

Beitrag des Peptid- und Aminosäurestoffwechsels von Starterkulturen zur Bildung qualitätsbestimmender Inhaltsstoffe bei der Rohwurstreifung

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie Prof. Dr. R. F.Vogel/PD Dr. M. Ehrmann
Forschungsstelle II:	Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW FG Biotechnologie der Naturstoffe Prof. Dr. W. Schwab
Forschungsstelle III:	Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (DFA), Freising-Weihenstephan Prof. Dr. Dr. P. Schieberle
Industriegruppe:	Bundesverband der Deutschen Fleischwarenindustrie e.V. (BVDF), Bonn Projektkoordinator: Prof. Dr. W. P. Hammes, Gewürzmüller GmbH, Korntal-Münchingen
Laufzeit: 2	008 – 2010
Zuwendungssumme:	€ 418.450,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

In den letzten Jahren wurden in Industrie und Forschung Stammsammlungen aufgebaut, die derzeit mangels klarer Auswahlkriterien und schneller Bewertungsmethoden ungenutzt bleiben. Zudem erfordert die von der EFSA vorgeschlagene „Qualified Presumption of Safety (QPS)“ eine konkrete Wissensbasis für Starterkulturen (Taxonomie, Abwesenheit des Potenzials unerwünschter Wirkungen auf den Menschen, Kenntnis der Wirkung in der industriellen Anwendung und letztliche Verwendung – hier lebend im Produkt). Dem gegenüber steht ein wachsender Anspruch der Wirtschaft an die Fähigkeit von Starterkulturen, Verbindungen mit technofunktionellen und sensorisch erwünschten Eigenschaften zu bilden unter gleichzeitiger Reduktion unerwünschter Metabolite bzw. biogener Amine. Die molekulare Sensorik, die Bestimmung der Genomsequenz von > 20 Lactobacillus-Species und der Fortschritt bei der Durchführung metabolischer Analysen erlauben

eine umfassende Bewertung von Starterorganismen. Ein Test auf An- bzw. Abwesenheit von Leitgenen ermöglicht eine schnelle Auswahl und Bewertung von Stämmen. Dies ist allerdings bisher nur für Milchsäurebakterien in der Milchwirtschaft etabliert.

Die Rohwurstreifung ist ein komplexes Geschehen, in dem endogene Fleischenzyme und die eingesetzten Starterkulturen eine wichtige Rolle hinsichtlich hygienischer Sicherheit, Textur-, Farb-, Geschmack- und Aromabildung spielen. Im Besonderen sind die pH-Absenkung durch die Milchsäurebakterien sowie die Lipolyse und Proteolyse mit ihren Folgereaktionen für diese Eigenschaften bestimmend. Hinsichtlich Sicherheit und Aromabildung ist der Metabolismus von Peptiden und Aminosäuren von besonderer Bedeutung, da die Bildung toxikologisch bedenklicher biogener Amine und sensorisch bedeutsamer Substanzen aus denselben Vorstufen erfolgt. Neben den endogenen Fleischenzymen sind fakultativ heterofermentative Milchsäure-

bakterien, z. B. *Lactobacillus*-Arten wie *L. sakei*, *L. curvatus* oder *L. plantarum*, *Pediococcus*-Arten wie *P. pentosaceus* sowie die *Staphylococcus*-Arten *S. carnosus* und *S. xylosus* beteiligt.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, die Voraussetzungen zu schaffen, um die Auswahl von Starterorganismen für die Rohwurstreifung entlang ihres genetischen Potenzials mittels PCR-Reaktionen zu erleichtern und zu beschleunigen.

Forschungsergebnis:

Stämme von *L. sakei* wurden in Modellsystemen, Rohwurstfermentationen im Labormaßstab und im Rahmen der industriellen Eigenleistungen im größeren technischen Maßstab eingesetzt und flüchtige, sowie darin enthaltene aromarelevante Metabolite bestimmt. Es wurde eine größere Zahl von Organismen metabolisch und genetisch untersucht als dies ursprünglich vorgesehen war. In Abstimmung mit dem Projektbegleitenden Ausschuss wurden auch Stämme von *Lactobacillus curvatus* vergleichend in die genetischen Untersuchungen und Modellfermentationen einbezogen. Darüber hinaus wurde in mehreren Rohwurstchargen zusätzlich zu *Lactobacillus sakei* auch *Staphylococcus carnosus* eingesetzt. Die Ergebnisse aus den Modellen waren denjenigen in Rohwurstfermentationen vergleichbar.

