida*-Pool beimpften Proben zeigten leichte sensorische Veränderungen im Vergleich zu den Negativkontrollen, welche sich vor allem in einer säuerlichen, fruchtig-alkoholischen und auch muffigen Geruchskomponente bemerkbar machten. Der entstandene Geruch wurde zwar nicht als ekelerregend bewertet, jedoch trat er gegen Ende der Lagerzeit deutlich hervor, so dass eine Beeinträchtigung der Geruchs- und Geschmackseigenschaften gegeben war und die Veränderungen als Verderbsprozesse bewertet wurden. Abweichungen sind folglich vor allem bei einer sehr langen Lagerzeit zu erwarten. Der Eintrag der Hefen in die Verpackung erfolgt vermutlich über eine Kontamination der Schlachttierkörper während des Schlachtprozesses vor allem bei der Enthäutung. Diese Hefen sind ubiquitär in der Umwelt und auch im Zusammenhang mit Schlachttieren zu finden. Somit kann auch über die Luft, z.B. bei falsch eingebautem oder nicht regelmäßig gewechseltem Luftfilter, eine Kontamination durch Hefen erfolgen.

Die Beimpfung mit dem *Mrakia*-Pool erbrachte keine Verderbsprozesse. Gegen Ende der Lagerzeit lagen bei den beimpften Proben und den Negativkontrollen die Veränderungen überwiegend im Bereich normaler Fleischalterung. Bei den beimpften Proben war zusätzlich eine leicht fruchtig-hefige Geruchskomponente wahrzunehmen. Nach zwölf Wochen Lagerzeit sind die Fleischstücke schon aufgrund der Fleischalterungsprozesse in ihren Geschmackseigenschaften gemindert. Es kann in diesem Fall nicht von einem Verderb des Fleisches durch die aufgeimpften Hefen gesprochen werden. Diese Hefen wurden vorrangig in Gletscherregionen und vereinzelt auf Lebensmitteln wie Fisch, Fleisch und Joghurt nachgewiesen (Kabisch et al., 2010; Komagata und Nakase, 1965; Moreira et al., 2001). Hier wären weitergehende Studien über die Kontaminationsquellen und Eintragswege wünschenswert, da sich bisher keine Zusammenhänge bezüglich des Eintrags ergeben.

Bei der Beimpfung mit *Kazachstania* spp. zeigten sich schon nach kurzer Zeit in Verbindung mit den zunehmenden Keimzahlen der Hefen auch deutliche sensorische Abweichungen im Vergleich zu den Negativkontrollen. So wurde mit zunehmender Lagerdauer ein muffiger Altgeruch der Probe wahrnehmbar sowie eine Verfärbung der Fleischoberfläche und des Tropfsaftes. Es ist davon auszugehen, dass beim Öffnen der Packung dem Verbraucher die sensorischen Veränderungen des Produkts auffallen und zu einer Beanstandung führen. Der Geruch, die Verfärbung und die

Gasbildung in der Packung sind als Verderb zu werten. Da *Kazachstania* spp. im Rahmen der hier durchgeführten Studie wiederholt in Proben nachgewiesen wurde, kann vermutet werden, dass eine Kontamination von vakuumverpacktem Fleisch und dadurch bedingte Verderbsprozesse häufiger auftreten. Reklamationen durch den Handel oder den Endverbraucher sind im Falle eines Verderbs durch *Kazachstania* spp. nicht auszuschließen. Die Herkunft und der Kontaminationsweg der hier isolierten *Kazachstania* spp. ist jedoch nicht bekannt und muss in weiterführenden Studien eruiert werden.

Die unterschiedlich stark ausgeprägten Veränderungen des Fleisches durch die aufgeimpften Hefen hängen zum einen vermutlich mit dem Vermehrungspotential der einzelnen Spezies unter den vorherrschenden Bedingungen zusammen. So konnte in den Untersuchungen gezeigt werden, dass sich die *Mrakia*-Isolate nur sehr langsam vermehrt. Infolgedessen traten keine Verderbserscheinungen auf. Auch ist es wahrscheinlich, dass jede Hefespezies unterschiedliche enzymatische Aktivitäten aufweist und deshalb die Verderbsprozesse unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Diesbezüglich sollten weiterführende Untersuchungen angestrebt werden.

Das Verderbspotential dieser und auch anderer Hefen ist allerdings nicht nur isoliert zu betrachten. Vielmehr müssen bei der Bewertung dieser Verderbsprozesse durch Hefen auch die Rahmenbedingungen, welche sich aus der entsprechenden Schlachttechnik ergeben, berücksichtigt werden. Ziel von Optimierungen und Innovationen im Bereich der Schlachttechnologie ist eine verbesserte Produktqualität. Neben physiologischen Fleischparametern steht besonders der mikrobielle Keimstatus der Schlachtkörper und daraus hergestellter Erzeugnisse im Vordergrund. Um die von den Großhandelsunternehmen geforderten, möglichst langen Haltbarkeiten der Produkte erfüllen zu können, sind die Schlacht- und Zerlegebetriebe auf eine möglichst geringe Kontamination der Schlachtkörper mit unerwünschten Mikroorganismen bei der Schlacht- und Zerlegetätigkeit bedacht. Dies führt zur Entwicklung von Schlachttechniken und -technologien, welche verhindern, dass Keime von der Haut der Schlachttiere oder aus der Umwelt auf die Oberflächen der Schlachttiere gelangen. Erfolgt bei einer hygienischen und keimarmen Schlachtung und Zerlegung eine Kontamination mit Hefen, so haben diese auf der Fleischoberfläche wenig Konkurrenzkeime. Als Folge können sich vergleichbar zu den Challengeversuchen die Hefen vermehren und erreichen im Laufe der Lagerzeit hohe Keimzahlen von 10^6 - 10^7

KbE/cm². Deshalb muss gerade bei zunehmender Schlachthygiene auch der Eintrag von Hefen beispielsweise über fehlerhafte Lüftungen minimiert werden, da diese sonst bessere Vermehrungsmöglichkeiten haben und es zu Verderbsgeschehen kommen kann.

Ebenso hat die Lagerzeit der Fleischstücke eine erhebliche Auswirkung auf die Ausmaße des Verderb. So beeinflussen *Candida* spp. die Eigenschaften des Fleisches zunächst nur wenig, jedoch können diese Veränderungen gegen Ende der Lagerzeit durchaus als Verderb bewertet werden. Allerdings zeigt sich bei der Beimpfung mit *Mrakia* spp., dass auch bei fehlendem, deutlichen Verderb durch Hefen die Geschmackseigenschaften nach einer Lagerzeit von zwölf Wochen aufgrund der normalen Fleischalterung gemindert sind. Deshalb sollte die Haltbarkeit von vakuumverpacktem Fleisch unterhalb dieser Lagerdauer angegeben werden.

Bei abschließender Betrachtung der Challengeversuche zeigt sich, dass einige Hefespezies in vakuumverpacktem Fleisch unter bestimmten Ausgangsbedingungen Verderbsprozesse verursachen können. So ist eine deutliche Vermehrung bestimmter Hefen auf vakuumverpacktem Fleisch möglich, wenn wie bei dieser Versuchsanordnung eine niedrige Zahl an Ausgangsmikrobiota und eine Kontamination mit den entsprechenden Hefen vorherrscht. Ob diese Verderbsprozesse in gleicher Weise bei höheren Ausgangskeimzahlen an Milchsäurebakterien auftreten, sollte weiter untersucht werden. Auch um das Ausmaß der Kontamination von vakuumverpacktem Fleisch vor allem mit *Kazachstania* spp. und der Verberbsproblematik abschätzen zu können, ist es notwendig, eine ausreichend große Anzahl der unterschiedlichen Fleischarten gezielt auf das Vorkommen zu untersuchen.

Wie bereits erwähnt, ist der Eintragsweg von Hefen auf das verpackte Fleisch nicht vollständig geklärt. Er erfolgt vermutlich teilweise über die Haut bzw. das Fell der Schlachttiere oder über die Außenluft, z.B. über fehlerhafte Filteranlagen. Da gerade der Eintrag der Hefen sowie anderer Mikroorganismen über die Schlachttieroberfläche in die lebensmittelverarbeitenden Betriebe nicht gänzlich verhindert werden kann, ist ein wirkungsvolles Hygienekonzept unerlässlich, um die Kontamination von vakuumverpackten Fleischstücken und einen möglichen Verderb durch diese zu verhindern. Grundlage bildet hier ein Reinigungs- und Desinfektionsmanagement, welches Hefen zuverlässig inaktiviert und beseitigt.

Im Rahmen der Versuche zur Wirksamkeit verschiedener Desinfektionsmittel konnte festgestellt werden, dass hier bei allen verwendeten Desinfektionsmitteln ein gutes Reinigungsergebnis gegenüber Hefen erzielt werden konnte. Die Reinigung der glatten Plättchen ist im Vergleich zu den eingeritzten leichter und effektiver.

Bei den glatten Schneidebrettern zeigten alle verwendeten Desinfektionsmittel eine gute Wirkung und konnten beim überwiegenden Teil der Proben die Hefen unter die Nachweisgrenze reduzieren. Bei der alleinigen Reinigung der glatten Plättchen mit Wasser konnten vor allem in Pool I (*Mrakia* spp.) und II (*Kazachstania* spp.) gute Ergebnisse erzielt werden, jedoch reichte diese Behandlung in Pool IV (*Candida* spp. und *Pichia* spp.) und besonders in Pool III (*Candida* spp., *Rhodotorula* spp. und *Filobasidium uniguttulatum*) nicht aus um die Hefen wirkungsvoll zu eliminieren.

Diese Ergebnisse wurden bei den eingeritzten Plättchen bestätigt. Eine Wirksamkeit aller verwendeten Desinfektionsmittel ist gegeben, wobei ebenfalls die Verwendung von Wasser zur Reinigung eine Reduktion der Hefen vor allem bei Pool II bewirkt. Allerdings ergeben sich im Vergleich zu den glatten Platten mehr schwach positive Proben. Dies ist auf die bessere Anhaftungsmöglichkeiten der Hefen in den Einkerbungen der Platten zurückzuführen. Die im Vergleich zu Pool I und II etwas schlechteren Reinigungsergebnisse in Pool IV und vor allem Pool III ist vermutlich durch die Oberflächenstruktur der verwendeten Hefen bedingt, durch welche sie sich besser auf der Oberfläche der Schneidebretter halten und nicht so leicht abgespült werden können.

Auch in einer Studie von Salo und Wirtanen (2005) wurden Versuche zur Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegenüber Lebensmittel assoziierten Hefen durchgeführt. Es konnte hier eine gute Wirksamkeit vieler verwendeter Wirkstoffe festgestellt werden. Alkoholische Produkte hatten hierbei die beste Wirkung. Mit Chlor- und Persulfathaltigen Desinfektionsmitteln konnte kein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden.

In den Desinfektionsmittelversuchen vorliegender Arbeit war sowohl die Behandlung mit den getesteten Desinfektionsmitteln als auch die Reinigung mit Wasser erfolgreich. Bei der alleinigen Verwendung von Wasser gelang zwar keine vollständige Elimination der Hefen, wohl aber eine deutliche Reduktion der Keime. Dies zeigt, dass eine Beseitigung und Inaktivierung von Hefen in einem Schlacht- und Zerlegebetrieb durch ein konventionelles Reinigungsmanagement zu bewältigen ist. Es sind bis auf wenige Ausnahmen (Salo und Wirtanen, 2005) die meisten Reinigungs- oder

Desinfektionsmittel für die Beseitigung der Hefen gut geeignet. Gerade jedoch bei den hier getesteten Hefen leistet alleine schon die gründliche Reinigung und Abtrocknung der verschmutzten Flächen einen entscheidenden Beitrag am Erfolg der Hygienemaßnahme. Entsprechend der Hygienemaßnahmen in Bezug auf andere Keime bilden somit eine regelmäßige Reinigung der Arbeitsgeräte und -oberflächen sowie eine anschließende, vollständige Abtrocknung die Grundlage. Da eine Elimination der Hefen auf den eingeritzten Schneidebrettern etwas schlechter gelang, ist es zudem sehr wichtig drauf zu achten, dass Wand-, Boden- und Arbeitsflächen glatt und somit leicht zu reinigen sind. Aufgrund der unkomplizierten Bekämpfung der Hefen lassen sich in der Praxis folglich erhöhte Hefezahlen in vakuumverpackten Fleischprodukten als Indikator für ein mangelhaftes oder ungenügendes Reinigungsregime heranziehen.

