

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

Untersuchungen zur psychrophilen Hefemikrobiota auf frischen, vakuumverpackten Fleischstücken aus dem globalen Handel

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Christiana Paniora
aus Thessaloniki

München 2014

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Tag der Promotion: 12. Juli 2014

„Wenn du die Wahrheit suchst, sei offen für das Unerwartete, denn es ist schwer zu finden und verwirrend, wenn du es findest.“ (Heraklit von Ephesus)

Meiner Familie

Abkürzungsverzeichnis

Aqua bidest.	Bidestilliertes Wasser
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AFLP	amplified fragment length polymorphism
AR	Argentinien
atm.	physikalische Atmosphäre
AUS	Australien
a_w	Wasseraktivität
<i>B.</i>	<i>Bulleromyces</i>
<i>Bl.</i>	<i>Blastoschizomyces</i>
BR	Brasilien
<i>Br.</i>	<i>Brochothrix</i>
<i>C.</i>	<i>Candida</i>
<i>Cb.</i>	<i>Carnobacterium</i>
<i>Cl.</i>	<i>Clostridium</i>
<i>C'omyces</i>	<i>Citeromyces</i>
<i>Cr.</i>	<i>Cryptococcus</i>
<i>Cv.</i>	<i>Clavispora</i>
c	Konzentration
ca.	circa
cc	Kubikzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
°C	Grad Celsius
<i>D.</i>	<i>Debaryomyces</i>
DE	Deutschland
<i>De.</i>	<i>Dekkera</i>
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRBC	Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
d	Tage
EU	Europäische Union
FR	Frankreich
G	Gauge
<i>G.</i>	<i>Galactomyces</i>
g	Gramm
GYP	Glucose yeast peptone
<i>H.</i>	<i>Helicobacter</i>
h	Stunden
<i>I.</i>	<i>Issatchenkia</i>
IE	Irland
ITS	Internal transcribed spacer
<i>K.</i>	<i>Kazachstania</i>
KbE/g	Koloniebildende Einheiten pro Gramm
Kg	Kilogramm
l	Liter
<i>L.</i>	<i>Lipomyces</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Ln.</i>	<i>Leuconostoc</i>
LMKV	Lebensmittelkennzeichnungsverordnung

LSU	large subunit
M	Molar
<i>M.</i>	<i>Mrakia</i>
<i>Ma.</i>	<i>Malassezia</i>
<i>Me.</i>	<i>Metschnikova</i>
<i>Mo.</i>	<i>Moniliella</i>
MEA	Malzextraktagar
MEA ⁺	Malzextraktagar mit Novobiocin
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid-Ionen
min.	Minute
Mio.	Millionen
MKZ	Mesophile Keimzahl
MPN	most probable number
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mrd.	Milliarden
MRS	de Man, Rogosa and Sharpe
<i>M'zyrna</i>	<i>Meyerozyma</i>
m ²	Quadratmeter
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol
n	Anzahl
n. a.	nicht angegeben
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NL	Niederlande
NZ	Neuseeland
O	Sauerstoffatom
PCR	Polymerase chain reaction
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PC	Plate count
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
<i>Pi.</i>	<i>Pichia</i>
ppm	parts per million
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
RFLP	restriction-enzyme fragment length polymorphism
R.H.	relative humidity
<i>Rh.</i>	<i>Rhodotorula</i>
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Se.</i>	<i>Serratia</i>
Sec.	Seconds
<i>Sh.</i>	<i>Shewanella</i>
<i>Sp.</i>	<i>Sporobolomyces</i>
sp.	Spezies (Einzahl)
spp.	Spezies (Mehrzahl)
SSU	small subunit
TGY	Tryptone glucose yeast
T	Temperatur
<i>T.</i>	<i>Torulopsis</i>

<i>Tr.</i>	<i>Trichosporon</i>
<i>T'spora</i>	<i>Torulaspota</i>
t	Zeit
V	Volt
VO	Verordnung
VRBD	Violet Red Bile Dextrose
UR	Uruguay
UV	Ultraviolett
<i>W.</i>	<i>Wickerhamomyces</i>
WA	Wales
<i>Y.</i>	<i>Yarrowia</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Schrifttum.....	2
2.1	Internationaler Fleischhandel.....	2
2.1.1	Fleischversorgung.....	2
2.1.2	Import- und Exportsituation.....	5
2.2	Verderb von vakuumverpacktem Fleisch	10
2.2.1	Fleischreifung und Fleischverderb	10
2.2.2	Ursachen des mikrobiellen Verderbs	13
2.2.2.1	Fleischverderb unter aeroben Bedingungen	15
2.2.2.2	Fleischverderb unter anaeroben Bedingungen	16
2.2.3	Haltbarkeit von vakuumverpacktem Rind- und Lammfleisch.....	20
2.3	Psychrophile Mikroorganismen	23
2.3.1	Begriffserklärung	23
2.3.2	Psychrophile und psychrotrophe Mikroorganismen auf Fleisch und Fleischerzeugnissen.....	25
2.3.3	Psychrophile Hefen auf Fleisch und Fleischerzeugnissen	26
2.3.3.1	Verderbspotential lebensmittelassoziierter Hefen	37
2.3.3.2	Überblick über die Pathogenität von Hefen.....	41
2.3.3.3	Pathogenität lebensmittelassoziierter Hefen.....	44
2.3.3.4	Nachweis lebensmittelassoziierter Hefen	46
3	Eigene Untersuchungen	50
3.1	Material.....	50
3.1.1	Anzahl und Herkunft der Fleischproben	50
3.1.2	Nährmedien.....	51
3.1.3	Sonstige Materialien und Geräte für die kulturellen Verfahren	52
3.1.4	Materialien und Geräte für die lichtmikroskopische Untersuchung	53
3.1.5	Materialien für die biochemische Untersuchung.....	53
3.1.6	Materialien und Geräte für die molekularbiologischen Untersuchungen.....	54
3.1.6.1	PCR.....	54

3.1.6.2	Sequenzierung	55
3.2	Methoden.....	56
3.2.1	Untersuchung der Fleischproben	56
3.2.1.1	Prüfung der Verpackungen.....	56
3.2.1.2	Sensorische Untersuchung	56
3.2.1.3	Lichtmikroskopische Untersuchung und Färbemethoden	57
3.2.1.4	Mikrobiologische Untersuchung	57
3.2.2	Anzucht und Isolierung von Hefen	59
3.2.3	Morphologische Differenzierung isolierter Hefen	59
3.2.4	Charakterisierung isolierter Hefen	60
3.2.4.1	Biochemische Untersuchungen und Fermentation von Kohlenhydraten.....	60
3.2.4.2	Molekularbiologische Untersuchungen	60
4	Ergebnisse	64
4.1	Beurteilung der vakuumverpackten Fleischproben	64
4.1.1	Übersicht über Anzahl und Herkunft der Proben	64
4.1.2	Visuelle Beurteilung der Vakuumverpackungen.....	65
4.1.3	Sensorische Untersuchung.....	70
4.1.4	Lichtmikroskopische Untersuchung	72
4.1.5	Mikrobiologische Untersuchung	75
4.2	Charakterisierung der Hefe-Isolate.....	88
4.2.1	Morphologische Charakterisierung.....	90
4.2.2	Biochemische Charakterisierung.....	100
4.2.3	Molekularbiologische Untersuchungsergebnisse	108
4.2.3.1	PCR.....	108
4.2.3.2	Sequenzierung	108
5	Diskussion.....	112
6	Zusammenfassung	124
7	Summary	126
8	Literaturverzeichnis	127

9	Abbildungsverzeichnis.....	149
10	Tabellenverzeichnis.....	153
11	Anhang	155
12	Danksagung	166

1 Einleitung

Psychrophile Hefen sind ubiquitär verbreitet und in der Lage, in einem breiten Temperaturbereich zu wachsen. Ebenso befinden sie sich auf oder in diversen Lebensmitteln und werden mit dem Verderb von gekühlten Lebensmitteln assoziiert. Im Vergleich zu den Bakterien wird ihnen eine eher unwichtige Rolle als Lebensmittelkontaminanten und Verderbserreger beigemessen. Umstände, die das Bakterienwachstum hemmen, können jedoch dazu führen, dass Hefen Teil der dominierenden Mikrobiota des Lebensmittels werden. Der durch Hefen verursachte Verderb eines festen oder flüssigen Lebensmittels ist dabei durch unangenehme Geruchsabweichungen, Farbveränderungen und Koloniebildungen an der Oberfläche bzw. Trübung und Sedimentbildung in der Flüssigkeit gekennzeichnet. Hinsichtlich der Lebensmittelsicherheit werden Hefen als relativ ungefährlich eingestuft, da sie in der Regel keine Lebensmittelinfektionen oder –Intoxikationen verursachen.

Die Vakuumierung von Rind- und Lammfleisch wird in der internationalen Fleischindustrie seit geraumer Zeit als Verpackungsmethode eingesetzt, da sie zahlreiche Vorteile bietet. Sie schützt das Fleisch vor äußerlicher Kontamination und Austrocknung, ermöglicht eine gute Fleischreifung und vereinfacht den Transport und internationalen Handel, der sich aufgrund der steigenden Nachfrage nach qualitativ hochwertigem Fleisch in den letzten Jahrzehnten intensiviert hat.

Generell sind Lebensmittel mit niedrigem pH-Wert und hoher Zucker- oder Salzkonzentration für den Verderb durch Hefen anfällig. Der Verderb durch Hefen bei über längere Zeiträume kühl gelagertem Fleisch und Fleischprodukten sowie tiefgefrorenem Lamm-, Geflügel- und Rindfleisch, ist beschrieben. Über das Vorkommen von Hefen auf gekühltem, vakuumverpacktem Fleisch gibt es aktuell allerdings nur wenige Daten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, einen Überblick über die psychrophile Hefemikrobiota von vakuumverpacktem Fleisch zu liefern. Anhand der gewonnenen Daten soll das mögliche Verderbspotential psychrophiler Hefen auf vakuumverpacktem Fleisch besser beurteilt werden.

2 Schrifttum

2.1 Internationaler Fleischhandel

Mit der wachsenden Weltbevölkerung und der wirtschaftlichen Entwicklung, vor allem der westlichen Welt, ist in den vergangenen Jahrzehnten ein stetig anwachsender Fleischkonsum verbunden. Die Globalisierung, der Containertransport und der zunehmende technische Fortschritt bewirkten den Zusammenschluss verschiedener Länder zu regionalen Wirtschaftsräumen und ebneten den Weg für die internationale Markteröffnung.

2.1.1 Fleischversorgung

In den letzten 40 Jahren resultierte aus der zunehmenden Industrialisierung der entwickelten Länder ein höherer Wohlstand, der sich unter anderem mit einer erhöhten Nachfrage nach tierischen Lebensmitteln bemerkbar machte (STEINFELD et al., 2010). Der Fleischkonsum stieg weltweit, wenn auch mit starken regionalen Unterschieden, an (FLEISCHATLAS, 2014). Aktuell zeigt der globale Trend eine Zweiteilung: Während in den meisten Industrieländern der Fleischverbrauch auf extrem hohem Niveau stagniert, nimmt er in Schwellen- und Entwicklungsländern sehr stark zu, teilweise sogar mit zweistelligen Wachstumsraten (FLEISCHATLAS, 2013). Im Hinblick auf den Fleischkonsum lässt sich eine Orientierung der ärmeren (Asien, Afrika und Südamerika) an den reichen Ländern ablesen. Die Urbanisierung und die Bildung neuer Mittelschichten führt zu einem erhöhten Fleischkonsum, da Fleisch nicht nur als Kraftspender und wertvoller Proteinlieferant gilt, sondern auch als Symbol für Aufstieg und Luxus (FLEISCHATLAS, 2013, 2014). In den nächsten Jahren sollen rund 80 Prozent des Wachstums im Fleischsektor auf die aktuellen Boomländer, die nach ihren Anfangsbuchstaben auch kurz BRICS (Brasilien, Russland, Indien, China und Südafrika) genannt werden, entfallen (FLEISCHATLAS, 2014). Neben dem Wirtschafts- und Bevölkerungswachstum ist auch die Urbanisierung, d. h. die Ausbreitung städtischer Lebensformen, für die Steigerung des Fleischverzehrs verantwortlich (FLEISCHATLAS, 2014).

Der Begriff „Fleischverbrauch“ einer Bevölkerung bezieht sich auf den Nahrungsverbrauch, die Verluste einschließlich Knochen, die an Tiere verfütterte Mengen (Futter), sowie die industrielle Verwertung (BMELV, 2013). Dieser Begriff ist eine statistische Zahl, die angibt,

wie viel kg Fleisch erschlachtet wurden. Unter Berücksichtigung von Schlachtabfällen, Tierfutter, Verlusten bei Lagerung, Transport und Verarbeitung ergibt sich der realistische Fleischverzehr. Dies entspricht der Menge an Fleisch, die tatsächlich einer Bevölkerung durchschnittlich als Rohware zum Verzehr zur Verfügung steht (SEUß-BAUM, 2006). Der menschliche Fleischverzehr liegt deshalb deutlich niedriger als der gesamte Verbrauch einer Bevölkerung, ist aber dessen weitaus wichtigste Komponente (BMELV, 2013).