Metabolische Untersuchungen: Dipeptidsubstrate waren nach kurzer Zeit nicht mehr im Puffer nachweisbar. Tetrapeptide wurden hingegen zwar teilweise abgebaut, sie waren nach der Fermentationszeit jedoch noch in größeren Mengen in den Suspensionen vorhanden. Die Konzentration an freien Aminosäuren stieg an, es konnte jedoch nicht die zugesetzte Menge an Aminosäure-Substraten gefunden werden. In beiden Fällen führte der Peptidabbau- und Transport nicht zu einer im gleichen Ausmaß vermehrten Bildung der für die Qualität von Rohwürsten relevanten Metabolite. In Ansätzen mit Zusatz freier Aminosäuren kam es zu einem geringfügigen Abbau dieser. Somit ist anzunehmen, dass die Peptide nach dem Transport in die Zelle vermutlich nur teilweise zu den Aminosäuren hydrolysiert werden, der Rest aber über andere Stoffwechselwege metabolisiert wird. In einigen Versuchen wurden Unterschiede zwischen den drei verwendeten Stämmen *L. sakei* bezüglich der Metabolisierung der Substrate und aufgrund der Stellung der Aminosäuren innerhalb der Peptide beobachtet. Außerdem konnte fest-

gestellt werden, dass alle *L. sakei*-Stämme die größten Metabolitmengen in dem Ansatz mit Zusatz freier Aminosäuren produzieren, obwohl sie diese schlechter aufnehmen als Peptide.

Durch den Zusatz der Aminosäuren konnte in Modellsystemen keine Steigerung der zugehörigen flüchtigen Alkohole, Aldehyde und Säuren beobachtet werden. Durch die Zugabe der α -Ketosäuren hingegen konnten die gebildeten Menge von den aromaintensiven Säuren 2-Methylpropansäure, 2-Methylbuttersäure und 3-Methylbuttersäure erheblich gesteigert werden.

Auch Stressbedingungen, wie sie in der Rohwurst auftreten, beeinflussen Wachstumsverhalten und Metabolitbildung der Starterorganismen. Untersucht wurde der Einfluss von Stressfaktoren wie 8 % Salz, 0,125 % Nitrit, pH 5,5 und Manganmangel. Unter Salzstress zeigte sich, dass sowohl die Metabolite aus dem Aminosäurerestoffwechsel, Fettstoffwechsel als auch aus dem Zuckerstoffwechsel in verminderter Menge gebildet wurden. Dies deutet darauf hin, dass die Laktobazillen unter Salzstress ihren Metabolismus weitestgehend einstellen. Unter Nitritstress wurde eine größere Anzahl von Thioverbindungen gebildet, die allerdings eher chemischen als biologischen Ursprungs zu sein scheinen. Bei einem pH von 5,5 wurden die aromarelevanten Alkohole 1-Hexanol, 1-Heptanol und 1-Nonanol vermehrt gebildet. Bei Manganmangel wurde mehr 3-Methyl-1-Butanol-Acetat, 3-Methyl-1-Butanol und 3-Hydroxy-2-Butanon gebildet. 3-Methyl-1-Butanol-Acetat und 3-Methyl-1-Butanol stammen aus dem Leucinabbau, während 3-Hydroxy-2-Butanon beim anaeroben Glucoseabbau gebildet wird.

Biogene Amine: Zur Quantifizierung der in der Rohwurst enthaltenen biogenen Amine wurden eine Methode etabliert, die es ermöglicht, die biogenen Amine Isobutylamin, 2- und 3-Methylbutylamin, 3-(Methyl)thiopropylamin, 2-Phenylethylamin, Tyramin, Tryptamin, Histamin, Putrescin, Cadaverin, Ethanolamin, β -Alanin, γ -Aminobuttersäure, Spermin und Spermidin zu quantifizieren. Die Methode beruht auf einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse nach Derivatisierung der Amine mit Benzoylchlorid und anschließender LC-MS-MS-Bestimmung. Hierfür wurden isotopenmarkierte Standards synthetisiert. Für die meisten Amine ist ein signifikanter Konzentrationsanstieg im Laufe des Reifungsprozesses zu beobachten. Diese Bildung wird hauptsächlich in den ersten 2 Wochen beobach-

tet. Die Tyraminkonzentration stieg um den Faktor 15 im Vergleich zu Tag 0 auf über 100 mg/kg an. Da die eingesetzten Stämme keine Fähigkeit zur Tyraminbildung besitzen, werden diese wahrscheinlich durch die autochthone Fleischflora gebildet.