Die durchgeführten Untersuchungen geben einen ersten Überblick über die Vielfalt der Population psychrotoleranter Hefen auf vakuumverpacktem Fleisch, welche bisher nur unzureichend untersucht wurde. Zudem finden sich hierbei deutliche Hinweise auf ein vermehrtes Vorkommen psychrotoleranter Hefen und damit zusammenhängender Verderbsprozesse auf vakuumverpacktem Fleisch.

6 Zusammenfassung

Hefen sind ubiquitär in der Umwelt zu finden und kommen in vielen unterschiedlichen Habitaten vor. Einige psychrotolerante Spezies zeichnen sich durch ihre hohe Beständigkeit gegenüber Kälte aus. Hinsichtlich ihres Vorkommens bei gekühltem, vakuumverpacktem Fleisch finden sich wenige Untersuchungen. Auch über ihre Bedeutung als Verderbserreger in diesen Produkten ist sehr wenig bekannt.

In vorliegender Arbeit wurden 25 Rind-, 9 Wild-, 3 Lamm- und 2 Straußenfleischproben in Vakuumverpackung unterschiedlicher Herkunft daher auf das Vorkommen von Hefen und die Zusammensetzung der Hefepopulation untersucht. Es wurden insgesamt 18 Isolatgruppen isoliert. Darunter waren die Gattungen *Candida*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium*, *Filobasidium*, *Debaryomyces*, *Mrakia*, *Pichia* und *Rhodotorula*. Zudem wurden zwei Hefen, *Candida argentea* und *Mrakia blollopsis*, isoliert und identifiziert, über deren Vorkommen auf Fleisch bislang nicht berichtet wurde. Eine in drei Proben nachgewiesene Spezies konnte mittels molekularbiologischer Verfahren der Gattung *Kazachstania* zugeordnet werden. Hierbei handelt es sich um eine neue Art, *Kazachstania psychrophila* sp. nov., welche aufgrund der hohen Nachweishäufigkeit auf vakuumverpacktem Fleisch eine Rolle spielt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch das Verderbspotential unterschiedlicher Hefeisolate untersucht. Es wurden Rindfleischproben mit *Candida* spp., *Mrakia* spp. und *Kazachstania* spp. beimpft und über einen Zeitraum von 12 Wochen sensorisch und mikrobiologisch untersucht. Dabei zeigte sich bei dieser Versuchsanordnung kein Verderbspotential von *Mrakia* spp. Bei der Beimpfung mit *Candida* spp. zeigten sich leichte sensorische Veränderungen, welche bei dieser Lagerzeit als mäßige Verderberscheinungen bewertet wurden. *Kazachstania* spp. hingegen konnten im Beimpfungsversuch deutliche geruchliche und farbliche Veränderungen der Fleischproben hervorrufen, welche gegen Ende der Lagerzeit eindeutig als Verderb bezeichnet werden konnten.

In Bezug auf die Minimierung einer Kontamination von Vakuumpackungen mit Hefen und auf die Verhinderung eines Verderbsprozesses ergab sich in den Untersuchungen zur Wirksamkeit verschiedener Reinigungs- und Desinfektionsmittel, dass alle getesteten, handelsüblichen Präparate eine gute Wirkung gegenüber den getesteten Hefen hatten. Glatte Schneidebretter sind gegenüber den benutzten und eingeritzten leichter zu reinigen. Somit ist die Bekämpfung der Hefen in einem Schlacht- und Zer-

legebetrieb im Rahmen der üblichen, ordnungsgemäßen Hygiene- und Reinigungskonzepte zu bewältigen.

Der häufige Nachweis von psychrotoleranten Hefen auf vakuumverpacktem Fleisch sowie das Verderbspotential einiger Spezies nimmt gerade durch die Weiterentwicklung und Verbesserung der Schlacht- und Zerlegetechnik mit dem Ziel der Gewinnung keimarmer Schlachtkörper und Fleischteilstücke an Bedeutung zu. Bei der Vakuumierung von Fleisch, welches einen niedrigen Keimgehalt besitzt, kann eine Kontamination mit psychrotoleranten Hefen leicht zu Verderbserscheinungen führen, da die Hefen durch die fehlende Konkurrenzmikrobiota in ihrem Wachstum nicht gehemmt werden.

In weiterführenden Arbeiten wären Untersuchungen über die Kontaminationswege und Eintragsquellen der psychrotoleranten Hefen notwendig, um eine effektive Vermeidung und Bekämpfung zu gewährleisten. Außerdem sollte das Verderbspotential weiterer relevanter Hefespezies untersucht werden und die Verderbsproblematik anhand von Verdachtsproben näher untersucht werden.

7 Summary

Yeasts are ubiquitous in the environment and can be found in lots of different habitats. Some psychrotolerant species are characterized by their high tolerance towards coldness. There are only few studies concerning their occurrence in chilled vacuum-packed meat. There is not much knowledge about their importance regarding the contamination of those products.

In this thesis therefore 25 beef-, 9 game-, 3 lamb and 2 ostrich vacuum-packed meat samples of different origin have been examined for yeasts. Based on cultural criteria the isolates could be assigned to 18 groups. The isolates belonged to the following genera: *Candida*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium*, *Filobasidium*, *Debaryomyces*, *Mrakia*, *Pichia* and *Rhodotorula*. In addition, two yeasts, *Candida argentea* and *Mrakia blollopsis*, were isolated and identified – their existence on meat has not yet been reported about. One species that has been detected in three samples was assigned to the genus *Kazachstania* by molecular biological methods. This is a new species, *Kazachstania psychrophila* sp. nov., which has been detected in vacuum-packed meat.

In this thesis the spoilage potential of different yeast isolates also has been examined. Beef meat samples have been artificially contaminated with *Candida* spp., *Mrakia* spp. and *Kazachstania* spp., and been analysed sensory and microbiological for 12 weeks. In this experimental set up no spoilage potential could have been detected. When artificially contaminated with *Candida* spp., slight sensory changes could be detected, which were evaluated as moderate spoilage regarding the time of storage. *Kazachstania* spp. however, could evoke distinct olfactory changes and discoloration in the meat samples, which can be clearly referred to as spoilage.

Concerning the efficiency of different detergents and disinfectants, in order to minimize the contamination of vacuum packaging with yeasts and to prevent spoilage, it can be shown that all tested, customary compounds are very effective on the target yeasts. Cleaning plain cutting boards is easier than cleaning the carved ones that have been used. Therefore, the preventive measures have to include the regular and proper hygienic and cleaning concepts in slaughterhouse.

The continual proof of psychrotolerant yeasts on vacuum-packed meat, as well as the spoilage potential of some species gain in importance especially due to the pro-

gression and optimization of slaughtering techniques in order to gain germ-poor carcasses and cut meat. At the evacuation of meat, that has a small microbial content, a contamination with psychrotolerant yeasts can easily lead to spoilage, as the yeasts are not hampered in their growth due to the lack of a competitive flora.

In additional surveys further investigations about the ways of contamination and entry sources of psychrotolerant yeasts would be required in order to ensure an effective prevention and control. Furthermore, the spoilage potential of additional relevant yeast species should be evaluated and the difficulty of spoilage should be further scrutinised.

8 Literaturverzeichnis

Alonso-Calleja, C., Martínez-Fernández, B., Prieto, M. und Capita, R. (2004): Microbiological quality of vacuum-packed retail ostrich meat in Spain. Food microbiology, Band 21 (Nr. 2), Seite 241 - 246.

Anonymus (1980): ICMSF - International Commission on Microbiological Specification for Foods of the International Union of Microbiological Societies Factors affecting life and death of microorganisms. Microbial Ecology of Foods, Band 1, Academic Press, New York.

Anonymus (1999): BgVV - Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin Berlin; Temperaturanforderungen und -empfehlungen für Lebensmittel. URL: http://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/1999/05/temperaturanforderungen_und__empfehlungen_fuer_lebensmittel-864.html (Zugriffsdatum: 28.08.2013).

Anonymus (2006a): BAG - Bundesamt für Gesundheit, Schweiz; Grundlagen der Reinigung und Desinfektion in Lebensmittelbetrieben: Systeme, Wirksubstanzen, Wirkmechanismen. Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, Band 97 (Nr. 4), Seite 191 - 197.

Anonymus (2006b): BfR - Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin; Leitfaden für die sensorische Untersuchung und Beurteilung von Wild. URL: http://www.bfr.bund.de/cm/343/leitfaden_fuer_die_sensorische_untersuchung_und_beurteilung_von_wild.pdf (Zugriffsdatum: 28.08.2013).

Anonymus (2012a): CBS - Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht. URL: <http://www.cbs.knaw.nl/Collections/DefaultInfo.aspx?Page=YeastMethods> (Zugriffsdatum: 01.08.2012).

Anonymus (2012b): DVG - Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V., Desinfektionsmittellisten der DVG, URL: <http://www.dvg.net/index.php?id=1383> (Zugriffsdatum: 01.08.2012).

Anonymus (2012c): Landesforsten Rheinland-Pfalz Fleischreifung. URL: <http://www.wald-rlp.de/wild-und-jagd-nachrichten/wildprodukte/hygiene-bei-wildfleisch/fleischreifung.html> (Zugriffsdatum: 01.08.2012)

Aono, R. (1990): Taxonomic distribution of alkali-tolerant yeasts. *Systematic and applied microbiology*, Band 13 (Nr. 4), Seite 394 - 397.

Asefa, D., Møretrø, T., Gjerde, R., Langsrud, S., Kure, C.F., Sidhu, M.S., Nesbakken, T. und Skaar, I. (2009): Yeast diversity and dynamics in the production process of Norwegian dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, Band 133 (Nr. 1 - 2), Seite 135 - 140.

Bai M., Qing M., Guo Z., Zhang Y., Chen X., Bao Q., Zhang H. und Tian-song S. (2010): Occurrence and dominance of yeast species in naturally fermented milk from the Tibetan Plateau of China. *Canadian Journal of Microbiology*, Band 56, Seite 707 - 714.

Barnett, J. A. und Ingram, M. (1955): Technique in the study of yeast assimilation reactions. *Journal of Applied Microbiology*, Band 18 (Nr. 1), Seite 131 - 148.

Barnett, J.A., Payne, R.W. und Yarrow, D. (2000): *Yeasts: Characteristics and identification*. Cambridge University Press, Cambridge.

Baxter, M. und Illston, G.M. (1976): Psychrotrophic meat spoilage fungi within a freezing works. *New Zealand Veterinary Journal*, Band 24 (Nr.8), Seite 177 - 180.

Baxter, M. und Illston, G.M. (1977): Environmental reservoirs of psychrotrophic meat spoilage fungi. *New Zealand Veterinary Journal*, Band 25 (Nr. 6), Seite 165 - 167.

Beijerinck, M. W. (1889): L'auxanographie, ou la methode de l'hydrodiffusion dans la gelatine appliquee aux recherches microbiologiques. *Archives Néerlandaises*, Band 23, Seite 367.

Bell, R.G. und Garout, A.M. (1994): The effective product life of vacuum-packaged beef imported into Saudi-Arabia by sea, as assessed by chemical, microbiological and organoleptic criteria. *Meat Science*, Band 36 (Nr. 3), Seite 381 - 396.

Binke, R. (2003): Vom Muskel zum Fleisch. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung Kulmbach* 42, Nr. 162, Seite 347 - 354.

Boekhout, T., Deák, T., Robert, V. und Tan, C.S. (1994): Identifizierung von Hefen in Lebensmitteln. *In* Baumgart, J., Becker, B. und Stephan, R. (Hrsg.) (1994): *Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln*. Behrs Verlag, Hamburg.

Boers, R.H. und Dijkman, K.E. (1994): Shelf-life of vacuum-packaged wild boar meat in relation to that of vacuum-packaged pork: Relevance of intrinsic factors. *Meat Science*, Band 37 (Nr. 1), Seite 91 - 102.

Böhm, V. (2013): Untersuchungen zum Vorkommen und zur Verhinderung des Verderbsgeschehens durch *Clostridium estertheticum* in Fleisch. Vet. Med Diss., LMU München.

Borch, E., Kant-Muermans, M. und Blixt, Y. (1996): Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, Band 33 (Nr. 1), Seite 103 - 120.

Brightwell, G., Clemens, R., Ulrich, S. und Boerema, J. (2007): Possible involvement of psychrotolerant *Enterobacteriaceae* in blown pack spoilage of vacuum-packaged raw meats. *International journal of food microbiology*, Band 119 (Nr. 3), Seite 334 - 339.

Campbell, R.J., Egan, A.F., Grau, F.H. und Shay, B.J. (1979): The growth of *Microbacterium thermospactum* on beef. *Journal of Applied Microbiology*, Band 47 (Nr. 3), Seite 505 - 509.