Laut WINDHORST (2012) zeigen Prognosen, dass die Weltbevölkerung in den Jahren von 2010 bis 2050 von sieben Milliarden (Mrd.) auf neun Mrd. Menschen ansteigen wird. Um die Nahrungsmittelversorgung der Weltbevölkerung auch dann noch zu sichern, muss die Nahrungsmittelproduktion in den nächsten Jahrzehnten etwa verdoppelt werden (WINDHORST, 2012). Zudem wird erwartet, dass das Pro-Kopf-Einkommen in Schwellen- und Entwicklungsländern steigt. Parallel zu dieser dort neu entstehenden Mittelschicht mit erhöhter Kaufkraft wird sich auch die Nachfrage nach qualitativ hochwertigen Produkten tierischer Herkunft erhöhen (FLEISCHATLAS, 2013, 2014; WINDHORST, 2012). Die Produktionssteigerung hierbei muss allerdings auf einer etwa 10 % geringeren landwirtschaftlichen Nutzfläche und mit einer geringeren Wasserverfügbarkeit für die Bewässerung erreicht werden (WINDHORST, 2012).

Die einzige Datenbank, die im Zusammenhang mit dem weltweiten Fleischkonsum Zahlen liefert, ist FAOSTAT. Allerdings beziehen sich ihre Daten auf die Fleischversorgung, engl. „meat supply“.

In den Jahren zwischen 1980 und 2009 erhöhte sich die gesamte Pro-Kopf-Fleischversorgung der Welt von 387,3 kg (1980) auf 476,9 kg (2009) (Tabelle 1) (FAOSTAT, 2013). Die Kontinente, die nur eine leichte Steigerung der Pro-Kopf-Versorgung verzeichneten, sind Ozeanien (2,0 kg), Afrika (3,1 kg) und Europa (3,9 kg), wobei Europa und Ozeanien im Gegensatz zu Afrika schon im Jahr 1980 eine ohnehin hohe Pro-Kopf-Versorgung hatten (Tabelle 1). Im Gegensatz dazu war in diesen Jahren eine relativ starke Erhöhung der Pro-Kopf-Fleischversorgung in Südamerika (27,3 kg), Mittelamerika (23,9 kg), Asien (19,4 kg) und Nordamerika (10,0 kg) zu verzeichnen. Asien und Afrika waren im Jahr 1980 die zwei Kontinente mit der niedrigsten Pro-Kopf-Fleischversorgung (11,3 bzw. 14,6 kg). Dagegen lag die Pro-Kopf-Fleischversorgung in Ozeanien (103,2 kg), Nordamerika (107,5 kg) und Europa (72,6 kg) relativ hoch. In den zehn Jahren von 1980 bis 1990 gab es auf allen Kontinenten eine moderate Steigerung, die bis zum Jahr 2000 deutlicher wurde. Ausnahmen waren

hierbei Europa und Ozeanien, da in diesen Kontinenten eine leichte Abnahme der Pro-Kopf-Fleischversorgung festzustellen war (Tabelle 1).

Tabelle 1: Pro-Kopf-Fleischversorgung* in den verschiedenen Kontinenten in den Jahren 1980 bis 2009, in kg/Kopf/Jahr (nach FAOSTAT, 2013)

Kontinent	1980	1990	2000	2009
Afrika	14,6	14,8	15,5	17,7
Asien	11,3	16,8	26,1	30,7
Europa	72,6	79,7	70,4	76,5
Mittelamerika	32,0	31,4	47,8	55,9
Nordamerika	107,5	111,0	120,7	117,5
Ozeanien	103,2	104,8	101,6	105,2
Südamerika	46,1	47,5	67,2	73,4

* Schaf-, Lamm- und Ziegenfleisch, Geflügelfleisch, Rindfleisch, Schweinefleisch und anderes Fleisch

Bezüglich der Rindfleisch-Versorgung im Jahr 2009 ließen sich weltweit bemerkenswerte Unterschiede erkennen (Tabelle 2) (FAOSTAT, 2013). Während Nordamerika, Ozeanien und Südamerika mit relativ viel Rindfleisch pro-Kopf versorgt wurden (38,9 kg, 34,7 kg bzw. 31,3 kg), war die Pro-Kopf-Versorgung in Asien und Afrika deutlich geringer (4,2 bzw. 6,4 kg) (Tabelle 2). Europa und Mittelamerika lagen mit 16,1 und 15,1 kg etwas unter der durchschnittlichen Pro-Kopf-Rindfleisch-Versorgung (20,9 kg). Insgesamt wurde die Weltbevölkerung im Jahr 2009 mit rund 146,7 kg Rindfleisch pro Kopf versorgt (Tabelle 2).

Die Anteile der Schaf-, Lamm- und Ziegenfleisch-Versorgung pro Kopf waren im Jahr 2009 im Vergleich deutlich niedriger (Tabelle 2). Insgesamt wurde die Weltbevölkerung pro Kopf mit 21,4 kg Schaf-, Lamm- und Ziegenfleisch versorgt, durchschnittlich nur mit 3,1 kg. In Ozeanien war die Versorgung mit Schaf-, Lamm- und Ziegenfleisch vergleichsweise am höchsten (12,7 kg) (FAOSTAT, 2013).

Tabelle 2: Weltweite Fleischversorgung (kg/Kopf) im Jahr 2009 in Bezug auf Rind-, Schaf-, Lamm- und Ziegenfleisch (nach FAOSTAT, 2013)

Kontinent	Rindfleisch	Schaf-, Lamm- und Ziegenfleisch
Afrika	6,4	2,8
Asien	4,2	1,9
Europa	16,1	2,0
Mittelamerika	15,1	0,8
Nordamerika	38,9	0,5
Ozeanien	34,7	12,7
Südamerika	31,3	0,7

2.1.2 Import- und Exportsituation

Die globale Fleischproduktion nahm in den letzten Jahren stetig zu. Während 2005 insgesamt 262,9 Millionen (Mio.) Tonnen (t) Fleisch produziert wurden, waren es 2012 fast 300 Mio. t (Tabelle 3). Die Geflügelproduktion stieg, im Gegensatz zur Rind- und Lamm- bzw. Schaffleischproduktion, stark an. Im Hinblick auf die Produktion von Schweinefleisch ließ sich eine moderate Steigerung um 7,1 Mio. t verzeichnen (Tabelle 3). Im Jahr 2012 wurden 22,6 Mio. t mehr Geflügelfleisch produziert als im Jahr 2005. Bei der Rindfleischproduktion kam es in diesen Jahren zu einer leichten Erhöhung von ca. 2,5 Mio. t. Die Lamm- bzw. Schaffleischproduktion blieb relativ konstant bei ca. 13 Mio t (Tabelle 3) (FAO, 2006, 2007, 2008, 2010, 2011, 2012).

Tabelle 3: Weltweite Fleischproduktion in den Jahren 2005 bis 2012 (Mio. t) (nach FAO 2006, 2007, 2008, 2010, 2011, 2012)

Fleischarten	2005	2006	2007*	2008*	2009*	2010*	2011*	2012*
Geflügel	81,9	81,0	86,2	92,3	93,7	98,0	102,3	104,5
Lamm und Schaf	13,0	13,3	13,8	14,1	12,9	13,0	13,8	13,9
Rind	64,3	65,9	67,1	65,1	65,7	65,0	66,6	66,8
Schwein	103,7	107,0	105,8	100,8	106,0	109,2	108,8	110,8
Total	262,9	267,2	272,9	272,3	278,3	285,2	291,5	296,0

*= prognostische Mengeneinschätzung des Autors

In Abbildung 1 wird die totale Fleischproduktion der Kontinente im Jahr 2012 dargestellt und gleichzeitig die Export- und Importmengen gezeigt. Asien war im Jahr 2012 der mit Abstand größte Fleischproduzent der Welt (127,5 Mio. t). Es folgten Europa (57,9 Mio. t), Nord- (46,6 Mio. t) und Südamerika (38,6 Mio. t). Von den im Jahr 2012 weltweit produzierten ca. 300 Mio. t Fleisch nahmen 57,8 Mio. t am globalen Im- und Export teil. Dabei wurden insgesamt 28,4 Mio. t importiert und 29,4 Mio. t exportiert. Die größten Mengen Fleisch wurden von Asien (14,4 Mio. t) und Europa (4,8 Mio. t) importiert. Die größten Fleischexporteure waren Nord- (9,3 Mio. t) und Südamerika (7,5 Mio. t) (Abbildung 1) (FAO, 2012).

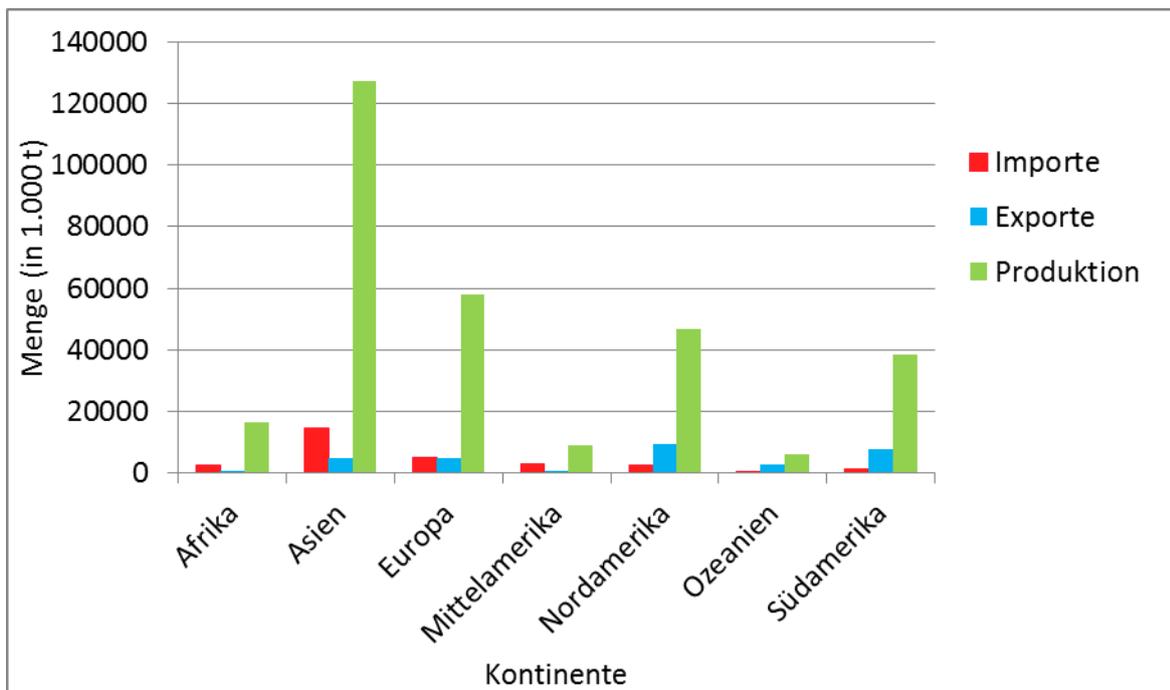


Abbildung 1: Überblick über den globalen Fleischhandel im Jahr 2012 in Bezug auf die Produktion, sowie den Im- und Export (nach FAO, 2012)

Derzeit leben in Asien über vier Milliarden Menschen, und seine Bevölkerung macht somit fast 60 Prozent der Weltbevölkerung aus (STATISTA, 2014). Dies erklärt, warum Asien die geringste Pro-Kopf-Versorgung hat, obwohl dieser Kontinent der größte Fleischproduzent ist.

Rindfleisch

Die weltweite Rindfleischproduktion betrug im Jahr 2012 insgesamt 66,8 Mio. t (Abbildung 2). Als größte Produzenten sind Asien (17,4 Mio. t) und Südamerika (14,8 Mio. t) zu nennen, die zusammen einen prozentualen Anteil von 48,2 % ausmachten (FAO, 2012). China, Indien und Pakistan sind dabei die drei wichtigsten Länder des asiatischen Kontinentes (FAO, 2012). In Südamerika waren die beiden Länder Brasilien (9,2 Mio. t) und Argentinien (2,6 Mio. t)

deutlich dominant. Als drittgrößter Produzent folgte Nordamerika mit 12,9 Mio. t, wobei die Vereinigten Staaten von Amerika hierzu mit 11,7 Mio. t und das Nachbarland Kanada mit 1,2 Mio. t beitrugen. Europa produzierte insgesamt 10,5 Mio. t, wobei der Großteil davon aus der Europäischen Union stammte (7,7 Mio. t) und die restliche Menge aus der Russischen Föderation (1,6 Mio. t) und den übrigen europäischen Ländern. In Afrika wurden 5,8 Mio. t Rindfleisch produziert. Vergleichsweise kleine Mengen Rindfleisch produzierten die Kontinente Ozeanien (2,8 Mio. t) und Mittelamerika (2,6 Mio. t) (Abbildung 2) (FAO, 2012).