Aromastoffe: Die enthaltenen Aromastoffe wurden mit Methoden der molekularen Sensorik identifiziert und quantifiziert. Mit dem höchsten FD-Faktor von 4.096 wurden die schweißig riechende 2- und 3- Methylbuttersäure, die nach Bienenwachs riechende Phenyllessigsäure und das Vanillin detektiert. Einen FD-Faktor von 2.048 hatten das nach Geranie riechende Z-1,5-Octadien-3-on, das rauchig-süß riechende 2-Methoxyphenol und das würzig-maggiartig riechende Sotolon. Das fäkalisch riechende 3-Methylindol, die ranzig riechende Buttersäure und das metallisch riechende trans-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal wurden ebenfalls noch in Verdünnungen über 256 wahrgenommen. Ein Großteil der Aromastoffe war in allen untersuchten Rohwürsten zu finden.

Die Konzentrationen der quantifizierten Aromastoffe erstreckten sich über einen weiten Konzentrationsbereich, dominiert von Essigsäure mit einem Gehalt von 1,05 g/kg. Die Säuren 2- und 3 Methylbuttersäure, Buttersäure und Phenyllessigsäure sind die Aromastoffe mit den nächsthöchsten Konzentrationen. Diese kommen in Konzentrationen im Milligramm-Bereich vor. Mit Konzentrationen über 100 µg/kg sind der blumig riechende Phenylacetaldehyd, Pinen, Myrcen und 4-Methylphenol enthalten. Die geringsten Konzentrationen wurden für das Z-1,5-Octadien-3-on, das 2,6-Dimethylphenol und das 2,3-Diethyl-5-methoxypyrazin ermittelt. Durch Rekombinationsversuche wurde überprüft, ob eine Mischung der quantifizierten Aromastoffe das typische Aroma der Rohwurst wiedergeben konnte.

Das Rekombinat setzte sich aus 23 Aromastoffen zusammen. Anhand der zu Beginn der Untersuchungen ermittelten Deskriptoren verglich das geschulte, fünfzehnköpfige Sensorik-Panel die Modellmischung mit der fein aufgeschnittenen Rohwurst. Die vergleichende Aromaprofilanalyse zeigte, dass die Aromaqualitäten nur geringe Abweichungen zwischen Original und Rekombinat aufwiesen, wobei ein Matrixeffekt nur eine geringe Rolle spielte.

Leitgene: Entlang dieser Untersuchungen wurden Leitgene identifiziert, die für die Qualität der

Rohwurst von Bedeutung sind. Diese umfassen Gene, die an der Bildung biogener Amine beteiligt sind, ebenso wie zwei vermutliche Aminotransferasegene (*aspD*, *arcT*) und Gene des Peptidtransports (*oppABCDF*, *dtpt*, *opt*), die bei allen Stämmen (*L. curvatus* und *L. sakei*), gefunden wurden. Im Genom von *L. sakei subsp. sakei 23 K* (TMW 1.1322) fehlen jedoch wichtige Schlüsselgene, die für die Aromabildung als bedeutsam angesehen werden können. So sind z. B. keine Gene für Aminotransferasen annotiert, die spezifisch verzweigtkettigte oder aromatische Aminosäuren zu ihren jeweiligen α -Ketosäuren transaminieren können. Dies wurde durch PCR-Screenings auch für weitere 51 *L. sakei*-Stämme bestätigt. Die Abwesenheit dieser Gene deckt sich mit dem in metabolischen Untersuchungen festgestellten limitierten Potenzial zur Aroma(vorstufen)bildung. Durch heterologe Expression von Aminotransferasen aus *L. paracasei*, *S. carnosus* und *Enterococcus faecalis* in *L. sakei* konnte gezeigt werden, dass diese limitierend für die Bildung von Aromastoffen und -vorstufen aus Aminosäuren sind bzw. dass Bakterienstämme mit ausgeprägter Aminotransferaseaktivität gute Kandidaten für die Bildung einer Vielfalt von Aromastoffen sind.