Campbell, R.E., Hunt, M.C., Levis, P. und Chambers, E. (2001): Dry-aging effects on palatability of beef longissimus muscle. *Journal of Food Science*, Band 66 (Nr. 2), Seite 196 - 199.

Capita, R., Díaz-Rodríguez, N., Prieto, M. und Alonso-Calleja, C. (2006): Effects of temperature, oxygen exclusion and storage on the microbial loads and pH of packed ostrich steaks. *Meat Science*, Band 73 (Nr. 3), Seite 498 - 502.

Chen, R., Wei, S.C., Jiang, Y.M., Wang, Q.M. und Bai, F.Y. (2010): *Kazachstania taianensis* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species from orchard soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, Band 60 (Nr. 6), Seite 1473 - 1476.

Christensen, W.B. (1946): Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *Journal of Bacteriology*, Band 52 (Nr. 4), Seite 461 - 466.

Combina, M., Daguerre, C., Massera, A., Mercado, L., Sturm, M.E., Ganga, A. und Martinez, C. (2008): Yeast identification in grape juice concentrates from Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, Band 46, Seite 192 - 197.

Dalton, H., Board, R. und Davenport, R. (1984): The yeasts of British fresh sausage and minced beef. *Food Microbiology*, Band 50 (Nr. 3), Seite 227 - 248.

Deàk, T. (2008): *Handbook of food spoilage yeasts*. 2nd Edition, CRC Press.

De Garcia, V., Brizzio, S., Libkind, D., Buzzini, P. und van Broock, M. (2007): Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiol Ecology*, Band 53, Seite 331 - 341.

De Lorenzo, V. (2010): Genes that move the window of viability of life: Lessons from bacteria thriving at the cold extreme. *Bioessays*, Band 33, Seite 38 - 42.

Diaz, M.R. und Fell, J.W. (2000): Molecular analyses of the IGS & ITS regions of rDNA of the psychrophilic yeasts in the genus *Mrakia*. *Antonie van Leeuwenhoek*, Band 77, Seite 7 - 12.

Dillon, V. und Board, R. (1991): Yeasts associated with red meats. *Journal of Applied Bacteriology*, Band 71 (Nr. 2), Seite 93 - 108.

Dillon, V., Davenport, R. und Board, R. (1991): Yeasts associated with lamb. *Mycological Research*, Band 95 (Nr. 1), Seite 57 - 63.

Diriye, F.U., Scorzetti, G. und Martini, A. (1993): Methods for the separation of yeast cells from the surfaces of processed, frozen foods. *International journal of food microbiology*, Band 19 (Nr. 1), Seite 27 - 37.

Egan, A. F. (1983): Lactic acid bacteria of meat and meat products. *Antonie van Leeuwenhoek*, Band 49, Seite 327 - 336.

Engel, G. (1986a): Hefen in Silage und Rohmilch. *Milchwissenschaft*, Band 41, Seite 633 - 637.

Engel, G. (1986b): Vorkommen von Hefen in Frischkäse - organoleptische Beeinflussung. *Milchwissenschaft*, Band 41, Seite 692 - 694.

Fehlhaber, K. (1992): Lebensmittelverderb. In Fehlhaber, K. und Janetschke, P. (1992): Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene, Gustav Fischer Verlag, Jena, Seite 126 - 133.

Fehlhaber, K. (2004): Verderb. In Sinell, H.J. (2004): Einführung in die Lebensmittelhygiene. 4. Auflage, Parey Verlag, Stuttgart, Seite 107 - 132.

Fell, J.W. (1993): Rapid identification of yeast species using three primers in a polymerase chain reaction. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, Band 2, Seite 174 - 180.

Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G. und Statzell-Tallman, A. (2000): Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Band 50 (Nr. 3), Seite 1351 - 1371.

Fernandez-Lopez, J., Sayas-Barberá, E., Munoz, T., Sendra, E., Navarro, C. und Pérez-Alvarez, J.A. (2008): Effect of packaging conditions on shelf-life of ostrich steaks. *Meat Science*, Band 78 (Nr. 1 - 2), Seite 143 - 152.

Fleet, G.H. (1990): Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*, Band 68, Seite 199 - 211.

Fleet, G.H. (1992): Spoilage yeast. *Critical Reviews in Biotechnology*, Band 12 (Nr. 1 und 2), Seite 1 - 44.

Fleet, G.H. und Mian, M.A. (1987): The occurrence and growth of yeasts in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, Band 4 (Nr. 2), Seite 145 - 155.

Froning, G.W. und Gipson, P.S. (1976): G76-279 Processing deer. Historical Materials from University of Nebraska-Lincoln Extension, Paper 1517.

Gaby, W. und Hadley, C. (1957): Practical laboratory test for the identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, Band 74 (Nr. 3), Seite 356 - 358.

Gill, C.O. (1983): Meat Spoilage and Evaluation of the Potential Storage Life of Fresh Meat. *Journal of Food Protection*, Band 46 (Nr. 5), Seite 444 - 452.

Gill, C.O. und Newton, K.G. (1978): The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. *Meat Science*, Band 2 (Nr. 3), Seite 207 - 217.

Gilliland, S.E. und Speck, M.L. (1975): Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactobacilli and pediococci in nonfermented refrigerated foods. *Journal of Food Science*, Band 40 (Nr. 5), Seite 903 - 905.

Grau, F.H. (1981): Microbial ecology and interactions in chilled meat. *CSIRO Division of Food Research*, Band 41, Seite 12 - 18.

Heinz, G. (1974): Gekühlte vakuumverpackte Teilstücke vom Rind unter den Bedingungen einer verlängerten Lagerzeit. *Fleischwirtschaft*, Band 54 (Nr. 10), Seite 1635 - 1638.

Hibbett, D.S. et al. (2007): A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, Band 111 (Nr.5), Seite 509 - 547.

Hitchener, B.J., Egan, A.F. und Rogers, P.J. (1982): Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged beef. *Journal of Applied Microbiology*, Band 52 (Nr.1), Seite 31 - 37.

Holland, S.L., Dyer, P.S., Bond, C.J., James, S.A., Roberts, I.N. und Avery, S.V. (2011): *Candida argentea* sp. nov., a copper and silver resistant yeast species. *Fungal Biology*, Band 115, Seite 909 - 918.

Husband, P.M. (1982): The history of vacuum packaged meat. *Food Technology in Australia*, Band 34 (Nr. 6), Seite 272 - 275.

Ismail, S.A.S. (2006): Potential contribution of yeast in spoilage of quail meat. *Assiut Veterinary Medicine Journal*, Band 52 (Nr. 110), Seite 55 – 64.

Ismail, S.A.S., Deàk. T., El-Rahman, H.A., Yassien, M.A.M. und Beuchat, L.R. (2000): Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature. *International Journal of Food Microbiology*, Band 62, Seite 113 - 121.

Jones, R.J. (2004): Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum-packaged beef. *International Journal of Food Microbiology*, Band 90 (Nr. 3), Seite 273 - 282.

Kabisch, J., Ziegler, E., Staufenbiel, A., Hechelmann, H.-G., Pichner, R. und Gareis, M. (2010): Isolierung und Identifizierung von psychrophilen Hefen aus vakuumverpacktem Rindfleisch. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung Kulmbach* 49, Nr. 189, Seite 197 - 206.

Kabisch, J., Höning, C., Böhnlein, C., Pichner, R., Gareis, M. und Wenning, M. (2013): *Kazachstania psychrophila* sp. nov., a novel psychrophilic yeast isolated from vacuum-packed beef. *Antonie van Leeuwenhoek*, Band 104 (Nr. 3), Seite 1 - 7.

Kiermeier, F. (1981): Zum Vorkommen von Schmutz in Lebensmitteln. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, Band 173 (Nr. 2), Seite 121 - 126.

Kobatake, M., Kreger-van Rij, J.W., Plácido, M.T. und van Uden, N. (1992): Isolation of proteolytic psychrotrophic yeasts from fresh raw seafood. *Letters in Applied Microbiology*, Band 14 (Nr. 2), Seite 37 - 42.

Komagata, K. und Nakase, T. (1965): New species of the genus *Candida* isolated from frozen foods. *The Journal of General and Applied Microbiology*, Band 11 (Nr. 3), Seite 255 - 267.

Koohmaraie, M. und Geesink, G.H. (2006): Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science*, Band 74 (Nr. 1), Seite 34 - 43.

Krämer, J. (2002): *Lebensmittel-Mikrobiologie*, 4. Auflage, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.

Kröckel, L. (2012): Rindfleischreifung unter Einsatz von Starterkulturen. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung Kulmbach*, Band 51 (Nr. 196), Seite 87 - 95.

Kümmerle, M., Scherer, S. und Seiler, H. (1998): Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Applied and environmental microbiology*, Band 64 (Nr.6), Seite 2207 - 2214.

Kurtzmann, C.P. (1998): Nuclear DNA hybridization: Quantitation of close genetic relationship. *In* Kurtzmann, C.P. und Fell, J.W., *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Elsevier, New York, Seite 63 - 67.

Kurtzmann, C.P und Blanz, P.A. (1998): Ribosomal RNA/DNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships. *In* Kurtzmann, C.P. und Fell, J.W., *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Elsevier, New York, Seite 69 - 74.

Kurtzmann, C.P. und Robnett, C.J. (1998): Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, Band 73, Seite 331 - 371.

Lee, C.F., Liu, C.H., Young, S.S. und Chang, K.S. (2008): *Kazachstania jianicus* sp. nov., an ascomycetous yeast species isolated from soil in Taiwan. *FEMS yeast research*, Band 8 (Nr. 1), Seite 114 - 118.

Lenze, W. (1977): Fleischhygienische Untersuchungen an Rehwild. *Vet. med. Diss.*, München.

Lodder, J. (1970): General classification of the yeasts. *In* Lodder, J. (1970): *The Yeast - A taxonomic study*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London, Seite 1 - 30.

Loureiro, V. und Querol, A. (1999): The prevalence and control of spoilage yeasts in food and beverages. *Trends in Food Science and Technology*, Band 10, Seite 356 - 365.

Lowry, P.D. und Gill, C.O. (1984): Development of a yeast microflora on frozen lamb stored at - 5 °C. *Journal of Food Protection*, Band 47 (Nr. 4), Seite 309 - 311.

Lu, H.Z., Cai, Y., Wu, Z.W., Jia, J.H. und Bai, F.Y. (2004): *Kazachstania aerobia* sp. nov., an ascomycetous yeast species from aerobically deteriorating corn silage. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, Band 54 (Nr. 6), Seite 2431 - 2435.

Mannarelli, B.M. und Kurtzmann, C.P. (1998): Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeast by using short oligonucleotids in a PCR. *Clinical Microbiology*, Band 36, Seite 1634 - 1643.

Marks, J., Stadelman, W., Linton, R., Schmieder, H., und Adams, R. (1998): Tenderness analysis and consumer sensory evaluation of ostrich meat from different muscles and different aging times. *Journal of Food Quality*, Band 21 (Nr. 5), Seite 369 - 381.

Martínez-Cerezo, S., Sañudo, C., Panea, B. und Olleta, J.L. (2005): Breed, slaughter weight and ageing time effects on consumer appraisal of three muscles of lamb. *Meat Science*, Band 69 (Nr. 4), Seiten 797 - 805.

Minks, D. und Stringer, W.C. (1972): The influence of aging beef in vacuum. *Journal of Food Science*, Band 37 (Nr. 5), Seite 736 - 738.

Moore, R.T. (1998): Cytology and ultrastructure of yeast and yeastlike fungi. In Kurtzman, C.P. und Fell, J.W., *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Elsevier, New York, Seite 33 - 41.

Moreira, S.R., Schwan, R.F., Carvalho, E.P. und Wheals, A.E. (2001): Isolation and identification of yeasts and filamentous fungi from yoghurts in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, Band 32, Seite 117 - 122.

Morita, R.Y. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriological reviews*, Band 39 (Nr. 2), Seite 144 - 167.

Müller, G. (1961): *Die Hefen*. A. Ziemsen Verlag, Wittenberg.

Nielsen, D.S., Jacobsen, T., Jespersen, L., Koch, A.G. und Arneborg, N. (2008): Occurrence and growth of yeasts in processed meat products – Implications for potential spoilage. *Meat Science*, Band 80, Seite 919 - 926.

Nisiotou, A.A. und Nychas, G.J.E. (2008): *Kazachstania hellenica* sp. nov., a novel ascomycetous yeast from a Botrytis-affected grape must fermentation. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, Band 58 (Nr. 5), Seite 1263 - 1267.