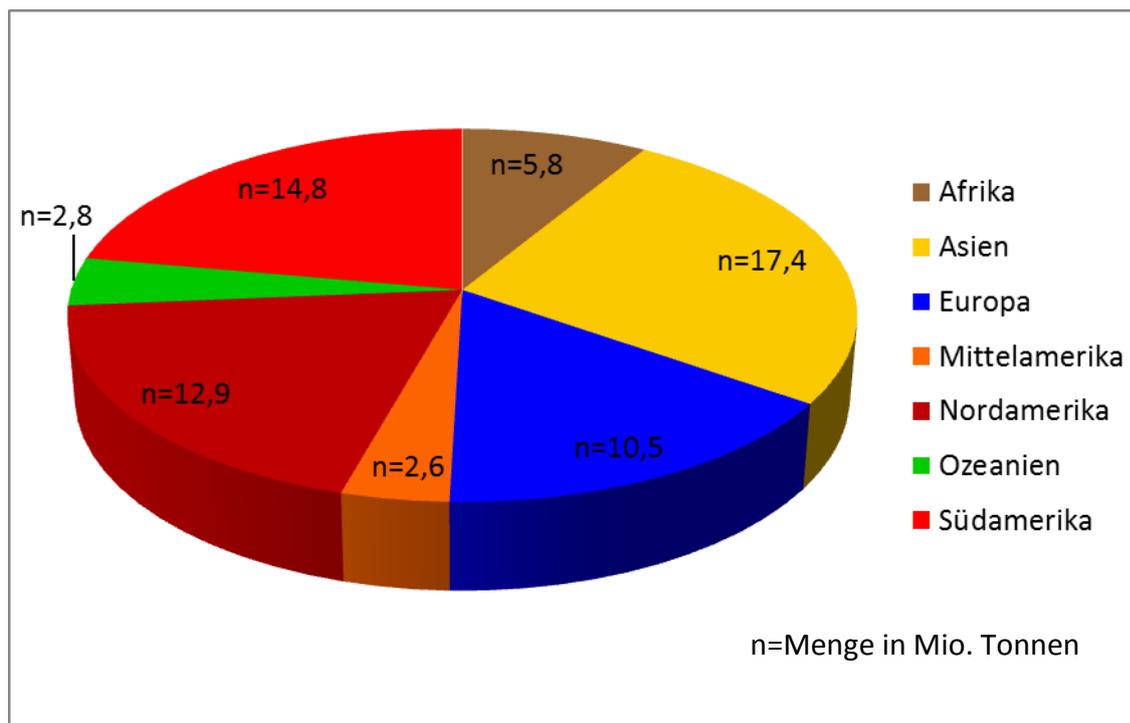


Abbildung 2: Rindfleischproduktion der verschiedenen Kontinente im Jahr 2012 in Mio. t (nach FAO, 2012)

Der Rindfleischhandel hatte im Jahr 2012 mit 15,7 Mio. t einen Anteil von ca. 27,5 % am gesamten Fleischhandel (57,0 Mio. t) (Abbildung 3). Die größten Rindfleischexporteure waren Südamerika (2,1 Mio. t), Asien (1,8 Mio. t), Ozeanien (1,8 Mio. t) und Nordamerika (1,5 Mio. t). Asien importierte die größten Mengen Rindfleisch (3,5 Mio. t), gefolgt von Europa (1,4 Mio. t) und Nordamerika (1,3 Mio. t) (Abbildung 3) (FAO, 2012).

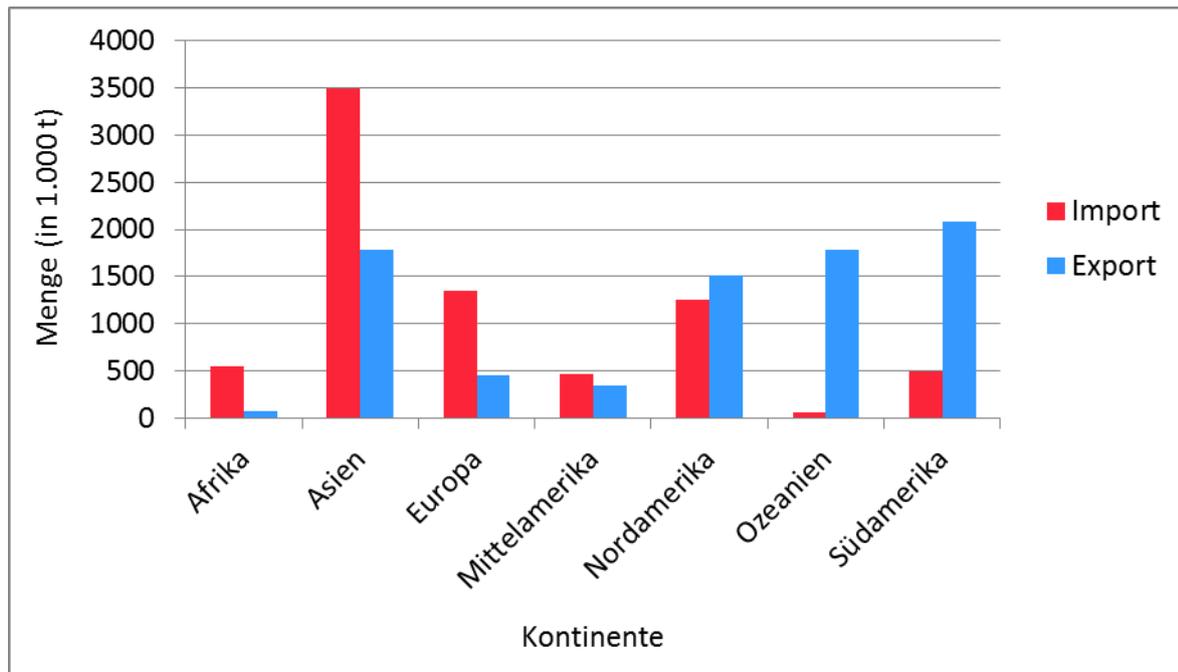


Abbildung 3: Import und Exportanteile der verschiedenen Kontinente am globalen Rindfleischhandel im Jahr 2012 (nach FAO, 2012)

Lamm- und Schaffleisch

Die weltweite Lamm- und Schaffleischproduktion betrug im Jahr 2012 13,9 Mio. t (Abbildung 4) und machte damit einen Anteil von ca. 4,6 % an der gesamten Fleischproduktion aus (FAO, 2012). Als führende Produzenten sind hier die Kontinente Asien (8,2 Mio. t) und Afrika (2,9 Mio. t) zu nennen (Abbildung 4). Bemerkenswert ist, dass in China fast die Hälfte (3,9 Mio. t) des in Asien produzierten Lammfleisches hergestellt wurde. Es folgten Europa (1,3 Mio. t) und Ozeanien mit 1 Mio. t. Südamerika produzierte 0,32 Mio. t Lamm- bzw. Schaffleisch, wobei Brasilien mit einem Anteil von 36,0 % der wichtigste Stellvertreter dieses Kontinentes war. Mittel- und Nordamerika spielten bei der Lammfleischproduktion eine eher unwichtige Rolle (Abbildung 4) (FAO, 2012).

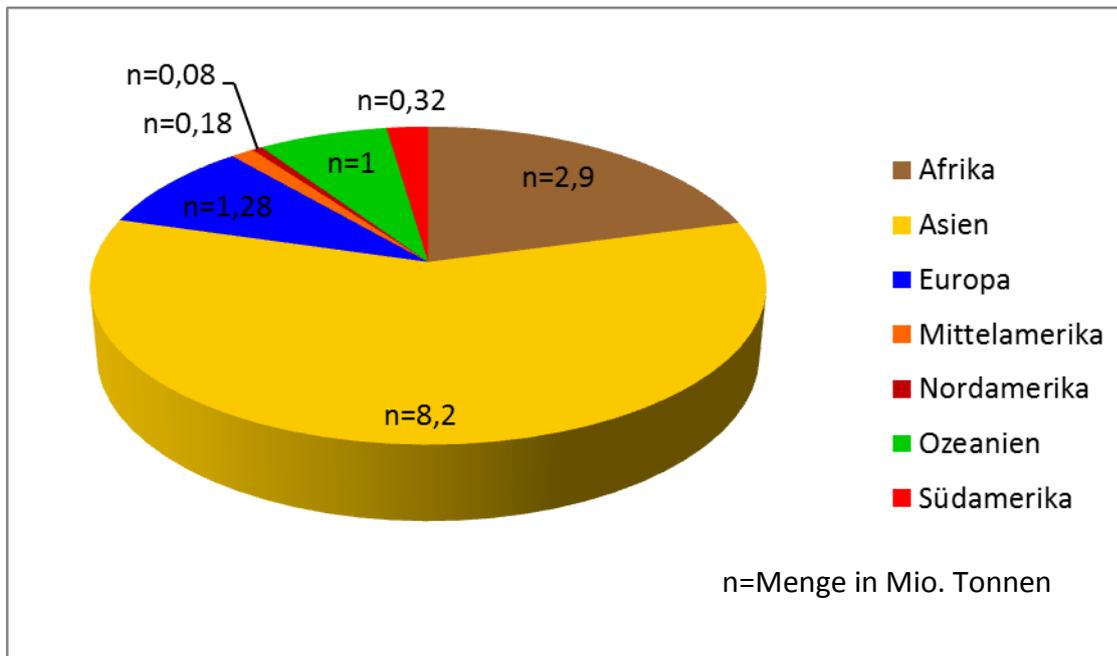


Abbildung 4: Lamm- und Schaffleischproduktion der verschiedenen Kontinente im Jahr 2012 (nach FAO, 2012)

Der Lammfleischhandel spielte beim Gesamtfleischhandel eine eher unwichtige Rolle und machte mit 1,5 Mio. t einen prozentualen Anteil von 2,6 % aus (FAO, 2012). Von den insgesamt 757.000 weltweit exportierten Tonnen Lammfleisch, stammten 640.000 t allein aus Ozeanien (Abbildung 5). Somit exportierte Ozeanien 63,2 % seines Lammfleisches und war damit der mit Abstand wichtigste Exporteur weltweit. Australien und Neuseeland waren jeweils für ungefähr die Hälfte des Gesamtexportes verantwortlich. Im Gegensatz dazu wurden von diesem Kontinent mit relativ kleine Mengen Lammfleisch importiert. Die restlichen Kontinente waren als Exporteure vergleichsweise unwichtig. Obwohl Asien der größte Produzent war, wurden von diesem Kontinent auch die größten Mengen mit 421.000 t importiert, gefolgt von Europa mit 165.000 t Lammfleisch. Afrika hatte trotz seiner hohen Lammfleischproduktion einen sehr geringen Anteil am gesamten globalen Lammfleischhandel (Abbildung 5) (FAO, 2012).

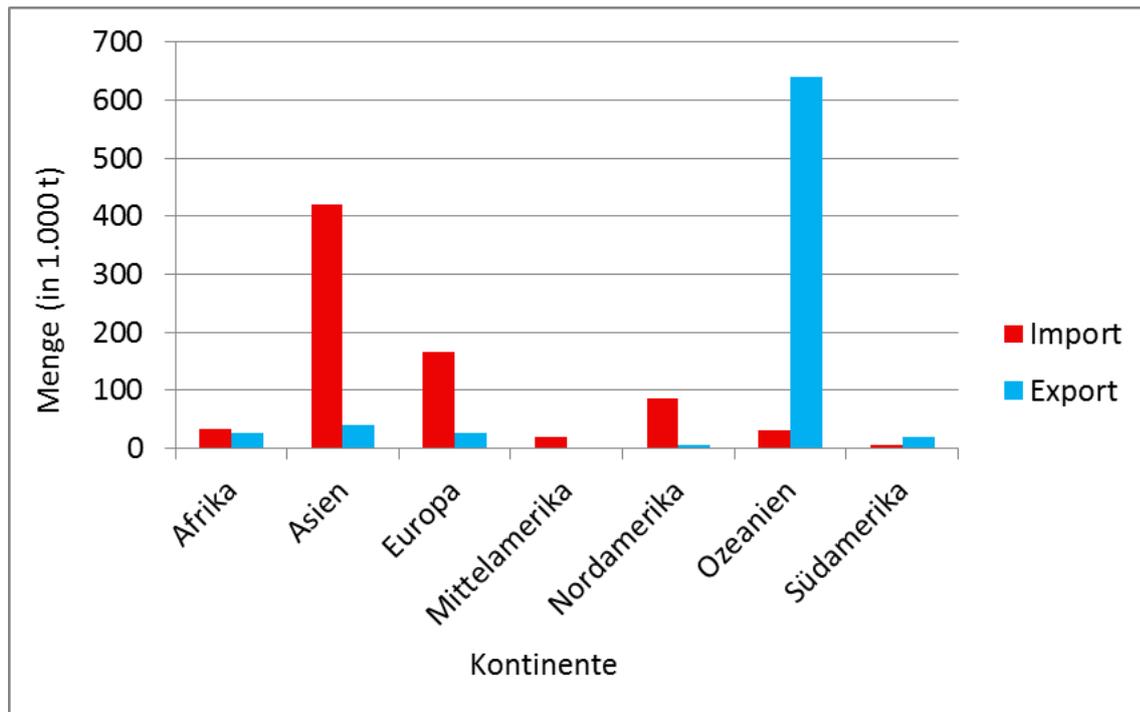


Abbildung 5: Import und Exportanteile der Kontinente am globalen Lamm- und Schaffleischhandel im Jahr 2012 (nach FAO, 2012)

2.2 Verderb von vakuumverpacktem Fleisch

2.2.1 Fleischreifung und Fleischverderb

Entscheidende Qualitätskriterien für Fleisch sind seine Genuss- und Verzehrfähigkeit, seine Verarbeitungseigenschaften sowie sein Nähr- und Gesundheitswert (HOFMANN, 1973; BINKE, 2004). Bevor frisches Fleisch diese Qualitätskriterien erfüllt, muss es vor dem Verzehr einen Reifungsprozess durchlaufen. Erst durch biochemische Veränderungen während der Reifung erhält Fleisch jene Charakteristika, die vom Verbraucher gewünscht sind. Es wird zart und saftig, bekommt eine mürbe Konsistenz sowie einen säuerlich-aromatischen Geruch. Andernfalls ist ungereiftes Fleisch nach der Zubereitung schwer kaubar und fade im Geschmack und Geruch (BÖHME, 1981).