Die Ziele des Vorhabens wurden damit nicht nur erreicht, sondern hinsichtlich der untersuchten Vielfalt an Stämmen und der dadurch verbesserten Aussagekraft der Ergebnisse sogar übertroffen. Grundsätzlich zeigte sich, dass das metabolische Potenzial von *L. sakei* zur Bildung von Aromastoffen aus Peptiden und Aminosäuren wenig differenziert und durch die stark limitierte Fähigkeit zur Transaminierung eingeschränkt ist. Interessierte Unternehmen können sich deswegen bei der Auswahl von Stämmen von *L. sakei* zunächst auf deren Wettbewerbskraft im Fleischsystem und die Vermeidung zur Fähigkeit von biogenen Aminen konzentrieren. Für die schnelle, sichere Bewertung dieser Stämme wurden PCR-Primersets entwickelt. Wechselwirkungen mit anderen Starterorganismen, Stressfaktoren und Prozessparameter können die Bildung flüchtiger Metabolite jedoch beeinflussen. Ein Teil dieser Aspekte wird im Rahmen des IGF-Vorhabens AiF 16608 N weiter untersucht.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Das Aroma fermentierter Lebensmittel sowie die gesundheitliche Unbedenklichkeit stehen für Hersteller und Verbraucher an oberster Stelle. Fermentierte Fleischwaren gehören dabei zu den

sensorisch attraktivsten Lebensmitteln, die gleichzeitig eine hohe Wertschöpfung ermöglichen. Die Bildung von Verbindungen, die diese Eigenschaften auf molekularer Ebene bestimmen, hängt neben dem verwendeten Rohmaterial von der verwendeten Starterkultur und den Fermentationsbedingungen ab. Die Unternehmen der Fleischwarenindustrie weisen überwiegend mittelständischen Charakter auf. Von den ca. 700 produzierenden Unternehmen gehören 400 zu den kleinen und mittelständischen Unternehmen. Die fleischverarbeitende Industrie in Deutschland hat einen Jahresumsatz von ca. 15 Mrd. € mit Wachstumsraten im zweistelligen Bereich und ca. 80.000 Beschäftigten.

Die Ergebnisse aus diesem Projekt erlauben eine effektive Auswahl sicherer Organismen gemäß QPS-Kriterien sowie die Entwicklung neuer und die Sicherung bestehender, sensorisch attraktiver Fleischwaren in großer Vielfalt. Das Potenzial neuer Stämme kann über einen einfachen PCR-Test auf An- bzw. Abwesenheit der ermittelten Leitgene ermittelt werden. Diese für Stämme der Milchindustrie erfolgreich etablierte Methode wird durch das Projekt für Starterorganismen der fleischverarbeitenden Industrie verfügbar. Die Verwendung von Stämmen, die biogene Amine oder Fehl aromastoffe bilden, kann ausgeschlossen werden. Dadurch können Unternehmen, die Starterkulturen produzieren, ebenso wie Lebensmittelhersteller entsprechende EFSA-Richtlinien einhalten. Die Qualität fermentierter Fleischwaren wird entsprechend der wachsenden Verbraucheransprüche gesichert und die große Ressource einer Vielfalt bisher ungenutzter Organismen erschlossen, die in einem Screening gezielt auf gewünschte Eigenschaften untersucht werden können.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2010.
2. Vogel, R.: Bewertung von Starterkulturen in der Rohwurstproduktion: Am Scheideweg zwischen Aroma und Sicherheit. Tagungsband FEI-Jahrestagung 2011, 85-97 (2011).

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW
Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie
Weihenstephaner Steig 16
85350 Freising-Weihenstephan
Tel.: 08161/71-5169, Fax: 08161/71-3327
E-Mail: Rudi.Vogel@wzw.tum.de

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW
FG Biotechnologie der Naturstoffe
Hochfeldweg 1
85354 Freising-Weihenstephan
Tel.: 08161/71-2912, Fax: 08161/71-2950
E-Mail: schwab@wzw.tum.de

Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (DFA)
Lise-Meitner-Straße 34
85354 Freising-Weihenstephan
Tel.: 08161/71-2932, Fax: 08161/71-2970
E-Mail: peter.schieberle@lrz.tum.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: 0228/372031, Fax: 0228/376150
E-Mail: fei@fei-bonn.de

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

gefördert durch/via:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Technologie

AiF ALLIANZ
INDUSTRIE
FORSCHUNG