Otremba, M.M., Dikeman, M.E. und Boyle, E.A.E. (1999): Refrigerated shelf life of vacuum-packaged, previously frozen ostrich meat. *Meat science*, Band 52 (Nr. 3), Seite 279 - 283.

Pan, W., Liao, W., Hagen, F., Theelen, B., Shi, W., Meis, J. F. und Boekhout, T. (2012): Meningitis caused by *Filobasidium uniguttulatum*: case report and overview of the literature. *Mycoses*, Band 55 (Nr. 2), Seite 105 - 109.

Parrish J.R., F.C., Boles, J.A., Rust, R.E. und Olson, D.G. (1991): Dry and wet aging effects on palatability attributes of beef loin and rib steaks from three quality grades. *Journal of Food Science*, Band 56 (Nr. 3), Seite 601 - 603.

Patterson, J.T. und Gibbs, P.A. (1978): Some microbiological considerations applying to the conditioning, ageing and vacuum packaging of lamb. *Journal of Food Technology*, Band 13, Seite 1 - 13.

Péter, G., Dlačny, D., Vasdinyei, R., Tornai-Lehoczki, J. und Deák, T. (2004): *Candida galli* sp. nov., a new yeast from poultry. *Antonie van Leeuwenhoek*, Band 86, Seite 105 - 110.

Phaff, H.J., Miller, M.W. und Mrak, E.M. (1966): *The life of yeasts*. Harvard University Press, Cambridge.

Pitt, J.I. (1974): Resistance of some food spoilage yeasts to preservatives. *Journal of Food Technology Australia*, Band 26 (Nr. 6), Seite 238 - 239.

Poławaska, E., Marchewka, J., Krzyżewski, J., Bagnicka, E. und Wójcik, A. (2011): The ostrich meat – an updated review. *Animal Science Papers and Reports*, Band 29 (Nr. 1), Seite 5 - 18.

Prändl, O. (1988): Gewinnung von Fleisch. *In Handbuch der Lebensmitteltechnologie*. Prändl, O., Fischer, A., Schmidhofer, T. und Sinell, H.J., Ulmer Verlag, Stuttgart, Seite 25 - 147.

Prillinger, H., Molnár, O., Eliskases-Lechner, F. und Lopandic, K. (1999): Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. *Antonie van Leeuwenhoek*, Band 75 (Nr. 4), Seite 267 - 283.

Quast, R. (1978): Vereinfachte Fermentations- und Assimilationstests zur Identifizierung von Hefen. *Grosse Verlag, Mykosen*, Band 21 (Nr. 3), Seite 81 - 86.

Rödel, W., Scheuer, R. und Wagner, H. (1989): Neues Verfahren zur Bestimmung der Wasseraktivität bei Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft*, Band 69, Seite 1396 - 1399.

Rolle, M. und Mayr, A. (2007): *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 8. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart.

Ross, S.S. und Morris, E.O. (1965): An investigation of the yeast flora of marine fish from Scottish coastal waters and a fishing ground off Iceland. *Journal of Applied Microbiology*, Band 28 (Nr. 2), Seite 224 - 234.

Salo, S. und Wirtanen, G. (2005): Disinfectant efficacy on foodborne spoilage yeast strains. *Food and bioproducts processing*, Band 83 (Nr. 4), Seite 288 - 296.

Sanz, A., Martín, R., Mayoral, M.B., Hernández, P.E., González, I. und Lacarra, T.G. (2005): Development of a PCR-culture technique for rapid detection of yeast species in vacuum packed ham. *Meat science*, Band 71 (Nr. 2), Seite 230 - 237.

Savard, T., Beaulieu, C., Gardner, N.J. und Champagne, C.P. (2002): Characterization of spoilage yeasts isolated from fermented vegetables and inhibition by lactic, acetic and propionic acids. *Food Microbiology*, Band 19 (Nr. 4), Seite 363 - 373.

Savell, J.W. (2012): Dry-Aging of beef – Executive Summary. URL: <http://www.beefresearch.org/CMDocs/BeefResearch/Dry%20Aging%20of%20Beef.pdf>
(Zugriffsdatum: 01.08.2012)

Schliesser, T. und Strauch, D. (1981): Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft. Enke Verlag, Stuttgart.

Schmidt-Lorenz, W. (1979): Mikrobiologisch-hygienische Anforderungen an die küchentechnischen Erhitzungs- und Kühlverfahren. *Swiss food*, Band 1, Seite 27 - 41.

Schwägele, F. (2003): Struktur und Funktion des Muskels. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung Kulmbach* 42, Nr. 162, Seite 339 - 346.

Seideman, S.C. und Durland, P.R. (1982): Vacuum packaging of fresh beef: A review. *Journal of Food Quality*, Band 6 (Nr. 1), Seite 29 - 47.

Seideman, S.C., Vanderzant, C., Hanna, M.O., Carpenter, Z.L. und Smith, G.C. (1976): Effect of various types of vacuum packages and length of storage on the microbial flora of wholesale and retail cuts of beef. *Journal of Food Science*, Band 39 (Nr.11), Seite 745 - 753.

Seiler, H. und Busse, M. (1988): Identifizierung von Hefen mit Mikrotiterplatten. *Forum Mikrobiologie*, Band 11, Seite 505 - 509.

Shaw, B.G., Harding, C.D. und Taylor, A.A. (1980): The microbiology and storage of vacuum packed lamb. *International Journal of Food Science and Technology*, Band 15 (Nr. 4), Seite 397 - 405.

Shay, B.J. und Egan, A.F. (1981): Hydrogen sulphide production and spoilage of vacuum-packaged beef by a *Lactobacillus*. *Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity*. Academic Press, London, Seite 241 - 251.

Signorini, M.L., Ponce-Alquicira, E. und Guerrero-Legarreta, I. (2006): Effect of lactic acid and lactic acid bacteria on growth of spoilage microorganisms in vacuum-packaged beef. *Journal of Muscle Foods*, Band 17 (Nr. 3), Seite 277 - 290.

Simoncini, N., Rotelli, D., Virgili, R. und Quintavalla, S. (2007): Dynamics and characterization of yeast during ripening of typical Italian dry-cured ham. *Food Microbiology*, Band 24, Seite 577 – 584

Smith, R.D. (2007): Dry aging beef for the retail channel. Master of Science Thesis, Texas.

Sutherland, J.P., Patterson, J.T. und Murray, J.G. (1975): Changes in the microbiology of vacuum-packaged beef. *Journal of Applied Bacteriology*, Band 39, Seite 227 - 237.

Tändler, K. und Heinz, G. (1970a): Frischfleischreifung im Vakuumbutel. 1. Mitteilung, *Fleischwirtschaft*, Band 50 (Nr. 9), Seite 1185 - 1190.

Tändler, K. und Heinz, G. (1970b): Frischfleischreifung im Vakuumbutel. 2. Mitteilung, *Fleischwirtschaft*, Band 50 (Nr. 10), Seite 1371 - 1374.

Tändler, K. und Lee, K.T. (1985): Haltbarkeit von Frischfleisch - Teilstücken in hochgasdichten Folienpackungen, *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung Kulmbach* Nr. 88, Seite 6452 - 6457.

Thomas-Hall, R., Turchetti, B., Buzzini, P., Branda, E., Boekhout, T., Theelen, B. und Watson, K. (2010): Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps - description of three novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia blollopis* sp. nov. and *Mrakiella niccombsii* sp. nov., *Extremophiles*, Band 14, Seite 47 - 59.

Török, T. und King, A.D. Jr. (1991): Comparativ study on the identification of food-borne yeasts. *Environmental Microbiology*, Band 57 (Nr. 4), Seite 1207 - 1212.

Turchetti, B., Buzzini, P., Goretti, M., Branda, E., Diolaiuti, G., D'Agata, C., Smiraglia, C. und Vaughan-Martini, A. (2008): Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. *Fems Microbiology Ecology*, Band 63, Seite 73 - 83.

Türck, N.C. (2008): Sensorische und mikrobiologische Untersuchungen zur Beurteilung von Wildfleisch. Vet. Med. Diss., Hannover.

Van der Walt, J.P. (1970): Criteria und methods used in classification. *In* Lodder, J. (1970): *The Yeast - A taxonomic study*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London, Seite 34 - 107.

Viljoen, B.C., Geornaras, I., Lamprecht, A. und von Holy, A. (1998): Yeast populations associated with processed poultry. *International Journal of Food Microbiology*, Band 15 (Nr. 1), Seite 113 - 117.

Warren, K.E. und Kastner, C.L. (1992): A comparison of dry-aged and vacuum-aged beef strip loins. *Journal of Muscle Foods*, Band 3 (Nr. 2), Seite 151 - 157.

Wenning, M., Seiler, H. und Scherer, S. (2002): Fourier-transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, Band 68 (Nr. 10), Seite 4717 - 4721.

Westall, S. und Filtenborg, O. (1998): Spoilage yeasts of decorated soft cheese packed in modified atmosphere. *Journal of Food Microbiology*, Band 15 (Nr. 2), Seite 243 - 249.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. und Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, Seite 315 - 322.

Wickerham, L.J. und Burton, K.A. (1948): Carbon assimilation tests for the classification of yeasts. *Journal of bacteriology*, Band 56 (Nr. 3), Seite 363 - 371.

Wiegner, J. (1985): Sensorische Analyse, mikrobiologischer Befund und D(-)-Lactat-Konzentration als Parameter zur Frischecharakterisierung von vakuumverpacktem Rindfleisch. Vet. med. Diss., FU Berlin.

Winkelmayer, R. (2000): Wildbrethygiene zwischen Theorie und Praxis - mit einer kritischen Würdigung der österreichischen Wildfleisch-Verordnung. Tagung für die Jägerschaft, Gumpenstein.

Yarrow, D. (1998): Methods for the isolation, maintenance and identifications of yeasts. *In* Kurtzmann, C.P. und Fell, J.W., *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Elsevier, New York, Seite 77 - 99.

Ziegler, E. (2009): Untersuchungen zum Nachweis und Vorkommen von *Clostridium estertheticum* in vakuumverpacktem Rindfleisch. Vet. Med Diss., LMU München.

Verwendete Normen und Rechtstexte:

ASU L 00.00-88 - Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (2004): Horizontales Verfahren für die Zählung von Mikroorganismen; Koloniezählverfahren bei 30 °C (nach DIN EN ISO 4833). Beuth Verlag, Berlin.

ASU L 00.90-6 - Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (1997): Sensorische Prüfverfahren, einfache beschreibende Prüfung (nach DIN 10964). Beuth Verlag, Berlin.

DIN 10516 (2009): Lebensmittelhygiene - Reinigung und Desinfektion. Beuth Verlag, Berlin.

Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit (EU-Basisverordnung für Lebensmittelhygiene) (Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 31/1 vom 1.2.2002).

Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene. (Amtsblatt der Europäischen Union L 139 vom 30.4.2004).

Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs. (Amtsblatt der Europäischen Union L 139 / 55 vom 30.04.2004).

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. (Amtsblatt der Europäischen Union L 338 vom 22.12.2005).

Verordnung über die Kennzeichnung von Lebensmitteln (Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung – LMKV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 15. Dezember 1999 (Bundesgesetzblatt I S. 2464).

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Kabisch, J., Höning, C., Böhnlein, C., Pichner, R., Gareis, M. und Wenning, M. (2013): *Kazachstania psychrophila* sp. nov., a novel psychrophilic yeast isolated from vacuum-packed beef. *Antonie van Leeuwenhoek*, Band 104 (Nr. 3), Seite 1 - 7.