Der Reifungsprozess des Fleisches wird von diversen Faktoren wie Temperatur, Tierart, Alter, Geschlecht, Haltung und Schlachtzustand der Tiere beeinflusst (BÖHME, 1981). Bei der Fleischreifung handelt es sich um einen muskelzellinternen Vorgang, der bereits während des Kühlens nach dem Schlachten beginnt und auf körpereigenen, proteolytischen Enzymen beruht (BÖHME, 1981; BINKE, 2004; HONIKEL, 2004). Im Verlauf der Reifung unterscheidet

man grundsätzlich zwei Phasen. Die erste Phase findet während der Glykogenolyse statt, bei der die energiereichen Substanzen wie Kreatinphosphat, Glykogen und ATP abgebaut werden (HONIKEL, 2004). Dadurch entsteht eine Anhäufung von Milchsäure, die für das Absinken des pH-Wertes des Fleisches bis zu einem Endwert von ca. 5,5 verantwortlich ist. Am Ende dieser Phase tritt durch ATP-Mangel der Rigor mortis ein, der als der Zustand der höchsten Zähigkeit zu bezeichnen ist (HONIKEL, 2004). Grund für diese Zähigkeit des Fleisches ist die Verkürzung der Sarkomere der Myofibrillen (KOOHMARAIE et al., 1996). Die Erschöpfung der ATP-Reserven ist mit einer langsamen Freisetzung der Kalzium-Ionen aus den intrazellulären Speichern verbunden (HONIKEL und SCHWÄGELE, 2006). Die zweite Phase führt von diesem Zustand der höchsten Zähigkeit zu einer langsamen, aber stetigen Zunahme der Zartheit, und stellt somit die eigentliche Reifungsphase dar (HONIKEL, 2004). In der Literatur werden drei Gruppen von Proteasen erwähnt, die mit einer Beteiligung an der postmortalen Proteolyse in Verbindung gebracht werden. Diese sind Kalpaine, Kathepsine und sogenannte „Multikatalytische Proteinase“ (MCP=multicatalytic proteinases) (HONIKEL und SCHWÄGELE, 2006; KOOHMARAIE und GEESINK, 2006). Das Kalpain-System, bestehend aus mindestens drei Proteinase (μ -Kalpain, m-Kalpain und Kalpain 3), die durch Kalzium aktiviert werden, und dem Inhibitor Kalpastatin, wird als hauptverantwortliches Enzymsystem der postmortalen Proteolyse betrachtet (KOOHMARAIE und GEESINK, 2006).

Das Zartwerden des Fleisches wird im Wesentlichen durch die postmortale Proteolyse gesteuert (HONIKEL, 2004; KOOHMARAIE und GEESINK, 2006). Der Ablauf dieses Prozesses wird durch den pH-Wert, die Temperatur und Zeitdauer der Reifung beeinflusst. Außerdem kann das Zartwerden durch mechanische Einwirkung von Zug- und Druckkräften, durch Zerreißen und die dadurch ausgelöste Freisetzung lysosomaler Enzyme positiv beeinflusst werden (AUGUSTINI und FISCHER, 1999; HONIKEL, 2004).

Bis in die 1970er Jahre war es üblich, das Reifen des Fleisches durch das sogenannte Abhängen, das jetzt unter dem Begriff „Dry Aging“ neue Popularität erlangt hat, durchzuführen. Dafür werden die Tierkörper bzw. Tierkörperhälften oder -viertel ein bis zwei Tage bei einer relativen Feuchtigkeit von 85-90 %, guter Luftumwälzung und schwacher Luftgeschwindigkeit auf eine Kerntemperatur von +1 °C bis +2 °C heruntergekühlt und an ihrer Oberfläche getrocknet. Anschließend wird das Fleisch bei ca. +2 °C und ca. 85 % relativer Luftfeuchtigkeit weiter abgehängt. Die Reifedauer beträgt unter diesen

Umständen bei Rindfleisch je nach Größe des Teilstücks zwei bis fünf Wochen, bei Schaffleisch drei bis sieben Tage (BÖHME, 1981; SAVELL, 2008).

In den frühen 1970er Jahren gewann die Reifung und Lagerung von Rindfleisch-Teilstücken in der Vakuumverpackung, dem Wet Aging, an Bedeutung und verbreitete sich in den Betrieben der Fleischwirtschaft. Diese damals neue Methode der Fleischreifung und -Lagerung ermöglichte erstmalig einen langen Transport über Land oder See, bei dem die Qualität und Haltbarkeit des Fleisches gewährleistet war. Außerdem war der Schutz des Fleisches vor äußerlicher Kontamination geboten. Somit eröffnete dieses Abpackverfahren neue Wege für den globalen Kühlfleisch-Versand, wirkte sich positiv auf die weltweite Marktsituation aus und half beispielsweise Deutschland, seinen Rindfleischmangel in den 1970er Jahren durch Übersee-Importe zu kompensieren (HEINZ, 1974). Zudem entfallen bei der Fleischreifung im Vakuumbeutel die Verluste, die bei der konventionellen Methode des Reifens durch Austrocknung und Oxydation der Oberflächen entstehen. Das Verarbeitungsfleisch kann verlustfrei verwertet werden. Außerdem wird ein wirksamer Schutz des Fleisches vor Verunreinigung, Kontamination mit Keimen, Insekten- und Schimmelbefall geboten (TÄNDLER und HEINZ, 1970; BÖHME, 1981).

Der Fleischverderb kann, wie der allgemeine Lebensmittelverderb, durch chemisch-physikalisch-biochemische, biologische und mikrobiologische Ursachen hervorgerufen werden (FEHLHABER, 2004). Bei Fleisch und den meisten leichtverderblichen Fleischwaren begrenzen meistens mikrobielle Aktivitäten die Haltbarkeit (LÜCKE und TROEGER, 2006). Im Laufe der Zeit vermehrt sich die Mikrobiota auf Fleisch, und führt zu Veränderungen der Fleischeigenschaften und letztlich zum Verderb (GRAM et al., 2002; FUNG, 2010; DOULGERAKI et al., 2012).

Mögliche chemisch-physikalisch-biochemische Ursachen für den Fleischverderb sind autolytische Prozesse, atmosphärische Einflüsse, wie Sauerstoff (Oxidation), Wärme (Begünstigung von mikrobiellem Wachstum) und Austrocknung, Verunreinigungen, wie Schmutz, Staub und Fremdkörper. Unter den biologischen Verderbsursachen des Fleisches sind folgende zu nennen: physiologische Abweichungen wie z. B. der Sexualgeruch beim Eber sowie Fütterungs- und Haltungsbedingungen (Auswirkung auf die Fleischqualität). Außerdem können Parasiten- (z. B. Zystizerken, Nematodenlarven, Sarcosporidien) und Schädlingsbefall (z. B. Schaben, Fliegen, Käfer) für den Verderb von Fleisch verantwortlich

sein (FEHLHABER, 2004). Die Ursachen des mikrobiellen Fleischverderbs werden im folgenden Kapitel behandelt (siehe 2.2.2).

2.2.2 Ursachen des mikrobiellen Verderbs

Von mikrobiellem Verderb wird gesprochen, wenn Mikroorganismen durch ihre Vermehrung und Stoffwechsellätigkeiten ein Lebensmittel so weit in seiner sinnfälligen Beschaffenheit verändern, dass sein Gebrauchswert erheblich beeinträchtigt wird oder seine bestimmungsgemäße Verwendung ausgeschlossen ist (FEHLHABER, 2004).

Fleisch gilt als leicht verderbliches Lebensmittel, da seine chemische Zusammensetzung mikrobielles Wachstum begünstigt. Es enthält Wasser und Proteine in großen Mengen sowie Fett, Kohlenhydrate, Reststickstoff und Mineralstoffe in kleineren Mengen, und dient somit als ideales Nährsubstrat für Mikroorganismen (REUTER, 2003). Die Mikroorganismen im Fleisch und auf seinen Oberflächen stammen von der äußeren und inneren Mikrobiota des Schlachttieres, der Umgebungsmikrobiota des Schlacht- und Verarbeitungsbetriebes einschließlich dem Personal (REUTER, 2003). Das bakterielle Wachstum auf dem Fleisch und die damit verbundenden Stoffwechselaktivitäten der Mikrobiota nehmen im Laufe der Lagerungszeit zu. Dadurch können Veränderungen der sensorischen Eigenschaften des Fleisches, und letztlich sein Verderb, hervorgerufen werden (GRAM et al., 2002; FUNG, 2010; DOULGERAKI et al., 2012).

Die unterschiedlichen Mikroorganismen, die potenziell Verderb verursachen können, werden stark von den Lagerungsbedingungen des Fleisches beeinflusst. Außerdem gibt es innerhalb einer Fleischmikrobiota Wechselwirkungen (z.B. Antagonismus, Metabiose) zwischen den unterschiedlichen Mikroorganismen (BODDY und WIMPENNY, 1992; GRAM et al., 2002; DOULGERAKI et al., 2012). Bei gekühltem Rind- (ERCOLINI et al., 2006; ERCOLINI et al., 2009; ERCOLINI et al., 2010a; ERCOLINI et al., 2011; PENNACCHIA et al., 2011; DOULGERAKI et al., 2012) und Schweinefleisch (LI et al., 2006; JIANG et al., 2010) haben die Ausgangskeimzahlbelastung, Lagerungsdauer und Art der Verpackung großen Einfluss auf die bakterielle Vielfalt der entstehenden Mikrobiota (LABADIE, 1999; NYCHAS et al., 2008).

Die Ergebnisse zahlreicher Studien haben gezeigt, dass nur ein Teil der Ausgangsmikrobiota, bestehend aus Spezies und Stämmen, Verderb verursacht. Diese Mikroorganismen werden als „Ephemeral/Specific Spoilage Organisms“ (E/SSOs) bezeichnet, da sie das Potential besitzen, sich zur dominierenden Verderbsmikrobiota zu entwickeln (NYCHAS et al., 1998;

GRAM et al., 2002; NYCHAS und SKANDAMIS, 2005; ERCOLINI et al., 2006; NYCHAS et al., 2008; ERCOLINI et al., 2011; PENNACCHIA et al., 2011).

Die Lagerungstemperatur des Fleisches gilt als wichtigster Einflussfaktor auf den mikrobiellen Fleischverderb, weil sie sich auf die Dauer der Latenzphase, die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit und die Wachstumsrate der Mikroorganismen auswirkt (LABUZA und FU, 1993; MATARAGAS et al., 2006; DOULGERAKI et al., 2012). Eine Senkung der Lagerungstemperatur hat zur Folge, dass psychrotrophe Bakterien die Mesophilen überwachsen.

Das Potential sich auf gekühltem Fleisch zu vermehren, haben sowohl grampositive (z.B. Milchsäurebakterien) als auch gramnegative (z.B. *Pseudomonas* spp.) psychrotrophe Bakterien (GILL und NEWTON, 1978). Die Bakterien, die am häufigsten mit dem Verderb von gekühltem Rind- und Schweinefleisch assoziiert werden sind *Brochothrix* (*Br.*) *thermosphacta*, *Carnobacterium* (*Cb.*) spp., *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus* (*Lb.*) spp., *Leuconostoc* (*Ln.*) spp., *Pseudomonas* (*P.*) spp. und *Shewanella* (*Sh.*) *putrefaciens* (DAINTY und MACKEY, 1992; BORCH et al., 1996).

Die Sauerstoffverfügbarkeit hat einen selektiven Einfluss auf die vorhandenen psychrophilen bakteriellen Gruppen. Die zwei wichtigsten Faktoren, die den Verderb unter aeroben Bedingungen begünstigen, aerobe Bakterien und oxydative Reaktionen, benötigen Sauerstoff. Ein Sauerstoffentzug hemmt daher den Verderb und maximiert gleichzeitig die Qualität und die Haltbarkeit des Lebensmittels (CHURCH und PARSONS, 1995).

Bei unter aeroben Bedingungen gelagertem Fleisch dominieren gramnegative aerobe und/oder fakultativ anaerobe Bakterien die Mikrobiota. Bei anaerob gelagertem Fleisch macht sich eine Verschiebung der Mikrobiota bemerkbar, die von der Dominanz der grampositiven anaeroben oder fakultativ anaeroben Mikroorganismen gekennzeichnet ist (DOULGERAKI et al., 2012). Der Faktor Verpackungsart hat somit einen selektiven Einfluss auf die Verderbismikrobiota des Fleisches (PENNACCHIA et al., 2011; DOULGERAKI et al., 2012).