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung von Mikroorganismen nach ihren Temperaturanforderungen in Bezug auf ihr Wachstumsvermögen (nach Anonymus, 1980; Fehlhaber, 1992; Krämer, 2002; Schmidt-Lorenz, 1979).....	12
Tabelle 2: Übersicht über das Vorkommen von psychrotoleranten Hefegattungen auf verschiedenen tierischen Lebensmitteln (nach Asefa et al., 2009; Bai et al., 2010; Baxter und Illston, 1976 und 1977; Dalton et al., 1984; Deák, 2008; Dillon et al.,1991; Dillon und Board, 1991; Diriyee et al., 1993; Engel, 1986a; Engel, 1986b; Fleet, 1990; Fleet und Mian,1987; Ismail et al., 2000 und 2006; Kobatake et al.,1992; Komagata und Nakase, 1965; Lowry und Gill, 1984; Moreira et al., 2001; Nielsen et al., 2008; Phaff et al., 1966; Prillinger et al., 1999; Ross und Morris, 1965; Simoncini et al., 2007; Viljoen et al.,1998; Westall und Filtenborg, 1998)	21
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Hefereferenzstämme	28
Tabelle 4: Übersicht über Fleischart und Anzahl der Proben der Marktstudie	29
Tabelle 5: Nährmedien und deren Inkubationsbedingungen für die mikrobiologische Untersuchung.....	32
Tabelle 6: Mastermixherstellung für die PCR zur Sequenzierung von Hefen.....	36
Tabelle 7: Cycloerprogramm zur Vervielfältigung der Hefe-DNA zur Sequenzierung	37
Tabelle 8: Zusammenstellung der Hefestämme für die Beimpfungspools	44
Tabelle 9: Nährböden und Inkubationsbedingungen für die mikrobiologischen Untersuchungen bei Challengeversuchen.....	47
Tabelle 10: Zusammenstellung der Hefestämme für die Desinfektionsmittelversuche	48
Tabelle 11: Wirkstoffgruppen und Einwirkzeiten verwendeter Desinfektionsmittel ..	50
Tabelle 12: Einteilung der Isolate anhand der Koloniemorphologie (Farbe, Konsistenz, Kolonieforn) auf MEA ⁺ -, GYP- und YGC-Nährböden	64
Tabelle 13: Wachstum der Hefen der Isolatgruppen bei unterschiedlichen Temperaturen (+ 4 °C und + 25 °C) auf MEA ⁺ -Nährboden nach 14 Tagen.....	66
Tabelle 14: Identifizierung der Isolatgruppen durch das FTIR	67

Tabelle 15: Taxonomische Zuordnung der Hefeisolate auf Basis der Sequenzierungsergebnisse (D1/D2- und ITS-Domäne) sowie Nachweishäufigkeit und Fleischart der Proben	69
Tabelle 16: Übersicht über die Zuordnung der Isolate zu den Proben der Marktstudie und über ihr Koloniewachstum auf GYP-, MEA ⁺ - und YGC-Nährboden.....	70
Tabelle 17: Übersicht ausgewählter Ergebnisse der physiologischen Charakterisierung von <i>Kazachstania psychrophila</i>	79
Tabelle 18: Wirksamkeit der ausgewählten Desinfektionsmittel gegenüber den unterschiedlichen Hefepools (Ansatz 1, 2, 3, 4, 5, 6), die auf Schneidebretter mit glatter Oberfläche aufgeimpft wurden (ohne Anreicherung)	101
Tabelle 19: Wirksamkeit der ausgewählten Desinfektionsmittel gegenüber den unterschiedlichen Hefepools (Ansatz 1, 2, 3, 4, 5, 6), die auf Schneidebretter mit glatter Oberfläche aufgeimpft wurden (nach 7 Tagen Anreicherung)	102
Tabelle 20: Wirksamkeit der ausgewählten Desinfektionsmittel gegenüber den unterschiedlichen Hefepools (Ansatz 1, 2, 3, 4, 5, 6), die auf Schneidebretter mit rauer Oberfläche aufgeimpft wurden (ohne Anreicherung).....	103
Tabelle 21: Wirksamkeit der ausgewählten Desinfektionsmittel gegenüber den unterschiedlichen Hefepools (Ansatz 1, 2, 3, 4, 5, 6), die auf Schneidebretter mit rauer Oberfläche aufgeimpft wurden (nach 7 Tagen Anreicherung).....	104
Tabelle 22: Übersicht über Herkunft und die sensorische Beurteilung der Proben der Marktstudie.....	151
Tabelle 23: Übersicht über das Vorkommen von Mikroorganismen und Hefen bei der mikroskopischen Tropfsaftuntersuchung der Proben der Marktstudie.....	152
Tabelle 24: Ergebnisse der Untersuchung der Handelsproben (Untersuchung A). 154	
Tabelle 25: Ergebnisse der Untersuchung der Handelsproben (Untersuchung B) 155	
Tabelle 26: Literaturangaben der Ergebnisse der physiologischen Charakterisierung für die Referenzstämme <i>Kazachstania unispora</i> (CBS 398), <i>servazii</i> (CBS 4311) und <i>Iodderae</i> (CBS 2757) sowie Ergebnisse der eigenen Untersuchung der Hefen der Isolatgruppe 13 (<i>Kazachstania psychrophila</i>).....	156

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Unterschiedliche Temperaturbereiche, in denen verschiedene Mikroorganismen ein Wachstum zeigen (De Lorenzo, 2010)	13
Abbildung 2: Übersicht über die Systematik der echten Pilze und taxonomische Einordnung der Hefen (nach Hibbett et al., 2007; Rolle und Mayr, 2007)	14
Abbildung 3: Ascosporenbildung einer Hefezelle mit Ascus (1) und Ascospore (2); (A = Ascus, eigene, schematische Darstellung; B = Ascus, Bild aus eigenen Untersuchungen)	15
Abbildung 4: Übersichtsschema über die Vorgehensweise bei der Untersuchung der vakuumverpackten Fleischproben der Marktstudie	30
Abbildung 5: Übersicht über die Vorgehensweise bei der Untersuchungen der isolierten Hefen (GYP = Glucose-Yeastextract-Pepton-Agar; MEA ⁺ = Malzextrakt-Agar + Novobiocin; YGC = Yeastextract-Glucose-Chlor-amphenicol-Agar + Bromphenol-blau)	34
Abbildung 6: Beurteilungsschema des Hefewachstums in Minitekplatten (A = kein Wachstum; B = schwaches Wachstum; C = deutliches Wachstum; Bilder aus eigenen Untersuchungen)	41
Abbildung 7: Vorbehandlung des Fleischstückes zur Reduzierung der Keime auf der Oberfläche (A = Abreiben der Fleischoberfläche mit Ethanol; B = Abflammen der Fleischoberfläche)	45
Abbildung 8: Arbeitsschritte bei der Präparation der Rinderschwanzrollen zur Gewinnung keimarmen Fleischscheiben (A = Abschälen der Fleischoberfläche; B = Abgeschälte Schwanzrolle; C = Herausschneiden der Fleischscheiben; D = Schwanzrolle nach Präparation)	46
Abbildung 9: Beimpfung der keimarmen Fleischstücke mit Hefelösung (A und B) und Verpacken der Proben (C)	46
Abbildung 10: Zugeschnittene Schneidebretter (A = Testplättchen mit glatter Oberfläche; B = Testplättchen mit eingeritzter Oberfläche)	49
Abbildung 11: Beimpfung der Testplättchen mit 0,1 ml der Hefelösung	50
Abbildung 12: Behandlung des beimpften Testplättchens durch Eintauchen in die jeweilige Desinfektionslösung	51

Abbildung 13: Ausmaß und Bewertung der Gasbildung beispielhaft anhand von Proben aus Challengeversuchen (A = keine Gasbildung; B = geringgradige Gasbildung; C = mittelgradige Gasbildung; D = hochgradige Gasbildung).....	53
Abbildung 14: Anzahl der Fleischtropfsaftproben der Marktstudie, bei denen Hefen lichtmikroskopisch nachgewiesen werden konnten.....	54
Abbildung 15: pH-Werte der untersuchten vakuumverpackten Fleischproben aus der Marktstudie (die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus den beiden Untersuchungsansätzen).....	55
Abbildung 16: a_w -Werte der untersuchten vakuumverpackten Fleischproben aus der Marktstudie (die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus den beiden Untersuchungsansätzen).....	55
Abbildung 17: Aerobe, mesophile Keimzahl (KbE/cm^2) der untersuchten Proben aus der Marktstudie (die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus den beiden Untersuchungsansätzen; * Proben, für die keine Werte existieren, da deren Keimzahl unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze von $10^2 \text{ KbE}/\text{cm}^2$ liegt).....	56
Abbildung 18: Milchsäurebakterienanzahl (KbE/cm^2) der untersuchten Proben aus der Marktstudie (die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus den beiden Untersuchungsansätzen; * Proben, für die keine Werte existieren, da deren Keimzahl unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze von $10^2 \text{ KbE}/\text{cm}^2$ liegt).....	57
Abbildung 19: Enterobacteriaceenanzahl (KbE/cm^2) der untersuchten Proben aus der Marktstudie (die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus den beiden Untersuchungsansätzen; * Proben, für die keine Werte existieren, da deren Keimzahl unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze von $10^2 \text{ KbE}/\text{cm}^2$ liegt).....	58
Abbildung 20: Pseudomonadenanzahl (KbE/cm^2) der untersuchten Proben aus der Marktstudie (die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus den beiden Untersuchungsansätzen; * Proben, für die keine Werte existieren, da deren Keimzahl unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze von $10^2 \text{ KbE}/\text{cm}^2$ liegt; \bullet der Wert von Wildprobe 7 wurde aufgrund der hohen Keimzahl von $> 10^7 \text{ KbE}/\text{cm}^2$ aus Darstellungsgründen mit $10^8 \text{ KbE}/\text{cm}^2$ angegeben).....	59

- Abbildung 21:** Hefeanzahl (KbE/cm²) der untersuchten Proben aus der Marktstudie bei + 25 °C (die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus den beiden Untersuchungsansätzen; * Proben, für die keine Werte existieren, da deren Keimzahl unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze von 10² KbE/cm² liegt)..... 60
- Abbildung 22:** Hefeanzahl (KbE/cm²) der untersuchten Proben aus der Marktstudie bei + 4 °C (die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus den beiden Untersuchungsansätzen; * Proben, für die keine Werte existieren, da deren Keimzahl unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze von 10 KbE/cm² liegt)..... 61
- Abbildung 23:** Übersicht zum Nachweis psychrotoleranter Hefen bei Fleischproben aus der Marktstudie, die bei + 4 °C isoliert wurden 61
- Abbildung 24:** Vereinzeln eines Isolates von der MEA⁺-Platte der Handelsprobe auf drei unterschiedlichen Nährböden (MEA⁺ = Malzextrakt-Agar + Novobiocin; GYP = Glucose-Yeastextract-Pepton-Agar; YGC = Yeastextract-Glucose-Chloramphenicol-Agar + Bromphenol-blau) 62
- Abbildung 25:** Darstellung der unterschiedlichen Bewertungen des temperaturabhängigen Wachstums von Hefekolonien (A = fehlendes Wachstum; B = schwaches Wachstum; C = deutliches Wachstum; Bilder aus eigenen Untersuchungen) 65
- Abbildung 26:** Ergebnisse der PCR von 15 Hefeisolaten für die Sequenzierung (1 - 15 = Hefeisolate; * = Längenstandard (50 bp - 2 kb); + = Positivkontrolle (*Mrakia gelida*, MRI-Stamm H 378); - = Negativkontrolle) 68
- Abbildung 27:** Wachstum von *Kazachstania psychrophila* (Isolatgruppe 13) auf unterschiedlichen Nährböden nach Inkubation bei + 4 °C über 20 Tage (A = GYP (Glucose-Yeast-Pepton-Agar); B = MEA⁺ (Malzextrakt-Agar + Novobiocin); C = YGC (Yeast-Glucose-Chloramphenicol-Agar) 74
- Abbildung 28:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Kazachstania psychrophila* (A = Mutterzellen (1) mit Sprossnarben (2) und Tochterzellen (3); B = Hefezellen in verschiedenen Stadien der Sprossung; C = Verband aus Hefezellen; D = Pseudohyphe (4)); Vergrößerung: A = 10000fach; B = 7000fach; C = 4500fach; D = 5000fach 75
- Abbildung 29:** Bildung von Ascosporen von *Kazachstania psychrophila* nach Anzucht auf 2 %igem Malzextrakt-Agar bei + 10 °C über 28 Tage (A = Hefezelle (1) mit vier Ascosporen (2); B = Hefezelle (1) mit zwei Ascosporen (2))..... 76

- Abbildung 30:** Stammbaum basierend auf der D1/D2-Region der großen Unter-einheit (26S) des rDNA-Gens, welcher die Verwandtschaft zwischen *Kazachstania psychrophila* und anderen *Kazachstania*-Spezies (Typ-Stämme) (nach Kabisch et al., 2013)..... 77
- Abbildung 31:** Verlauf der pH-Werte der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Candida* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung) 80
- Abbildung 32:** Verlauf der a_w -Werte der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Candida* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung) 81
- Abbildung 33:** Verlauf der aeroben, mesophilen Keimzahl der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Candida* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²)..... 82
- Abbildung 34:** Verlauf der Keimzahl der Milchsäurebakterien der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Candida* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²)..... 83
- Abbildung 35:** Verlauf der Keimzahl der Enterobacteriaceen der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Candida* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²)..... 83
- Abbildung 36:** Verlauf der Keimzahl der Hefen der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Candida* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²) 84