Des Weiteren wird die Mikrobiota von den intrinsischen Faktoren des Fleisches (gewebseigene Beschaffenheit, a_w - und pH-Wert) beeinflusst (BORCH et al., 1996; REUTER, 2003; LÜCKE und TROEGER, 2006). Die gewebseigene Beschaffenheit des Fleisches ist abhängig von der Tierart, dem Alter und Ernährungszustand des Tieres, sowie dem Funktionszustand der Gewebe und Organe vor dem Schlachten. Der a_w -Wert von Fleisch ist

relativ hoch und bewegt sich im Wesentlichen zwischen 0,995 und 0,985. Somit bietet er vielen Mikroorganismen (z.B. *Acinetobacter* spp., *Brochothrix* spp., *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudomonas* spp.) gute Vermehrungsbedingungen. Die Senkung des Fleisch-pH-Wertes, die bei der postmortalen Glykolyse entsteht, hat eine verlangsamende, jedoch keine unterbindende Wirkung auf die Vermehrung einiger Verderbsorganismen (REUTER, 2003).

2.2.2.1 Fleischverderb unter aeroben Bedingungen

Unter aeroben Bedingungen entwickelt sich auf gekühltem Fleisch die sogenannte *Pseudomonas-Acinetobacter*-Assoziation (REUTER, 2003) und wenige andere psychrotrophe, gramnegative Bakterien (BORCH et al., 1996; GRAM et al., 2002) zur dominierenden Mikrobiota. Unter den *Enterobacteriaceae* sind die Arten *Serratia* (*Se.*), *Pantoea*, *Klebsiella*, *Proteus* und *Hafnia* als Verderbserreger von gekühltem Fleisch am bedeutendsten (BORCH et al., 1996; NYCHAS et al., 1998).

Die verschiedenen Stoffwechselprodukte der Mikroorganismen verursachen sensorische Veränderungen des Fleisches (GRAM et al., 2002), wie Geruchs- und Geschmacksabweichungen, Auflagerungen auf den Fleischoberflächen, Verfärbungen und Gasproduktion (BORCH et al., 1996; REUTER, 2003). Die Geruchsabweichungen des Fleisches werden als süß und fruchtig, schwefelig, käsig, muffig und faulig beschrieben (DAINTY und MACKEY, 1992; LÜCKE und TROEGER, 2006).

Mit dem Verderb von gekühltem Fleisch werden insbesondere Spezies der Gattung *Pseudomonas* assoziiert, da sie sich unter aeroben Bedingungen schnell zur dominierenden Bakterienpopulation auf Fleisch entwickeln. *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. putida* und *P. lundensis* wurden am häufigsten aus gekühltem frischen und verdorbenen Rind-, Schweine- und Geflügelfleisch isoliert (MOLIN und TERNSTROM, 1982; DAINY und MACKEY, 1992; LABADIE, 1999; LIAO, 2006; ERCOLINI et al., 2007; ERCOLINI et al., 2009; ERCOLINI et al., 2010b; ERCOLINI et al., 2011). Bei einer Lagerungstemperatur von +2 °C und hoher Luftfeuchtigkeit verdoppeln sich *Pseudomonas* spp. etwa alle acht Stunden und überwachsen die ursprüngliche mesophile grampositive Mikrobiota sowie, insbesondere bei rotem Fleisch, die gegenüber Milchsäure empfindlicheren psychrotrophen Stämme, wie *Acinetobacter* spp. und *Psychrobacter* spp. (OLSSON et al., 2003; LÜCKE und TROEGER,

2006). *Pseudomonas* spp., insbesondere *P. fragi*, produzieren verschiedene Stoffwechselprodukte wie Amine, Ester, Ethylester, Thiole und Schwefelverbindungen, die für die Geruchsabweichungen von Fleisch verantwortlich sind (GILL, 1983; BORCH et al., 1996; LÜCKE und TROEGER, 2006). Die Spezies *P. fragi* wird als eine der wichtigsten Ursachen des aeroben Verderbs von gekühltem Fleisch betrachtet (ERCOLINI et al., 2010b).

Das grampositive, fakultativ anaerobe Bakterium *Br. thermosphacta* wird oft mit dem Verderb von frischem Fleisch assoziiert, und gilt als wichtiger Verderbserreger von gekühltem, frischem Fleisch (STANBRIDGE und DAVIES, 1998; RATTANASOMBOON et al., 1999; CANTONI et al., 2000; ERCOLINI et al., 2006; RUSSO et al., 2006; SAMELIS, 2006). Aufgrund seiner Fähigkeit sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen auf Fleisch zu wachsen, wird *Br. thermosphacta* eine wichtige Rolle bei der Besiedelung und beim Verderb von Fleisch beigemessen (DAINTY et al., 1983; LABADIE, 1999; PIN et al., 2002). Dieses Bakterium kann sich gelegentlich sogar zur dominierenden Spezies der Verderbsmikrobiota entwickeln (BORCH et al., 1996).

Psychrotrophe Spezies der *Enterobacteriaceae* vermehren sich bei Temperaturen unter +7 °C deutlich langsamer als *Pseudomonas* spp. (GILL und NEWTON, 1977). Aus der Gruppe der *Enterobacteriaceae* wird die Gattung *Serratia* spp. am häufigsten aus Fleisch isoliert (DOULGERAKI et al., 2012). Die Spezies *Se. liquefaciens*, *Hafnia alvei* und *Enterobacter (Pantoea) agglomerans* besitzen unter den *Enterobacteriaceae* das größte Verderbspotential (SAMELIS, 2006).

2.2.2.2 Fleischverderb unter anaeroben Bedingungen

Das Vakuumieren von Fleisch ist, in Kombination mit niedrigen Lagerungstemperaturen, eine effektive Methode, um die Haltbarkeit von Fleisch zu verlängern (LAMBERT et al., 1991; PENNACCHIA et al., 2011). Bei vakuumverpacktem Fleisch ändert sich im Laufe der Lagerungszeit die Gaszusammensetzung in der Verpackung: die Sauerstoffkonzentration nimmt ab, während die Kohlenstoffdioxidkonzentration zunimmt (GILL und MOLIN, 1991). Das entstehende anaerobe Milieu hat einen selektiven Effekt auf die Entwicklung der vorhandenen Mikrobiota, da das Wachstum aerober Bakterien gehemmt, während das Wachstum anaerober und fakultativ anaerober Bakterien begünstigt wird (PENNACCHIA et al., 2011; DOULGERAKI et al., 2012).

Während das Wachstum aerober *Pseudomonas* spp. gehemmt wird, entwickeln sich aerotolerante Milchsäurebakterien oder fakultative Anaerobier, wie *Enterobacteriaceae*, zur dominierenden Verderbsmikrobiota (GILL und NEWTON, 1978; LAMBERT et al., 1991). Auf gekühltem, vakuumverpacktem Rind-, Schwein- und Lammfleisch dominieren allmählich psychrotolerante Milchsäurebakterien, vor allem Spezies der Gattungen *Carnobacterium*, *Lactobacillus* und *Leuconostoc* (SHAW und HARDING, 1984; BELL und GAROUT, 1994; GREER et al., 1994; BORCH et al., 1996; BLIXT und BORCH, 2002; SAKALA et al., 2002b; SAKALA et al., 2002a; YOST und NATTRESS, 2002; FONTANA et al., 2006; LI et al., 2006; JIANG et al., 2010; PENNACCHIA et al., 2011). Auf Speziesebene werden *Cb. divergens*, *Cb. maltaromaticum*, *Lb. algidus*, *Lb. curvatus*, *Lb. fuchuensis*, *Lb. sakei*, *Ln. gelidum* und *Ln. carnosum* am häufigsten erwähnt (SHAW und HARDING, 1984; SAKALA et al., 2002b; SAKALA et al., 2002a; JONES, 2004; ERCOLINI et al., 2006; FONTANA et al., 2006; ERCOLINI et al., 2010a).

Einige Milchsäurebakterien sind in der Lage, antimikrobielle Produkte zu bilden und dadurch das Wachstum anderer kompetitiver Mikroorganismen auf Lebensmitteln zu hemmen. Daher werden sie als wichtige Antagonisten anderer Mikroorganismen, wie einiger anaerober Verderbserreger (*Enterococcus* spp., *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp.) und Pathogener (z.B. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*) angesehen (RACCACH und BAKER, 1978; DUBOIS et al., 1979; AHN und STILES, 1990; STANBRIDGE und DAVIES, 1998; TSIGARIDA et al., 2000; CASTELLANO et al., 2004; NYCHAS und SKANDAMIS, 2005).

Bei gekühltem vakuumverpacktem Fleisch wirkt die niedrige Temperatur zusätzlich als limitierender Faktor auf das Wachstum von Mikroorganismen wie *Pseudomonas* spp. und einiger *Enterobacteriaceae*, so dass Verderb unter diesen Umständen in der Regel mit psychrotoleranten Milchsäurebakterien assoziiert wird (DAINTY et al., 1983; SHAW et al., 1985; AHN und STILES, 1990; BORCH et al., 1996; GILL, 1996; JONES, 1999). Auf Speziesebene wurden aus verdorbenem, vakuumverpacktem Fleisch am häufigsten *Cb. divergens*, *Cb. maltaromaticum* und *Lb. sakei* isoliert (STANBRIDGE und DAVIES, 1998; SAKALA et al., 2002b; JONES, 2004; LAURSEN et al., 2005; ERCOLINI et al., 2009; ERCOLINI et al., 2010a).

Tabelle 4: Übersicht über verderbsassoziierte Bakterien bei frischem, vakuumverpacktem Fleisch

Verderbsassoziierte Bakterien	Fleischart	Lagertemperatur	Quelle
<i>Br. thermosphacta</i>	Rind	+4 °C	PENNACCHIA et al. (2011)
	Rind	+4 °C	
	Schwein	+4 °C	LI et al. (2006), JIANG et al. (2010)
<i>Clostridium</i> spp.	Lamm	+2 °C	BRODA et al. (1996a)
<i>Cl. algidicarnis</i>	Rind, Lamm	+4 °C	BRODA et al. (1996b), CAVILL et al. (2011), SILVA et al. (2011)
<i>Cl. estertheticum</i>	Rind	+2 °C, +4 °C	BOEREMA et al. (2003), PICHNER et al. (2012), ZIEGLER et al. (2008)
<i>Cl. frigidicarnis</i>	Rind	-1 bis -2 °C	DAINTY et al. (1989)
<i>Cl. gasigenes</i>	Rind	+4 °C	SILVA et al. (2011)
<i>Cl. putrefaciens</i>	Lamm	+2 °C	BRODA et al. (2000)
<i>Cl. putrefaciens</i>	Lamm	n.a.	CAVILL et al. (2011)
<i>Enterobacteriaceae</i> spp.	Rind, Schwein	+4 °C	BLIXT und BORCH (2002)
<i>Se. grimesii</i>	Rind	+4 °C	PENNACCHIA et al. (2011)
<i>Se. marcescens</i>	Rind	+4 °C	PENNACCHIA et al. (2011)
<i>Se. proteamaculans</i>	Rind	+7 °C	ERCOLINI et al. (2009)
<i>Rhanella</i> spp.	Rind°	+4 °C	PENNACCHIA et al. (2011)
<i>Photobacterium</i> spp.	Rind	+4 °C	PENNACCHIA et al. (2011)
<i>Pseudomonas</i> spp.	Schwein	+4 °C	LI et al. (2006)
	Rind, Schwein	+4 °C	BLIXT und BORCH (2002)
<i>P. fragi</i>	Rind	+7 °C	ERCOLINI et al. (2009)
Milchsäurebakterien			
<i>Lactobacillus</i> spp.	Rind, Schwein	+4 °C	BLIXT und BORCH (2002)
<i>Lb. algidus</i>	Rind	+2 °C, +4 °C	KATO et al. (2000), DOULGERAKI et al. (2012)
	Rind	+4 °C	PENNACCHIA et al. (2011)
<i>Lb. curvatus</i>	Rind	+2 °C, +8 °C	FONTANA et al. (2006)
<i>Lb. fuchuensis</i>	Rind	+2 °C	SAKALA et al. (2002b)
<i>Lb. sakei</i>	Rind	+2 °C, +8 °C,	FONTANA et al. (2006)
	Rind	+4 °C	PENNACCHIA et al. (2011)
	Schwein	+2 °C	JIANG et al. (2010)
<i>Lactococcus</i> spp.	Rind, Schwein	+2 °C	FONTANA et al. (2006), JIANG et al. (2010)
<i>Lc. piscium</i>	Schwein	+2 °C	JIANG et al. (2010)
<i>Leuconostoc</i> spp.			
<i>Ln. carnosum</i>	Rind	+2 °C, +8 °C	FONTANA et al. (2006)
<i>Ln. gelidum</i>	Rind	+2 °C, +8 °C	FONTANA et al. (2006), YOST und NATTRESS (2002)
<i>Carnobacterium</i> spp.	Rind, Schwein	+2 °C, +4 °C	PENNACCHIA et al. (2011), JIANG et al. (2010)
<i>Cb. divergens</i>	Schwein	+2 °C	JIANG et al. (2010)
	Rind	+4 °C	ERCOLINI et al. (2011), PENNACCHIA et al. (2011)
	Rind	n.a.	LAURSEN et al. (2005)
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Rind	n.a.	MOLIN und TERNSTROM (1982) NYCHAS et al. (2008)

Br.=Brochothrix, *Cl.*=Clostridium, *Lb.*=Lactobacillus, *Lc.*=Lactococcus, *Ln.*=Leuconostoc, *Se.*=Serratia, *Cb.*=Carnobacterium, n. a.=nicht angegeben

Aber auch psychrophile *Clostridium (Cl.)* spp. können bei gekühltem, vakuumverpacktem Fleisch anaeroben Verderb in den tieferen Muskelschichten verursachen und sogar zur Bombage von Verpackungen, den sogenannten „Blown Packs“, führen (BRODA et al., 1996b; BRODA et al., 2000; BRODA et al., 2003; ADAM et al., 2010; PICHNER et al., 2012) (Tabelle 4).

Des Weiteren gilt *Sh. putrefaciens*, ein gramnegatives, fakultativ anaerobes Bakterium, als wichtiger Verderbserreger von gekühltem, vakuumverpacktem Fleisch, da es durch die Produktion bestimmter Stoffe, wie z. B. Schwefelwasserstoff, Geruchsabweichungen und Verfärbungen des Fleisches hervorrufen kann (DOULGERAKI et al., 2012).

Die Verderberscheinungen bei vakuumverpacktem Fleisch äußern sich als Geruchs- und Geschmacksabweichungen, Verfärbungen und Gasproduktion in der Verpackung (BORCH et al., 1996).

Ein saurer, stechender Geruch ist charakteristisch für verdorbenes vakuumverpacktes Fleisch (BORCH et al., 1996). Verantwortlich dafür ist die Milch- und Essigsäureproduktion durch Milchsäurebakterien (DAINTY und MACKAY, 1992). Entstehende Schwefelverbindungen können ebenfalls zu Geruchsabweichungen beitragen (EDWARDS und DAINTY, 1987). Unter anaeroben Bedingungen können homofermentative *Lactobacillus* spp. bei vakuumverpacktem Rindfleisch nach längerfristiger Lagerung bei 0 °C Essigsäure und Schwefelwasserstoff produzieren (EGAN et al., 1989; BORCH et al., 1991). Laut EGAN et al. (1988) erhält anaerob verdorbenes Rindfleisch nach zehn Wochen Lagerungszeit bei 0 °C einen atypischen Geschmack, „off“-flavour-, der auch nach der Zubereitung deutlich zu vernehmen ist. Dieser Geschmack wird für gewöhnlich als käsig, sauer oder säuerlich beschrieben, nach längerer Lagerung auch als bitter und leber-ähnlich. Verantwortlich für diese Veränderungen der spezifischen Eigenschaften des Fleisches ist die Anhäufung diverser saurer Stoffwechselprodukte, die aus dem kontinuierlichen Wachstum der Milchsäurebakterien resultierten (EGAN et al., 1988).

Nach SHAW et al. (1980) wird die verderbsankündigende Geruchsabweichung bei gekühltem vakuumverpacktem Lammfleisch als käsig, sauer und manchmal sulfidisch beschrieben. Zusätzlich können eine braune Verfärbung des Lammfleisches und eine Trübung der Fettfarbe eintreten. Aus ihren Ergebnissen schlossen SHAW et al. (1980), dass wahrscheinlich *Br. thermosphacta* und Milchsäurebakterien für die sensorischen Abweichungen des Fleisches verantwortlich waren.

2.2.3 Haltbarkeit von vakuumverpacktem Rind- und Lammfleisch

Nach der deutschen Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung (LMKV, 1999) ist der Begriff „Mindesthaltbarkeitsdatum“ als jenes Datum definiert, bis zu dem ein Lebensmittel unter angemessenen Aufbewahrungsbedingungen seine spezifischen Eigenschaften beibehält. Bei Lebensmitteln, die leicht verderblich sind und die nach kurzer Zeit eine unmittelbare Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellen können, soll anstelle des Mindesthaltbarkeitsdatums das Verbrauchsdatum angebracht werden. Die Lebensmittel sind in diesem Fall bis zu diesem Datum zu verbrauchen und dürfen nach Ablauf des Verbrauchsdatums nicht in den Verkehr gebracht werden. In beiden Fällen ist ein entsprechender Hinweis anzubringen, sofern das Mindesthaltbarkeits- bzw. Verbrauchsdatums nur bei Einhaltung bestimmter Temperaturen oder sonstiger Bedingungen gewährleistet ist (LMKV, 1999).

Die maximale Haltbarkeit von vakuumverpacktem Fleisch wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst (Tabelle 5). Zu nennen sind hier vor allem die Lagerungstemperatur, der pH-Wert, die Ausgangskeimbelastung, die Hygienebedingungen bei der Zerlegung und Verpackung sowie die Sauerstoffdurchlässigkeit des verwendeten Folienmaterials (TÄNDLER und HEINZ, 1970; HEINZ, 1974; EGAN et al., 1988; RODAS-GONZÁLEZ et al., 2011). Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die in der Literatur vorkommenden Angaben bezüglich der maximalen Haltbarkeit von vakuumverpacktem Rind- und Lammfleisch (Tabelle 5).

Diese Angaben sind nicht einheitlich. BELL und Garout (1994) untersuchten vakuumverpacktes Rindfleisch aus Irland, Australien und Neuseeland, das nach Saudi-Arabien importiert wurde. Bei ihrer Studie berücksichtigten sie die initiale Mikrobiota, die Sauerstoffdurchlässigkeit des Verpackungsmaterials, den pH-Wert sowie die Transport- und Lagerungstemperatur des Fleisches. Der pH-Wert (5,5 bis 5,9) und die Sauerstoffdurchlässigkeit des Folienmaterials ($< 40 \text{ ml/m}^2/24 \text{ h/atm}$) waren in allen fünf untersuchten Chargen überwiegend einheitlich. Bei zwei der fünf Chargen stellten sie nach 82 (11,7 Wochen) bzw. 136 Tagen (19,4 Wochen) nach dem Schlachtdatum einen fauligen Geruch fest, der Verderb indizierte. Bei diesen Chargen, mit durchschnittlichen Lagerungstemperaturen von $+0,7$ bzw. $+1,5 \text{ }^\circ\text{C}$, setzte der Verderb 35 bzw. 86 Tagen nach Eintritt der maximalen mesophilen Keimzahlen ($>7 \log_{10} \text{ KbE/cm}^2$) ein. Bei der Charge, bei der Verderb bereits nach 82 Tagen festgestellt wurde, wurden ein signifikanter Anteil von *Enterobacteriaceae* an der Verderbsmikrobiota (10 %) und höhere Lagerungstemperaturen

des Fleisches nachgewiesen, und als Gründe für den früher eingesetzten Verderb angenommen.

Tabelle 5: Haltbarkeiten von vakuumverpacktem Rind- und Lammfleisch bei unterschiedlichen Temperaturen und O₂-Permeabilitäten des Folienmaterials

Fleischart	Haltbarkeit in Wochen	Temperaturbereich	Angabe einer bestimmten Sauerstoffdurchlässigkeit der Folie	Quelle
Rind	4-5	0 °C	n.a.	TÄNDLER und HEINZ (1970)
	3-4	+2 °C	n.a.	TÄNDLER und HEINZ (1970)
	2-3	+4 °C	n.a.	TÄNDLER und HEINZ (1970)
	4	+2 °C	n.a.	HEINZ (1974)
	10-12	0 °C	50 ml/m ² /24 h/atm (gemessen bei +25 °C und 98 % R.H.)	EGAN et al. (1988)
	12,8 19,4 >21	+1,5 °C +0,7 °C -0,9 bis +0,9 °C	40 ml/m ² /24 h/atm (gemessen bei +25 °C und 90 % R.H.)	BELL und GAROUT (1994)
	9,4	0 °C	n.a.	LEE und YOON (2001)
	Lamm	12	-0,5 °C	Plastikfilm, 140cc/m ² /24 h (gemessen bei +25 °C und 90 % R.H)
>12		-0,5 °C	Verbundfolie, nicht messbar niedrige Sauerstoffdurchlässigkeit	GILL und PENNEY (1985)
9-12		-0,5 °C	schrumpffähige Folie, 30-40 cc/m ² /24 h (gemessen bei +25 °C und 90 % R.H.)	GILL und PENNEY (1985)
9-12		-0,5 °C	Verbundfolie, nicht messbar niedrige Sauerstoffdurchlässigkeit	GILL und PENNEY (1985)
6-8		0 °C	50 ml/m ² /24 h/atm (gemessen bei +25 °C und 98 % R.H.)	EGAN et al. (1988)
11,1		-1 °C bis 0 °C	n.a.	HOLDS et al. (2010)

atm: physikalische Atmosphäre n.a.: nicht angegeben
R.H.: relative Feuchtigkeit cc: Kubikzentimeter

Insgesamt schlossen BELL und GAROUT (1994) aus ihren Ergebnissen, dass die Haltbarkeit von vakuumverpacktem Rindfleisch mit normalem pH-Wert (5,5 bis 5,9) stark variieren kann, da sie von der initialen Keimzahlbelastung sowie der Transport- und Lagerungstemperatur

des Fleisches beeinflusst wird. Je höher diese Parameter sind, desto früher setzt der Fleischverderb ein. Allerdings spielt, neben den initialen Keimzahlen, auch die Zusammensetzung der Mikrobiota eine große Rolle. *Enterobacteriaceae* tragen, als Teil der Mikrobiota, erheblich zum Fleischverderb bei (BELL und GAROUT, 1994).

BLIXT und BORCH (2002) untersuchten den Einfluß intrinsischer Faktoren auf die Haltbarkeit von gekühltem, vakuumverpacktem Schweine- und Rinderhackfleisch (jeweils aus Schweinenacken, Schweinelende, Entrecôte oder Rinderlende). In ihren Untersuchungen berücksichtigten sie den pH-Wert, die Glukose- und die Glukose-6-Phosphat-Konzentration, die Konzentration von L-Lactat sowie den Fettgehalt des Fleisches. Bei den verschiedenen Schweine- und Rinderhackfleischproben, die ähnliche Ausgangskeimzahlen zeigten, ließen sich Unterschiede in Bezug auf die Verderbsraten und die bakteriellen Wachstumsraten feststellen. Teilweise wurden nach bereits zwei Wochen Lagerung des Fleisches bei +4 °C erste Geruchsabweichungen festgestellt. Nach fünf Wochen Lagerung bei +4 °C ließ sich ein stark unangenehmer Geruch nachweisen (BLIXT und BORCH, 2002). Sie schlossen aus ihren Ergebnissen, dass sich ein niedriger Ausgangs-pH-Wert (<5,45), niedriger Fettgehalt und eine hohe L-Lactat-Konzentration (>860 mg/100g Fleisch) des Fleisches positiv auf die Haltbarkeit des Fleisches auswirken. Außerdem kamen sie zu dem Schluss, dass bei ähnlicher initialer Keimzahlbelastung des Fleisches, andere, intrinsische Faktoren (pH-Wert, Fettgehalt, L-Lactat-Konzentration) den Verderb beeinflussen. Des Weiteren ließ sich keine Korrelation zwischen der Verderbsrate und der Fleischart (Rind oder Schwein) erstellen (BLIXT und BORCH, 2002).

Bei vakuumverpacktem Rindfleisch, das aus den USA nach Korea exportiert wurde, wurden aerobe mesophile Keimzahlen von $>7 \log_{10} \text{KbE/cm}^2$ nach 52 Tagen Lagerung bei 0 °C ermittelt, allerdings wurden die ersten Geruchsabweichungen nach 66 Tagen (9,4 Wochen) Lagerung festgestellt (LEE und YOON, 2001). Starke sensorische Veränderungen (Verfärbungen und schlechter Geruch nach dem Öffnen der Verpackung, schlechter Geruch und Geschmack sowie Zähigkeit und Trockenheit nach der Zubereitung des Fleisches) wurden nach 72 Tagen Lagerung bei 0 °C ermittelt. Bei dieser Studie wurde festgestellt, dass das anfänglich (bis zum 52. Tag) steigende Wachstum der *Enterobacteriaceae* und Pseudomonaden durch die entstehenden hohen Keimzahlen der Milchsäurebakterien ($>6 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$) gehemmt wurde. Außerdem wurde eine fortschreitende Anhäufung der biogenen Amine Kadaverin und Spermin festgestellt, deren Menge am 76. Tag 9,0 bzw. 25,0

ppm betrug. Ähnliche Ergebnisse hinsichtlich des Wachstums innerhalb der Fleischmikrobiota lieferte die Studie von PENNACCHIA et al. (2011). Sie wiesen bei vier von neun untersuchten vakuumverpackten Rindfleischproben unakzeptable Gerüche und sensorische Verderberscheinungen nach 20 Tagen Lagerung bei +4 °C nach. Die restlichen fünf Fleischproben waren nach 20 Tagen Lagerung sensorisch akzeptabel. Nach 20 Tagen Lagerung ließ sich eine Senkung der anfänglich steigenden Keimzahlen der *Enterobacteriaceae* und Pseudomonaden feststellen. Parallel stiegen die Keimzahlen der Milchsäurebakterien (PENNACCHIA et al., 2011).