- Abbildung 37:** Veränderung der Fleisch- und Tropfsaftfarbe sowie die Gasbildung der vakuumverpackten und mit *Candida* spp. beimpften Rindfleischproben in Woche 5 (A), 6 (B), 8 (C) und 12 (D) bei einer Lagerung über 12 Wochen bei + 2 °C..... 85
- Abbildung 38:** Verlauf der pH-Werte der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Mrakia* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung) 86
- Abbildung 39:** Verlauf der a_w -Werte der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Mrakia* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung) 87
- Abbildung 40:** Verlauf der aeroben, mesophilen Keimzahl der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Mrakia* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²)..... 88
- Abbildung 41:** Verlauf der Keimzahl der Milchsäurebakterien der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Mrakia* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²) 89
- Abbildung 42:** Verlauf der Keimzahl der Enterobacteriaceen der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Mrakia* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²)..... 90
- Abbildung 43:** Verlauf der Keimzahl der Hefen der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Mrakia* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²) 91

- Abbildung 44:** Veränderung der Fleisch- und Tropfsafffarbe sowie die Gasbildung der vakuumverpackten und mit *Mrakia* spp. beimpften Rindfleischproben in Woche 0 (A), 4 (B), 8 (C) und 12 (D) bei einer Lagerung über 12 Wochen bei + 2 °C..... 92
- Abbildung 45:** Verlauf der pH-Werte der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Kazachstania* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung) 93
- Abbildung 46:** Verlauf der a_w -Werte der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Kazachstania* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung) 94
- Abbildung 47:** Verlauf der aeroben, mesophilen Keimzahl der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Kazachstania* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²)..... 95
- Abbildung 48:** Verlauf der Keimzahl der Milchsäurebakterien der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Kazachstania* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²)..... 96
- Abbildung 49:** Verlauf der Keimzahl der Enterobacteriaceen der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Kazachstania* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²)..... 97
- Abbildung 50:** Verlauf der Keimzahl der Hefen der vakuumverpackten Rindfleischproben (mit *Kazachstania* spp. beimpfte Proben und unbeimpfte Kontrollproben) über einen Zeitraum von 84 Tagen bei + 2 °C (aufgetragen sind die Medianwerte des Dreifachansatzes und die Standardabweichung; quantitative Nachweisgrenze bei 10 KbE/cm²) 98

Abbildung 51: Veränderung der Fleisch- und Tropfsaffarbe sowie die Gasbildung der vakuumverpackten und mit <i>Kazachstania</i> spp. beimpften Rindfleischproben in Woche 4 (A), 6 (B), 8 (C) und 12 (D) bei einer Lagerung über 12 Wochen bei + 2 °C	99
---	----

11 Anhang

11.1 Material

11.1.1 Kulturelle Verfahren

a_w -Kryometer AWK-20 [NAGY]

CO-Reagenz jeweils frisch zubereitet zu gleichen Teilen aus:

50 mM 1-Naphtol in 50 %igem Ethanol

50 mM N, N Dimethyl 1,4-phenylendiamin in A. dest.

Desoxycholate-Hydrogen-Sulfide-Lactose-Agar (DHL) n. Sakazaki [Merck, 1.11435]

Drigalski-Spatel aus Edelstahl

Glucose-Yeastextract-Pepton-Agar (GYP):

5 g Hefeextrakt [Merck, 1.03753]

20 g Glucose [Merck, 1.08342]

10 g Pepton [Merck, 1.07043]

20 g Agar [Merck, 1.01614]

ad 1000 ml A. dest.

Lactobacillus-Agar (MRS) nach de Man, Regosa und Sharpe [Oxoid, CM0361]

Löfflers Methylenblau-Lösung [Merck, 1.01287]

Malzextrakt⁺-Agar (MEA⁺):

48 g Malzextrakt-Agar [Merck, 105398]

125 mg Novobiocin [Sigma, N1628-25G]

ad 1000 ml A. dest.

Malzextrakt-Agar 2 %ig:

20 g Malzextrakt [Merck, 1.05398]

20 g Agar [Merck, 1.01614]

ad 1000 ml A. dest

Mixgerät Stomacher[®] 400 *Circulator* [Seward]

Peptonwasser [Merck, 107228]

Petrischalen [Greiner; 633180]

Petrischalen-Abfüllgerät Technomat [Integra Biosciences]

pH-Meter pH 526 [WTW]

Pinzette aus Edelstahl

Pufferlösung pH 4,00 [Merck, 1.09435]

Pufferlösung pH 7,00 [Merck, 1.09439]

Rinderserum [ACILA, 2202012]
Schneidbretter, Polyethylen [Metzger Genossenschaft Bayreuth, 23566]
Skalpellklingen, steril [Martin]
Standard I-Agar [Merck; 1.07881]
Standard I-Nährboullion [Merck, 1.07882]
Stomacher Beutel mit Filtereinsatz [Interscience; 043809]
Yeastextract-Glucose-Chloramphenicol-Agar (YGC):
 5 g Hefeextrakt [Merck, 1.03753]
 20 g Glucose [Merck, 1.08342]
 0,1 g Chloramphenicol [Sigma, C0378]
 10 g Agar [Merck, 1.01614]
 10 mg Bromphenolblau [Merck, 1.03026]
 ad 1000 ml A. dest.
Zählkammer nach Thoma [Optik Labor]

11.1.2 Polymerasekettenreaktion und Sequenzierung

Agarose [Biozym, 840004]
AmpliAq Gold[®] 250 Units [Roche, 4311806]
Desoxynucleoside Triphosphate Set 2mM (dNTP-Mix) [Fermentas, #R0242]
DNeasy Blood and Tissue Preparation Kit [Quiagen, 69504]
Einmalküvetten für Fotometer [Brand, 759200]
Elektrophoresekammern Agagel midi-wide und Agagel mini [Biometra; 020-000]
Ethidiumbromidlösung 1 %ig [Roth, 2218.1]
Fotometer [Thermo Fisher Scientific, Biomate 3]
Gel-Loading-Puffer:
 62,5 mg Bromphenolblau [Merck, 108122]
 62,5 mg Xylencyanol [Merck, 110590]
 6,25 g Ficoll Typ 400 [Sigma-Aldrich, F4375-10G]
Heizblockschüttler [Eppendorf, Thermomixer comfort]
Ladder Quantitas 50 bp - 2 kb [Biozym, 250204]
LAL-Wasser [ACILA, 1715005]
Lyticase [Sigma-Aldrich, L2524-10KU]
MgCl₂-Solution 25 mM [Roche]
Phosphate buffered saline (PBS) pH 7,5:
 8,50 g Natriumchlorid [Merck, 1.06400]
 1,14 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄ x 12 H₂O) [Merck, 1.06579]

0,50 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) [Merck, 1.04073]

ad 1000 ml A. dest.

PCR-Cooler [Eppendorf]

PCR Gold Puffer 10x [Roche, LO 0026-01]

PCR-Werkbank [Peglab]

Pipetten-Spitzen 10 μl , 100 μl , 1000 μl [Eppendorf]

Pipetten-Spitzen mit Filtereinsatz 10 μl , 200 μl , 1000 μl [Biozym]

Primer ITS 1; 10mM [Eurofins, MWG Operon]:

5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'

Primer ITS 4; 10mM [Eurofins, MWG Operon]:

5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

Primer NL 1; 10 mM [Eurofins, MWG Operon]:

5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3'

Primer NL 4; 10 mM [Eurofins, MWG Operon]:

5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3'

Power Supplies (Biometra, Standard Power Pack P25)

QIAquick PCR Purifikation Kit [Qiagen, Cat. No. 28104]

Reaktionsgefäße 0,2 ml, 1,0 ml und 1,5 ml [Eppendorf]

Sorbitol-Puffer:

1M Sorbitol [VWR, 36404.36]

100 mM Natrium-EDTA [VWR, KRAF06200.2600]

14 mM β -Mercaptoethanol [Merck, 8.05740.0250]

ad 100 ml A. dest.

TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) Stammlösung:

890 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan [Merck, 1.08382]

890 mM Borat [Merck, 1.00165]

25 mM EDTA; pH 8,0 [Merck, 1.08418]

ad 1000 ml A. bidest

TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) Gebrauchslösung:

100 ml TBE-Puffer Stammlösung

ad 1000 ml A. bidest

Thermocycler [Biometra, T personal]

Transilluminator mit Fotoeinheit [Biometra]

Zentrifuge [Eppendorf, Minispin plus]

Zentrifuge [Hettich, Mikro 22 R]

11.1.3 Physiologische Charakterisierung

Adonitol (Ribitol) [Sigma, A5502]

L-Arabinose [Merck, 1492]

Arbutin (Hydrochinon- β -D-glucopyranosid) [Schuchardt München]

Cellobiose [Merck, 1.02352]

Citronensäure-Monohydrat [Merck, 1.00244]

Creatin [Merck, 1.05205]

Creatinin [Schuchardt München]

Dulcitol (Galacitol) [Fluka, 44590]

Einwegspritze, 20 ml [Braun]

Ethanol, absolut [Merck, 1.00983]

Meso-Erythrit [Merck, 1.03160]

Fast-Blue-B-Salz (o-Dianisidinedihydrochlorid) [Sigma, F5803]

D-Galactose [Serva, 22020]

D-Gluconic Acid Sodium Salt (Gluconsäure) [Sigma, G9005]

Methyl- α -D-Glucopyranoside (Glucosid) [Sigma, M9376]

D(+)-Glucosaminhydrochlorid (Glucosamin) [Sigma, G4875]

D(+)-Glucose-Monohydrat [Merck, 1.08342]

Glycerol [Merck, 1.04094]

Harnstoff-Agar nach Christensen:

1 g Caseinpepton [Merck, 1.07213]

1 g Glucose [Merck, 1.08342]

5 g Natriumchlorid [Merck, 1.06404]

1,2 g Dikaliumhydrogenphosphat [Merck, 1.05104]

0,8 g Kaliumdihydrogenphosphat [Merck, 1.04873]

0,012 g Phenolrot [Merck, 1.07241]

8 g Agar [Merck, 1.01614]

ad 1000 ml A. Dest

n-Hexadecan [Merck, 820633]

Inulin [Sigma, I2255]

Kaliumnitrat (Nitrat) [Merck, 1.05063]

Lactic acid [Sigma, W261114]

Lactose [Merck, 1.07656]

D-Maltose [Merck, 1.05912]

D(-)-Mannitol [Calbiochem, 443907]

- α -D-Melezitose [Serva, 28550]
Melibiose [BD, 217310]
Methanol [Merck, 1.06018]
Myo-Inosit [Merck, 1.04728]
Natriumchlorid [Merck, 1.06404]
Natriumnitrit (Nitrit) [Merck, 1.06549]
Paraffin [Merck, 1.07160]
Raffinose (Melitose) [Merck, 1.07549]
L(+)-Rhamnose-Monohydrat [Merck, 1.07361]
D-Ribose [Schuchardt München]
D(-)-Salicin [Merck, 1.07665]
L-Sorbose [Sigma, 85541]
D-Sorbitol (D-Glucitol) [Sigma, 240850]
Spritzenfilter, 22 μ m, steril [Roth, Rotilabo P666.1]
Stärke, löslich [Merck, 1.01252]
Succinic Acid (Succinylsäure) [Sigma, S9512]
Sucrose [USB, 21938]
D(+)-Trehalose [Sigma, T5251]
Vitaminfreies Medium:
 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Ammoniumsulfat) [Merck, 1.01217]
 10 g Glucose [Merck, 1.08342]
 10 mg L-Histidin [Merck, 1.04351]
 20 mg D/L-Methionin [Sigma, M9500]
 20 mg D/L-Tryptophan [Sigma, T3300]
 500 μ g H_3BO_3 (Borsäure) [Merck, 1.00165]
 40 μ g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (Kupfersulfat) [Merck, 1.02790]
 100 μ g KI (Kaliumjodid) [Merck, 1.05043]
 200 μ g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (Eisenchlorid) [Merck, 1.03943]
 400 μ g $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ (Mangansulfat) [Sigma, M7634]
 200 μ g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Natriummolybdat) [Merck, 1.06521]
 400 μ g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (Zinksulfat) [Merck, 1.08883]
 850 mg KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat) [Merck, 1.04873]
 150 mg K_2HPO_4 (di-Kaliumhydrogenphosphat) [Merck, 1.05104]
 500 mg $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (Magnesiumsulfat) [Merck, 1.05886]
 100 mg NaCl (Natriumchlorid) [Merck, 1.06404]
 100 mg $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (Kalziumchlorid) [Sigma, 442909]

ad 1000 ml A. dest

Yeast Carbon Base [BD Difco, 239210]

Yeastextract-Glucose-Chloramphenicol-Agar 50 %ig (YGC 50 %ig):

2,5 g Hefeextrakt [Merck, 1.03753]

500 g Glucose [Merck, 1.08342]

0,05 g Chloramphenicol [Sigma, C0378]

10 g Agar [Merck, 1.01614]

ad 500 ml A. dest.