RODAS-GONZÁLEZ et al. (2011) untersuchten vakuumverpacktes Rindfleisch, das von drei verschiedenen australischen Fleischzerlegebetrieben stammte. Sensorisch ließen sich nach 10 Wochen Lagerung bei +3 °C erste schwache Geruchsabweichungen bei den Proben der zwei Zerlegebetriebe feststellen. Bei den Proben des dritten Zerlegebetriebes wurden nach 10 Wochen Lagerung keine Geruchsabweichungen nachgewiesen. Aus ihren Ergebnissen schlossen sie, dass sich die unterschiedlichen Ausgangskeimbelastungen des Fleisches auf die späteren Keimzahlen und somit auch auf die Haltbarkeit des Fleisches auswirkten (RODAS-GONZÁLEZ et al., 2011).

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen dieser Studien aussagen, dass die Haltbarkeit von vakuumverpacktem Fleisch von verschiedenen extrinsischen (Temperatur, Sauerstoffdurchlässigkeit des Verpackungsmaterials, Hygienebedingungen bei der Schlachtung/Zerlegung und die damit verbundene Ausgangskeimbelastung) und intrinsischen Faktoren (pH-Wert und Fettgehalt des Fleisches, L-Lactat-Konzentration) abhängig ist.

2.3 Psychrophile Mikroorganismen

2.3.1 Begriffserklärung

Das griechische Wort „psychros“ (*ψυχρός*) bedeutet kühl oder kalt. Die Endung „-phil“ stammt vom griechischen Wort „philia“ (*φιλία*, Freundschaft). Das zusammengesetzte Wort „psychrophil“ bedeutet somit „kälteliebend“. Die Endung „-troph“, zu Griechisch *tréphein*, „nähren“ bedeutet „eine bestimmte Ernährungsweise bevorzugend, sich ernährend“.

Mit den Begriffen „psychrotroph“ und „psychrophil“ werden Mikroorganismen bezeichnet, die sich bei kühlen Temperaturen ernähren und vermehren können. Seit den Anfängen des

20. Jahrhunderts gab es diverse Vorschläge zur genauen Verwendung dieser Begriffe in Bezug auf Mikroorganismen. GOUNOT (1991) greift diese Thematik in einem Rückblick auf und fasst die verschiedenen Ansätze, die zur Begriffsverwendung der Worte psychrophil und psychrotroph gemacht wurden, zusammen. Die Re-Definition dieser Begriffe von MORITA (1975) fand die am weitesten verbreitete Akzeptanz (GOUNOT, 1991). Er definierte als Psychrophile diejenigen Mikroorganismen, für die die optimale Wachstumstemperatur bei $\leq +15\text{ °C}$ und die maximale Wachstumstemperatur bei $\leq +20\text{ °C}$ liegt. Als Psychrotrophe definierte er kältetolerante Mikroorganismen, die bis dahin als „fakultative Psychrophile“ bezeichnet wurden, und deren maximale Wachstumstemperatur bei $\geq +20\text{ °C}$ liegt (MORITA, 1975). DE LORENZO (2011) betont den Unterschied zwischen Temperaturtoleranz und Temperaturabhängigkeit von Mikroorganismen (Abbildung 6). Tolerant sind Mikroorganismen, wenn sie hohe bzw. niedrige Temperaturen als Stressfaktor überwinden können, um zu überleben. Von einem gewissen Temperaturbereich abhängig sind Mikroorganismen dagegen, um ihr optimales Wachstum zu erreichen (DE LORENZO, 2011).

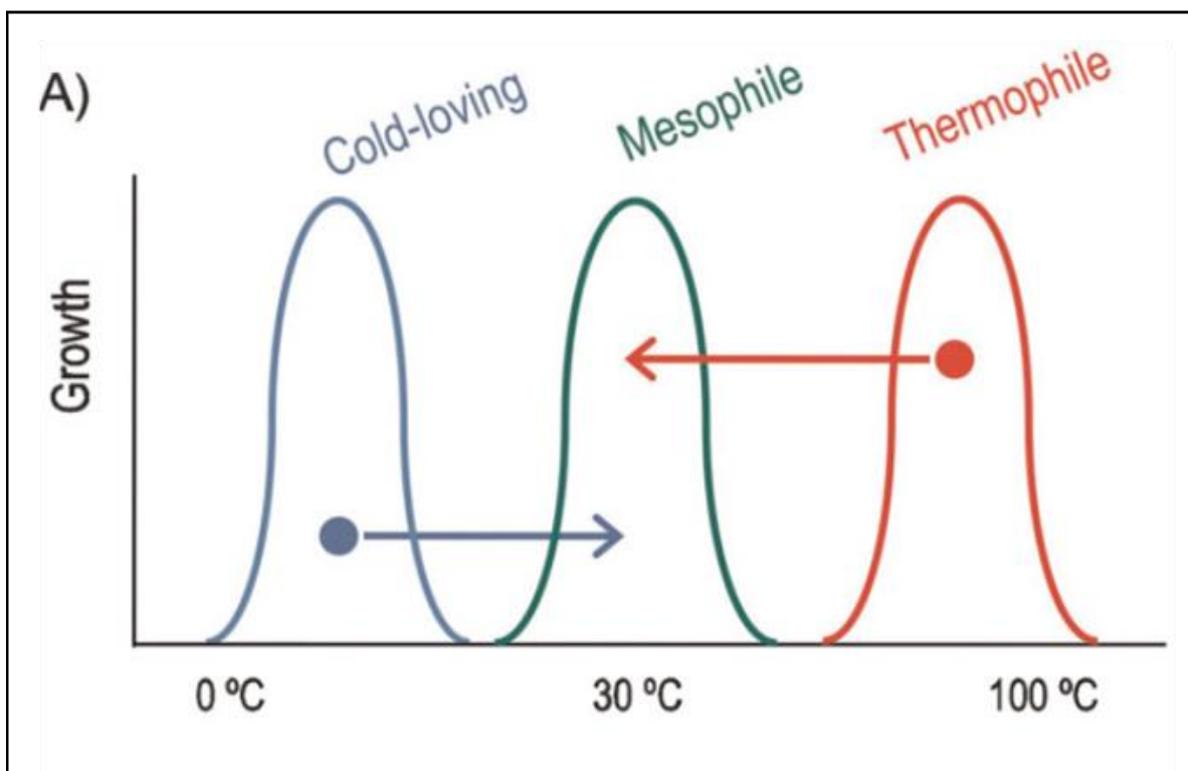


Abbildung 6: Klassifizierung von Mikroorganismen in Psychrophile, Mesophile und Thermophile nach DE LORENZO (2011)

Mesophile Mikroorganismen können sich während ihrer Vermehrungsphase an neue Temperaturbereiche adaptieren. Die Anpassung an höhere oder niedrigere Temperaturen im

Vergleich zu ihrem Optimum kann aufgrund des Austausches von Genen erfolgen, die für die Kodierung der Temperaturtoleranz zuständig sind (Abbildung 6). Tragen mesophile Bakterien Gene psychrophiler Bakterien im eigenen Genom, besitzen sie die Fähigkeit auch bei niedrigen Temperaturen zu wachsen. Im Gegenzug dazu entwickeln sie eine Empfindlichkeit gegenüber höheren Temperaturen. Der Transfer solcher Gene führt zu einer Verlagerung des Thermohaushaltes und ermöglicht die Verschiebung der Temperaturtoleranz eines Mikroorganismus (DE LORENZO, 2011).

2.3.2 Psychrophile und psychrotrophe Mikroorganismen auf Fleisch und Fleischerzeugnissen

Die Kühlung von Lebensmitteln hat das Ziel, das Wachstum der sich darauf befindenden Mikroorganismen zu hemmen und dadurch den Prozess des mikrobiellen Verderbs zeitlich hinauszuzögern. Sie gilt auch als effektive Methode, um die Vermehrung vieler Pathogener auf Lebensmitteln zu verhindern. Beim Verderb gekühlter Lebensmittel spielen daher psychrophile bzw. psychrotrophe Mikroorganismen eine wichtige Rolle.

Laut DOULGERAKI et al. (2012) gehören die am häufigsten auf gekühltem Fleisch vorkommenden Mikroorganismen zu den Gattungen *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Brochothrix* spp., *Flavobacterium* spp., *Psychrobacter* spp., *Moraxella* spp., *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., den Milchsäurebakterien und zu verschiedenen Gattungen der Familie *Enterobacteriaceae* (BLICKSTAD et al., 1981; BLICKSTAD und MOLIN, 1983; DAINTY et al., 1983; DAINTY und MACKEY, 1992).

Die meisten Verderbserreger sind psychrotroph, d.h. sie vermehren sich sowohl bei mittleren als auch bei Kühltemperaturen. Dazu gehören viele Arten der Familie *Pseudomonadaceae*, die Anteil an der Verderbsmikrobiota von eiweißreichen Lebensmitteln wie Frischfleisch, Fisch, Eiern und Milch, haben (FEHLHABER, 2004). Psychrotrophe Stämme finden sich außerdem unter den *Aeromonas* spp., *Lactobacillus* spp., *Acinetobacter* spp. und vereinzelt in einigen Gattungen der *Enterobacteriaceae* (FEHLHABER, 2004).

Die Familie der *Enterobacteriaceae* wird von verschiedenen Gattungen, z.B. *Enterobacter* spp., *Hafnia* spp., *Klebsiella* spp., *Rahnella* spp. und *Serratia* spp., die oft aus gekühltem, frischem Fleisch isoliert wurden, vertreten (FEHLHABER, 2004; PENNACCHIA et al., 2011; DOULGERAKI et al., 2012). Das Vorkommen von *Pseudomonas* spp. ist, genauso wie das von verschiedenen Milchsäurebakterien und *Br. thermosphacta*, ebenfalls üblich

(RATTANASOMBOON et al., 1999; BLIXT und BORCH, 2002; ERCOLINI et al., 2006; RUSSO et al., 2006; ARGYRI et al., 2011; PENNACCHIA et al., 2011). Bezüglich der Milchsäurebakterien sind die Gattungen *Carnobacterium* spp. (z.B. *Cb. divergens*, *Cb. maltaromaticum*) (LEISNER et al., 2007; PENNACCHIA et al., 2011), *Lactobacillus* spp. (z.B. *Lb. curvatus*, *Lb. sakei*, *Lb. fuchuensis*) (SAKALA et al., 2002b; SAKALA et al., 2002a; NIEMINEN et al., 2011) und *Leuconostoc* spp. (z.B. *Ln. mesenteroides*) zu nennen (BORCH und MOLIN, 1988; RUSSO et al., 2006; DOULGERAKI et al., 2010). Unter den *Pseudomonas* spp. sind *P. fragi*, *P. putida* und *P. lundensis* zu erwähnen (STANBRIDGE und DAVIES, 1998; LABADIE, 1999; ERCOLINI et al., 2007; ERCOLINI et al., 2010b).

Aus vakuumverpacktem, gekühltem Fleisch wurden häufig Spezies der Gattung *Clostridium*, u.a. *Cl. algidicarnis*, *Cl. gasigenes* und *Cl. estertheticum*, isoliert (BRODA et al., 1996b; BRODA et al., 2000; BRODA et al., 2003; ZIEGLER et al., 2008; SILVA et al., 2011; PICHNER et al., 2012).

Beim aeroben und/oder anaeroben Verderb von gekühltem Fleisch spielen die genannten psychrotrophen bzw. psychrophilen Mikroorganismen eine entscheidende Rolle (siehe 2.2.2.1 und 2.2.2.2).

2.3.3 Psychrophile Hefen auf Fleisch und Fleischerzeugnissen

Hefen kommen auf Lebensmitteln pflanzlichen als auch tierischen Ursprungs vor. In der Literatur finden sich zahlreiche Studien, die belegen, dass die Hefepopulation einen Teil der Mikrobiota von Fleisch (frisches Rind- und Geflügelfleisch, Rinderhackfleisch) ausmacht (Tabelle 6) (AYRES, 1960; JAY und MARGITIC, 1981; DIRIYE et al., 1993; GUERZONI et al., 1993; VILJOEN et al., 1998).

Auf frisch geschlachtetem Rind-, Lamm-, Schweine- und Geflügelfleisch sind die Hefekeimzahlen relativ gering (10^1 - 10^3 KbE/g) und repräsentieren ca. 5-10 % der totalen Fleischmikrobiota (FLEET, 2011). Die aus frischem Fleisch am häufigsten isolierten Spezies gehören zu den Gattungen *Candida* (*C.*) spp., *Rhodotorula* (*Rh.*) spp., *Cryptococcus* (*Cr.*) spp. und *Debaryomyces* (*D.*) spp. Höhere Hefekeimzahlen finden sich in Hackfleisch (10^3 - 10^7 KbE/g), doch auch in diesem Fall verbleibt die Hefepopulation im Vergleich zur Bakterienpopulation eher niedrig (FLEET, 2011).