Yeast Nitrogen Base [BD Difco, 295977]

D(+)-Xylose [Merck, 1.08689]

Zellkulturtestplatte 24 Wells [Orange Scientific, 5530300]

11.1.4 Challengeversuche

Jungbullen-Schwanzrolle, schlachtfrisch [Schlacht- und Zerlegebetrieb in Bayern]

Vakuumbbeutel PA/PE 20/70 [Metzgereigenossenschaft Bayreuth, SR11191]

Vakuumiergerät [Multivac, C300]

11.1.5 Desinfektionsmittelversuche

Antisept[®] A [Seewald-Chemie]

Antisept[®] PES 33 [Ernst GmbH & Co. KG, KAMEN]

Antisept[®] 10 [Seewald-Chemie]

Ethanol absolut [Merck, 1.00983]

Mucocit[®] B [Merz Hygiene GmbH]

Peptonwasser [Merck, 107228]

Rinderserum [ACILA, 2202012]

Schneidbretter aus Polyethylen [Metzgergenossenschaft Bayreuth, 23566]

Steril[®] [Zentrag, 210]

Wofasteril[®] E 400 [Kesla Pharma Wolfen GmbH]

Xyloquat[®] Plus [MF-Clean Technik]

11.1.6 Sonstige Materialien und Geräte

Aluminiumfolie

Analysenwaage [Sartorius, KBBA100]

Aqua bidest.

Aqua dest.

Autoklav [Fedegari, FVA 2/A1; NB 1691AM]

Becherglas [Schott]

Bruträume 15 °C, 25 °C, 30 °C und 37 °C [Weiss]

Bunsenbrenner [Bochem]

Deckgläser für Objektträger; 24 x 24 mm [Gerhard Menzel GmbH, BB020020A1]

Dosiergerät [IBS Integra Biosciences, Dose-it 803]

Erlenmeyerkolben [Schott]

Fotoeinheit für Mikroskop [Leica EC 3]

Glaspipetten 1 ml, 2 ml, 5 ml und 10 ml [Brand]

Glutaraldehyd-Lösung [Merck, 820603]

Gefriertrocknungsanlage [Christ, alpha 2 - 4, Typ - Nr.100402]

Gefriertrocknungsstopfen [Macherey-Nagel, 702N20GT]

Immersionsöl [Merck, 1.15577]

Impfösen aus Platindraht

Impfösen aus Kunststoff, steril [VWR, 612-9354]

Kapsenbergkapseln [VWR, 391-0911]

Kritisch-Punkt-Gerät [Balzers Union, CPD 030]

Kühlraum 4 °C [Weiss]

Kühlgefrierkombination [Liebherr, Gastroline]

Magermilchpulver [Merck, 1.15363]

Mikroskop [Leica, Leitz Biomed]

Mikroskopkamera mit Software [Leica, EC3]

Mikrowelle [Privileg, 8019]

Mulinette [Moulinex]

Objektträger [Marienfeld]

Pipettierhilfe [VWR]

Physiologische Kochsalzlösung:

8,5 g Natriumchlorid [Merck, 1.06404]

ad 1000 ml A. dest.

Probengläser mit Rollrand [Macherey-Nagel, 70204.36]

Rasterelektronenmikroskop [Hitachi, S3000N]

Reagenzgläser Ø 16 mm [Schott]

Waage [Mettler Toledo, LabStyle 602]

Waage [Sartorius, Typ 1409004]

Vortex [Scientific Industries, Vortex Genie 2]

11.2 Marktstudie

Tabelle 22: Übersicht über Herkunft und die sensorische Beurteilung der Proben der Marktstudie

Probe	Herkunft	Gasbildung	Geruch	Farbe
Rind-01	Deutschland	-	produkttypisch	produkttypisch
Rind-02	Deutschland	-	produkttypisch	produkttypisch
Rind-03	Deutschland	-	untypischer Reifegeruch	produkttypisch
Rind-04	Deutschland	mittelgradig	untypischer Reifegeruch	produkttypisch
Rind-05	Deutschland	mittelgradig	produkttypisch	produkttypisch
Rind-06	Schweiz	-	produkttypisch	produkttypisch
Rind-07	Schweiz	hochgradig	faule Eier, sauer	Tropfsaft gelblich
Rind-08	Schweiz	hochgradig	faule Eier, sauer	Tropfsaft gelblich
Rind-09	Deutschland	-	produkttypisch	produkttypisch
Rind-10	Deutschland	-	produkttypisch	produkttypisch
Rind-11	Deutschland	-	muffig, alt	Tropfsaft grünlich
Rind-12	Deutschland	-	produkttypisch	produkttypisch
Rind-13	Deutschland	-	produkttypisch	produkttypisch
Rind-14	USA	-	muffig, säuerlich	Fett grünlich
Rind-15	Deutschland	-	produkttypisch	produkttypisch
Rind-16	Argentinien	-	produkttypisch	produkttypisch
Rind-17	Deutschland	-	produkttypisch	produkttypisch
Rind-18	Irland	-	produkttypisch	produkttypisch
Rind-19	Deutschland	-	säuerlich	produkttypisch
Rind-20	USA	-	säuerlich	produkttypisch
Rind-21	Argentinien	hochgradig	faule Eier, sauer	produkttypisch
Rind-22	Argentinien	hochgradig	faule Eier, sauer	produkttypisch
Rind-23	Argentinien	hochgradig	faule Eier, sauer	produkttypisch
Rind-24	Argentinien	hochgradig	faule Eier, sauer	produkttypisch
Rind-25	Deutschland	-	produkttypisch	produkttypisch
Lamm-01	Deutschland	mittelgradig	muffig, säuerlich	produkttypisch
Lamm-02	Neuseeland	-	produkttypisch	produkttypisch
Lamm-03	Irland	-	säuerlich	produkttypisch
Strauß-01	Südafrika	-	produkttypisch	produkttypisch

Fortsetzung Tabelle 22

Probe	Herkunft	Gasbildung	Geruch	Farbe
Strauß-02	Südafrika	-	produkttypisch	produkttypisch
Wild-01	Deutschland	mittelgradig	muffig, säuerlich	produkttypisch
Wild-02	Deutschland	-	produkttypisch	produkttypisch
Wild-03	Deutschland	-	produkttypisch	produkttypisch
Wild-04	Deutschland	-	produkttypisch	Produkttypisch
Wild-05	Deutschland	-	produkttypisch	produkttypisch
Wild-06	Deutschland	-	produkttypisch	produkttypisch
Wild-07	Deutschland	-	produkttypisch	produkttypisch
Wild-08	Deutschland	-	fruchtig-säuerlich	produkttypisch
Wild-09	Südafrika	-	säuerlich	produkttypisch

Tabelle 23: Übersicht über das Vorkommen von Mikroorganismen und Hefen bei der mikroskopischen Tropfsaftuntersuchung der Proben der Marktstudie

Probe	Keime	Hefen
Rind-01	mittellange, schlanke Stäbchen	-
Rind-02	mittellange, schlanke Stäbchen	zahlreich
Rind-03	kurze und mittellange, schlanke Stäbchen	zahlreich
Rind-04	kurze, plumpe Stäbchen	zahlreich
Rind-05	kurze, schlanke Stäbchen	vereinzelt
Rind-06	mittellange, schlanke Stäbchen	-
Rind-07	große, plumpe Stäbchen; kleine Stäbchen (paarweise)	-
Rind-08	große, plumpe Stäbchen, teilweise subterminale Endosporen; lange, schlanke Stäbchen	-
Rind-09	mittellange, schlanke Stäbchen	-
Rind-10	lange, schlanke Stäbchen	-
Rind-11	mittellange und lange, schlanke Stäbchen	-
Rind-12	lange, schlanke Stäbchen	-
Rind-13	lange, schlanke Stäbchen	-
Rind-14	mittellange, schlanke Stäbchen	-

Fortsetzung Tabelle 23

Probe	Keime	Hefen
Rind-15	kurze und mittellange, schlanke Stäbchen	-
Rind-16	kurze, schlanke Stäbchen (paarweise)	-
Rind-17	mittellange, schlanke Stäbchen und Kokken	-
Rind-18	kurze Stäbchen und Kokken	vereinzelt
Rind-19	kurze Stäbchen und Kokken	-
Rind-20	lange, schlanke Stäbchen und Kokken	-
Rind-21	kurze Stäbchen	-
Rind-22	mittellange Stäbchen	-
Rind-23	lange, schlanke Stäbchen	-
Rind-24	lange, schlanke Stäbchen	-
Rind-25	mittellange und lange Stäbchen	-
Lamm-01	kurze Stäbchen	-
Lamm-02	kurze und mittellange, schlanke Stäbchen	-
Lamm-03	mittellange und lange, schlanke Stäbchen; Kokken	-
Strauß-01	mittellange und lange, schlanke Stäbchen	-
Strauß-02	kurze und mittellange, schlanke Stäbchen	zahlreich
Wild-01	mittellange, schlanke und kurze, plumpe Stäbchen	-
Wild-02	kurze Stäbchen	-
Wild-03	kurze Stäbchen	-
Wild-04	kurze Stäbchen	-
Wild-05	kurze und mittellange, schlanke Stäbchen	-
Wild-06	kurze Stäbchen	-
Wild-07	mittellange und lange, schlanke Stäbchen	zahlreich
Wild-08	kurze und mittellange, schlanke Stäbchen; Kokken (paarweise)	zahlreich
Wild-09	mittellange, schlanke Stäbchen	-

Tabelle 24: Ergebnisse der Untersuchung der Handelsproben (Untersuchung A)

Probe	pH-Wert	a _w -Wert	Aerobe, mesophile Keimzahl KbE/cm ²	Milchsäurebakterien KbE/cm ²	Enterobacteriaceen KbE/cm ²	Pseudomonaden KbE/cm ²	Hefen + 25°C KbE/cm ²	Hefen + 4°C KbE/cm ²
Rind-01	5,73	0,9895	1,1 x 10 ³	9,0 x 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	1,0 x 10 ²	< 10
Rind-02	5,75	0,9900	5,7 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁵	< 10 ²	1,6 x 10 ⁴	1,0 x 10 ²	< 10
Rind-03	5,62	0,9860	5,6 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁵	< 10 ²	5,3 x 10 ³	1,1 x 10 ³	2,5 x 10 ⁵
Rind-04	5,51	0,9864	2,7 x 10 ⁵	2,8 x 10 ⁵	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	4,1 x 10 ⁵
Rind-05	5,50	0,9850	7,8 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁶	4,3 x 10 ⁴	5,0 x 10 ⁵	7,0 x 10 ²	4,1 x 10 ²
Rind-06	5,63	0,9850	5,8 x 10 ⁶	8,0 x 10 ⁵	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10
Rind-07	6,44	0,9875	3,8 x 10 ⁷	3,3 x 10 ⁷	2,0 x 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10
Rind-08	6,26	0,9869	1,1 x 10 ⁷	9,0 x 10 ⁶	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10
Rind-09	5,73	0,9892	2,2 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁴	3,0 x 10 ³	5,0 x 10 ³	< 10 ²	< 10
Rind-10	5,49	0,9786	1,1 x 10 ⁴	< 10 ²	2,6 x 10 ³	< 10 ²	3,0 x 10 ²	< 10
Rind-11	5,40	0,9898	4,5 x 10 ³	2,6 x 10 ³	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10
Rind-12	5,45	0,9903	1,0 x 10 ³	3,0 x 10 ²	8,0 x 10 ²	< 10 ²	3,0 x 10 ²	< 10
Rind-13	5,48	0,9900	1,9 x 10 ⁴	5,3 x 10 ³	< 10 ²	< 10 ²	3,0 x 10 ²	< 10
Rind-14	5,40	0,9890	1,0 x 10 ⁷	9,1 x 10 ⁶	3,1 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁶	< 10 ²	8,0 x 10 ³
Rind-15	5,51	0,9875	1,3 x 10 ⁴	9,0 x 10 ³	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	1,0 x 10 ¹
Rind-16	5,57	0,9900	2,0 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶	2,9 x 10 ³	2,1 x 10 ³	< 10 ²	< 10
Rind-17	5,61	0,9880	9,7 x 10 ⁴	9,0 x 10 ³	3,0 x 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10
Rind-18	5,53	0,9819	4,6 x 10 ⁶	3,4 x 10 ⁶	2,0 x 10 ³	4,2 x 10 ⁵	1,0 x 10 ²	< 10
Rind-19	5,41	0,9808	8,7 x 10 ⁵	3,0 x 10 ⁵	< 10 ²	1,0 x 10 ³	< 10 ²	5,0 x 10 ¹
Rind-20	5,42	0,9900	5,6 x 10 ⁶	4,5 x 10 ⁶	3,6 x 10 ³	3,2 x 10 ⁴	< 10 ²	< 10
Rind-21	5,49	0,9831	3,9 x 10 ⁷	3,2 x 10 ⁷	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10
Rind-22	5,47	0,9845	2,7 x 10 ⁷	2,5 x 10 ⁷	1,0 x 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10
Rind-23	5,54	0,9842	4,4 x 10 ⁷	2,6 x 10 ⁷	2,6 x 10 ⁵	< 10 ²	2,0 x 10 ²	< 10
Rind-24	6,21	0,9877	2,6 x 10 ⁸	1,9 x 10 ⁸	1,3 x 10 ⁷	< 10 ²	8,0 x 10 ²	< 10
Rind-25	5,62	0,9868	9,8 x 10 ⁴	1,1 x 10 ⁵	< 10 ²	< 10 ²	1,9 x 10 ²	< 10
Lamm-01	5,80	0,9849	1,0 x 10 ⁷	4,7 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁴	1,0 x 10 ²	< 10
Lamm-02	5,69	0,9900	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	3,0 x 10 ²	< 10
Lamm-03	5,70	0,9832	9,4 x 10 ⁶	1,6 x 10 ⁵	1,0 x 10 ²	5,3 x 10 ²	< 10 ²	< 10
Strauß-01	6,15	0,9824	1,3 x 10 ⁴	9,0 x 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	1,2 x 10 ²	< 10
Strauß-02	6,02	0,9845	2,1 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷	8,6 x 10 ⁴	1,9 x 10 ³	< 10 ²	1,5 x 10 ²
Wild-01	5,53	0,9844	5,7 x 10 ⁶	8,0 x 10 ⁶	7,0 x 10 ³	1,8 x 10 ⁵	1,0 x 10 ²	7,5 x 10 ²
Wild-02	5,60	0,9830	1,2 x 10 ⁵	2,3 x 10 ³	1,2 x 10 ⁴	4,0 x 10 ⁴	8,0 x 10 ²	3,0 x 10 ²
Wild-03	5,58	0,9662	1,5 x 10 ⁵	6,9 x 10 ³	1,1 x 10 ⁴	3,2 x 10 ³	3,0 x 10 ²	2,0 x 10 ²
Wild-04	5,67	0,9850	9,0 x 10 ²	2,0 x 10 ²	< 10 ²	3,5 x 10 ²	< 10 ²	< 10
Wild-05	5,65	0,9870	8,0 x 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10
Wild-06	5,53	0,9860	5,9 x 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	1,0 x 10 ¹
Wild-07	5,58	0,9907	5,2 x 10 ⁸	5,3 x 10 ⁷	3,1 x 10 ⁷	> 10 ⁷	4,7 x 10 ⁷	4,8 x 10 ⁸
Wild-08	5,82	0,9745	7,2 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁴	8,8 x 10 ⁵	8,0 x 10 ²	1,1 x 10 ³
Wild-09	5,50	0,9801	< 10 ²	< 10 ²	2,9 x 10 ³	3,0 x 10 ³	< 10 ²	< 10

Tabelle 25: Ergebnisse der Untersuchung der Handelsproben (Untersuchung B)

Probe	pH-Wert	a _w -Wert	Aerobe, mesophile Keimzahl KbE/cm ²	Milchsäurebakterien KbE/cm ²	Enterobacteriaceen KbE/cm ²	Pseudomonaden KbE/cm ²	Hefen + 25°C KbE/cm ²	Hefen + 4°C KbE/cm ²
Rind-01	5,75	0,9895	1,4 x 10 ³	1,2 x 10 ³	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10
Rind-02	5,65	0,9940	1,2 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁶	1,2 x 10 ³	3,0 x 10 ⁴	< 10 ²	< 10
Rind-03	5,62	0,9866	5,1 x 10 ⁵	3,6 x 10 ⁵	< 10 ²	6,9 x 10 ³	8,0 x 10 ²	1,9 x 10 ⁵
Rind-04	5,48	0,9890	1,5 x 10 ⁵	2,0 x 10 ⁵	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	4,7 x 10 ⁵
Rind-05	5,58	0,9852	3,6 x 10 ⁶	3,2 x 10 ⁶	3,1 x 10 ⁴	5,4 x 10 ⁵	3,0 x 10 ²	4,0 x 10 ²
Rind-06	5,67	0,9854	6,4 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10
Rind-07	6,65	0,9876	3,4 x 10 ⁷	4,2 x 10 ⁷	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10
Rind-08	6,40	0,9871	1,4 x 10 ⁷	1,0 x 10 ⁷	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10
Rind-09	5,75	0,9898	5,0 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁴	8,0 x 10 ³	< 10 ²	< 10
Rind-10	5,50	0,9781	3,3 x 10 ⁴	< 10 ²	4,1 x 10 ³	< 10 ²	1,0 x 10 ²	< 10
Rind-11	5,43	0,9904	7,8 x 10 ³	2,0 x 10 ³	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10
Rind-12	5,47	0,9881	1,8 x 10 ³	< 10 ²	2,0 x 10 ²	< 10 ²	1,0 x 10 ²	< 10
Rind-13	5,50	0,9897	3,1 x 10 ⁴	6,9 x 10 ³	< 10 ²	< 10 ²	1,0 x 10 ²	< 10
Rind-14	5,38	0,9896	1,4 x 10 ⁷	4,7 x 10 ⁶	9,0 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁶	< 10 ²	6,0 x 10 ³
Rind-15	5,51	0,9871	1,1 x 10 ⁴	1,1 x 10 ⁴	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	1,0 x 10 ¹
Rind-16	5,63	0,9925	2,2 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁶	6,2 x 10 ³	3,7 x 10 ³	< 10 ²	< 10
Rind-17	5,55	0,9897	7,6 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁴	3,0 x 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10
Rind-18	5,56	0,9824	7,1 x 10 ⁶	5,1 x 10 ⁶	4,0 x 10 ³	3,8 x 10 ³	< 10 ²	< 10
Rind-19	5,54	0,9813	9,2 x 10 ⁵	4,0 x 10 ⁵	< 10 ²	1,4 x 10 ³	< 10 ²	3,0 x 10 ¹
Rind-20	5,47	0,9895	8,9 x 10 ⁶	5,6 x 10 ⁶	4,4 x 10 ³	4,2 x 10 ⁴	< 10 ²	< 10
Rind-21	5,47	0,9840	1,7 x 10 ⁷	3,4 x 10 ⁷	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10
Rind-22	5,45	0,9847	2,9 x 10 ⁷	2,4 x 10 ⁷	2,4 x 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10
Rind-23	5,55	0,9849	3,1 x 10 ⁷	3,1 x 10 ⁷	3,9 x 10 ⁵	< 10 ²	4,4 x 10 ²	< 10
Rind-24	6,19	0,9857	1,5 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁸	2,4 x 10 ⁷	< 10 ²	1,2 x 10 ³	< 10
Rind-25	5,61	0,9867	1,2 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁵	< 10 ²	< 10 ²	2,0 x 10 ²	< 10
Lamm-01	5,88	0,9855	1,3 x 10 ⁷	7,4 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁴	1,0 x 10 ²	< 10
Lamm-02	5,73	0,9985	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	1,0 x 10 ²	< 10
Lamm-03	5,73	0,9833	9,1 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁵	1,0 x 10 ²	4,7 x 10 ²	< 10 ²	< 10
Strauß-01	6,03	0,9824	1,7 x 10 ⁴	1,6 x 10 ³	< 10 ²	< 10 ²	1,2 x 10 ²	< 10
Strauß-02	5,96	0,9845	2,6 x 10 ⁷	5,8 x 10 ⁷	9,7 x 10 ⁴	1,8 x 10 ³	< 10 ²	1,4 x 10 ²
Wild-01	5,51	0,9844	6,4 x 10 ⁶	8,9 x 10 ⁶	9,0 x 10 ³	2,0 x 10 ⁵	3,0 x 10 ²	6,4 x 10 ²
Wild-02	5,58	0,9836	1,4 x 10 ⁵	1,1 x 10 ³	1,5 x 10 ⁴	3,5 x 10 ⁴	2,0 x 10 ²	2,0 x 10 ²
Wild-03	5,59	0,9801	7,0 x 10 ⁴	3,5 x 10 ³	9,6 x 10 ³	3,0 x 10 ³	2,0 x 10 ²	3,0 x 10 ²
Wild-04	5,55	0,9840	2,1 x 10 ³	< 10 ²	< 10 ²	4,1 x 10 ²	< 10 ²	< 10
Wild-05	5,66	0,9875	4,4 x 10 ³	3,5 x 10 ²	< 10 ²	3,9 x 10 ²	< 10 ²	< 10
Wild-06	5,55	0,9872	7,0 x 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	1,0 x 10 ¹
Wild-07	5,62	0,9904	7,1 x 10 ⁸	3,6 x 10 ⁷	7,5 x 10 ⁷	> 10 ⁷	8,1 x 10 ⁷	3,2 x 10 ⁸
Wild-08	5,72	0,9753	8,7 x 10 ⁶	1,6 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁴	9,9 x 10 ⁵	6,0 x 10 ²	9,6 x 10 ²
Wild-09	5,59	0,9868	< 10 ²	< 10 ²	7,0 x 10 ³	7,0 x 10 ³	< 10 ²	< 10

Fortsetzung Tabelle 26

	Daten aus Literatur (CBS)			Eigene Untersuchungen				
	CBS 398	CBS 4311	CBS 2757	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3	Isolat 4	Isolat 5
Assimilation von Stickstoffquellen								
Nitrat	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrit	-	-	-	-	-	-	-	-
Creatin	-	-	-	-	-	-	-	-
Creatinin	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentation								
Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucosid	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	+	+	+	+	+	+
Stärke	-	-	-	-	-	(+)	-	-
Sucrose	-	-	+	+	+	+	+	+
Trehalose	-	(+)d	+	+	+	+	+	+
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-
Vitaminfreies Medium								
	-	-	-	-	-	-	-	-
Temperaturabhängiges Wachstum								
+ 4 °C	*	*	*	+	+	+	+	+
+ 10 °C	*	*	*	+	+	+	+	+
+ 25 °C	+	+	+	-	-	-	-	-
NaCl-Konzentration								
5 %	*	*	*	+	+	+	+	+
10 %	+; -	-	-	+	+	+	+	+
16 %	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Glucosekonzentration								
50 %	d, (+)	d, (+)	-	-	-	-	-	-
Ureasetest								
	-	-	-	-	-	-	-	-
+	deutliches Wachstum							
(+)	schwaches Wachstum							
-	kein Wachstum							
d	verzögertes Wachstum							
+; -	variables Wachstum							
•	keine Daten vorhanden							
CBS:	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht							

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis, Inhaber des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit des Departments für Veterinärwissenschaften der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Überlassung des Themas, das Interesse an der Arbeit sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Die experimentellen Arbeiten wurden am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Institutes, Kulmbach, unter der damaligen Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis durchgeführt.

Bei Herrn J. Kabisch, jetzt am Max Rubner-Institut, Kiel, möchte ich mich ganz herzlich für die Hilfsbereitschaft und die konstruktiven Ratschläge während der Durchführung der Arbeit sowie für seine unermüdliche Geduld, stete moralische Unterstützung und seine Mühe bei der Korrektur der Entwürfe bedanken.

Ich danke außerdem allen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Institutes, Kulmbach, die durch ihre Hilfsbereitschaft und das ausgezeichnete Arbeitsklima zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt Frau L. Weber für die sorgfältige Einarbeitung in die mikrobiologischen und molekularbiologischen Arbeitstechniken und die Hilfsbereitschaft sowie Herrn J. Dresel für die Einführung in die mikrobiologische Probenuntersuchung und Unterstützung bei der Durchführung der Challenge- und Desinfektionsmittelversuche.

Ein spezieller Dank gilt Frau Dr. M. Wenning und den Mitarbeitern des ZIEL, Weihenstephan für die Untersuchung der Isolate mittels FTIR und die gute Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich auch ganz herzlich bei Frau Dr. R. Bonke, Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit der Ludwig-Maximilians-Universität München, für ihre Geduld und ihre gewissenhafte, konstruktive Korrektur der Entwürfe dieser Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mir immer die größtmögliche Unterstützung boten und mich jederzeit motivierten.