Das Vorkommen von Hefen auf diversen Fleischerzeugnissen, unter anderem fermentierten oder trockengepökelten Würsten und Salami, ist in der Literatur ebenfalls beschrieben und zeigt, dass Hefen die jeweiligen Produktionsstadien überwinden können und eine gewisse Resistenz gegen externe Einwirkungen, z.B. erhöhte Temperatur, erhöhten Salzgehalt oder Wasserentzug, besitzen (Tabelle 6) (SAMELIS et al., 1994; OSEI ABUNYEWA et al., 2000; WOLTER et al., 2000; GARDINI et al., 2001; COCOLIN et al., 2006; QUIRÓS et al., 2008; ASEFA et al., 2009; THANH et al., 2012; PURRINOS et al., 2013).

In einem Versuch behandelten JOHANNSEN et al. (1984) Rinderhackfleisch mit Gammastrahlung und bestimmten die Mikrobiota des Fleisches sowohl unmittelbar vor als auch nach der Bestrahlung sowie an unterschiedlichen Tagen nach Lagerung des bestrahlten Fleisches bei +4 °C. Vor der Bestrahlung des Fleisches herrschte eine Misch-Mikrobiota aus Bakterien und Hefen, wobei *Candida* spp. und *Cryptococcus* spp. mit jeweils wenigen Spezies die Repräsentanten der Hefen waren. *C. sake* war dabei die dominierende Hefespezies. Die Bestrahlung des Fleisches bewirkte zwar eine bemerkenswerte Reduktion der Bakterienpopulation, jedoch nicht der Hefepopulation. Im Gegenteil, durch die Inhibition des Bakterienwachstums konnte sich eine größere Vielfalt an Hefespezies entfalten bzw. wiederherstellen. Die Hefemikrobiota nach Lagerung des Fleisches bei +4 °C beinhaltete die Spezies *C. famata*, *C. parapsilosis*, *C. sake*, *C. zeylanoides*, *Cr. albidus* var. *albidus*, *Cr. infirmo-miniatus*, *Cr. laurentii* var. *laurentii*, *Trichosporon* (*Tr.*) *cutaneum*, *Tr. pullulans*, *Rh. minuta* var. *texensis* und *Rh. mucilaginoso* (ehemals *Rh. rubra*).

Es ist bekannt, dass Hefen auch bei niedrigen Temperaturen wachsen können und somit auch für Lebensmittel, die im Kühlschrank gelagert werden, eine Relevanz haben (FEHLHABER, 2004). PEDERSON et al. (1959) untersuchten den Einfluss der Lagerungstemperatur auf das Hefewachstum in Traubensaft und stellten fest, dass nach vier Monaten Lagerung des Saftes bei +1 °C und +18 °C wesentlich höhere Hefekeimzahlen resultierten, als bei +37 °C. EKLUND et al. (1965) isolierten neun Hefespezies aus pazifischem Krabbenfleisch, die bei $\leq +5$ °C ein Wachstum zeigten. Diese Spezies wurden den Gattungen *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Torulopsis* spp. und *Trichosporon* spp. zugeordnet.

Die Auffassung, dass Bakterien auf gekühltem Fleisch viel schneller wachsen als Hefen und somit auch zum Verderb des Fleisches führen können (FLEET, 2011), ist allgemein verbreitet und erklärt, warum es bis dato nur wenige Untersuchungen zu psychrophilen Hefen auf

Fleisch und Fleischerzeugnissen gibt. Psychrophile Hefen wurden bisher aus frischem Rinderhackfleisch (JOHANNSEN et al., 1984), Salami, Mortadella, Aufschnitt und anderen Fleischerzeugnissen (BANKS und BOARD, 1987), fermentierten Würsten (ENCINAS et al., 2000) und vakuumverpacktem Rindfleisch isoliert (KABISCH et al., 2010; ERL-HÖNING, 2014).

Allerdings gibt es schon seit Anfang der 1980er Jahre Indizien dafür, dass psychrophile Hefen durchaus dazu in der Lage sind, sich zur dominierenden Population der Mikrobiota zu entwickeln, wenn das Bakterienwachstum gehemmt wird (VANDERZANT et al., 1983; JOHANNSEN et al., 1984; VISSER et al., 1988; FLEET, 1992; OSEI ABUNYEWA et al., 2000; SAMELIS und SOFOS, 2003; NIELSEN et al., 2008). Wie bereits erwähnt ist die Vakuumverpackung von Rind- und Lammfleisch seit den 1970er Jahren weit verbreitet und bietet zahlreiche Vorteile für den Vertrieb und die Reifung des Fleisches. Da sich die Mikrobiota von Fleisch unter anaeroben Bedingungen ändert und allmählich Milchsäurebakterien dominieren (SHAW und HARDING, 1984; BORCH und MOLIN, 1988), die zusätzlich antimikrobielle Stoffe produzieren (RACCACH und BAKER, 1978; DUBOIS et al., 1979; AHN und STILES, 1990), stellt sich die Frage, inwiefern psychrophile Hefen davon beeinflusst werden. Laut FLEET (1992) sollte der Effekt der Verpackung näher untersucht werden, obwohl es Anzeichen dafür gibt, dass die Vakuumverpackung das Hefewachstum nicht begünstigt und die CO₂- Verpackung es sogar verhindert.

LOWRY und GILL (1984) entdeckten hingegen, dass die anfänglich sehr kleine Hefepopulation von 10 Organismen/cm² auf vakuumverpacktem Lammfleisch nach 20 Wochen Lagerung bei -5 °C erheblich anstieg (10⁶ KbE/cm²).

ERL-HÖNING (2014) und KABISCH et al. (2010, 2013) untersuchten in diesem Zusammenhang die psychrophile Hefemikrobiota auf vakuumverpacktem Rindfleisch aus Neuseeland und Deutschland und isolierten, neben Hefearten der Gattungen *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. und *Debaryomyces* spp. erstmalig Arten der Gattungen *Mrakia* (*M.*) spp. Außerdem isolierten sie fünf Stämme einer bis dahin nicht beschriebenen Spezies der Gattung *Kazachstania* (*K.*), die sie als *Kazachstania psychrophila* neu beschrieben (KABISCH et al., 2013; ERL-HÖNING, 2014). Diese Spezies wurde in ihren Untersuchungen mit Verderb assoziiert (ERL-HÖNING, 2014). Der Nachweis von *Mrakia* spp. auf gekühltem, vakuumverpacktem Rindfleisch ist plausibel, da sich diese Gattung an kalte Habitate adaptiert hat (KABISCH et al., 2010). *Mrakia* spp. waren aus Umweltproben sehr kalter Gebiete der Erde bereits bekannt und wurden aus Permafrostboden in Alaska (PANIKOV und

SIZOVA, 2007) und Russland (BAB'EVA et al., 2002), aus Gletscherschmelzwasser in Argentinien (DE GARCÍA et al., 2007) und aus alpinen Gletschern in Italien (TURCHETTI et al., 2008) isoliert. In Tabelle 6 sind die wichtigsten aus Fleisch und Fleischerzeugnissen isolierten Hefe-Gattungen zusammengefasst.

Tabelle 6: Überblick über isolierte Hefen aus Fleisch und Fleischerzeugnissen

Fleisch bzw. Fleischerzeugnisse (Verpackungsart)	Gattung	Art	Bebrütungstemperatur und Inkubationszeit (d)	Nährmedium und Antibiotikum	Quelle
Rindfleisch, gekühlt (in MSAD-Verbundfolie oder FM-1 Pliofilm)	<i>Candida</i> spp. <i>Rhodotorula</i> spp. <i>Torulopsis</i> spp.	<i>Candida</i> spp. ¹ <i>Rhodotorula</i> spp. ¹ <i>Torulopsis</i> spp. ¹	n.a.	n.a.	AYRES (1960)
Rinderhack, frisch (n.a.)	Hefen ¹	Hefen ¹	+30 °C/3 d	Plate-Count-Agar, mit Chloramphenicol und Chlortetrazyklin oder Streptomycin	JAY und MARGITIC (1981)
Rinderhack, frisch (n.a.)	<i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Rhodotorula</i> spp. <i>Torulopsis</i> spp. <i>Trichosporum</i> spp.	<i>C. lipolytica</i> ² , <i>C. lambica</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>C. iberica</i> , <i>C. insectamans</i> , <i>C. staetolytica</i> , <i>C. silvicutrix</i> , <i>C. glaebosa</i> <i>Cr. curvatus</i> , <i>Cr. laurentii</i> <i>Rh. marina</i> , <i>Rh. glutinis</i> <i>Rh. mucilaginosa</i> <i>T. silvatica</i> , <i>T. candida</i> <i>Tr. cutaneum</i> , <i>Tr. pullulans</i>	+30 °C/3 d	Plate-Count-Agar, mit Chloramphenicol und Chlortetrazyklin oder Streptomycin	HSIEH und JAY (1984)

a=Schweine-, Lamm-, Bacon-, Rind- und Putenburger, die Sulfite enthielten

d=Tage

¹=nicht näher definiert²=Anamorphe Form von *Y. lipolytica*

n.a.=nicht angegeben

C.=*Candida*Cr.=*Cryptococcus*Rh.=*Rhodotorula*T.=*Torulopsis*Tr.=*Trichosporon*Y=*Yarrowia*

Fortsetzung Tabelle 6: Überblick über isolierte Hefen aus Fleisch und Fleischerzeugnissen

Fleisch bzw. Fleischerzeugnisse (Verpackungsart)	Gattung	Art	Bebrütungstemperatur und Inkubationszeit (d)	Nährmedium und Antibiotikum	Quelle
Rinderhack, verdorben (n.a.)	<i>Candida</i> spp. <i>Torulopsis</i> sp.	<i>C. lipolytica</i> ² , <i>C. zeylanoides</i> , <i>C. iberica</i> , <i>C. staetolytica</i> , <i>C. diversa</i> , <i>C. diddensii</i> , <i>C. blankii</i> , <i>C. bufforii</i> , <i>C. intermedia</i> <i>T. versatilis</i>	+30 °C/3 d	Plate-Count-Agar, mit Chloramphenicol und Chlortetrazyklin oder Streptomycin	HSIEH und JAY (1984)
Rinderhack, unbestrahlt (vakuumverpackt)	<i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> sp.	<i>C. sake</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>C. lipolytica</i> ² , <i>C. famata</i> , <i>C. parapsilosis</i> <i>Cr. laurentii</i> var. <i>laurentii</i>	+8 °C/4-7 d +5 °C/4-7 d	Hefeextrakt-Malzextraktagar mit Weinsäure, Dextrose-Hefeextraktagar mit Chloramphenicol und Gentamycin oder mit Chloramphenicol und Cycloserin	JOHANNSEN et al. (1984)
Rinderhack, bestrahlt (vakuumverpackt)	<i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Trichosporon</i> spp.	<i>C. sake</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>C. famata</i> , <i>C. parapsilosis</i> <i>Cr. laurentii</i> var. <i>laurentii</i> , <i>Cr. albidus</i> var. <i>albidus</i> <i>Tr. pullulans</i>			
Rindfleisch (vakuumverpackt)	<i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Debaryomyces</i> sp. <i>Mrakia</i> sp.	<i>C. sake</i> , <i>C. zeylanoides</i> <i>Cr. curvatus</i> , <i>Cr. laurentii</i> <i>D. hansenii</i> <i>M. frigida</i>	+25 °C/3 d +4 °C/7 d	Malz Extrakt-Agar	KABISCH et al. (2010)
Rindfleisch, (vakuumverpackt)	<i>Kazachstania</i> sp.	<i>K. psychrophila</i>	+4 °C/7 d +10 °C/7 d	Hefe-Glukose-Agar mit Chloramphenicol und Bromophenolblau; Malz Extrakt-Agar mit Novobiocin	KABISCH et al. (2013)
d= Tage 2=Anamorphe Form von <i>Y. lipolytica</i> <i>C.= Candida</i> <i>Cr.=Cryptococcus</i> <i>D.=Debaryomyces</i>		<i>K.=Kazachstania</i> <i>M.=Mrakia</i> <i>T.=Torulopsis</i> <i>Tr.=Trichosporon</i> <i>Y.=Yarrowia</i>			

Fortsetzung Tabelle 6: Überblick über isolierte Hefen aus Fleisch und Fleischerzeugnissen

Fleisch bzw. Fleischerzeugnisse (Verpackungsart)	Gattung	Art	Bebrütungstemperatur und Inkubationszeit (d)	Nährmedium und Antibiotikum	Quelle
Hühnchenfleisch, ganze Hühnchen (in Plastikfolie verpackt)	<i>Candida</i> spp. <i>Rhodotorula</i> spp. <i>Trichosporon</i> spp. <i>Yarrowia</i> spp.	<i>C. zeylanoides</i> <i>Rh. mucilaginosa</i> <i>Tr. cutaneum</i> <i>Y. lipolytica</i>	+25 °C/7-10 d	Difco-Malzagar	DIRIYE et al. (1993)
Hühnchenfleisch, frisch (verpackt in Polyethylen-Beutel)	<i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Debaryomyces</i> spp. <i>Rhodotorula</i> spp. <i>Saccharomyces</i> sp. <i>Yarrowia</i> sp.	<i>C. blankii</i> , <i>C. catenulata</i> , <i>C. intermedia</i> , <i>C. curvata</i> , <i>C. saitoana</i> , <i>C. sake</i> <i>C. valdiviana</i> , <i>C. zeylanoides</i> <i>Cr. albidus</i> , <i>Cr. curvatus</i> , <i>Cr. laurentii</i> <i>D. hansenii</i> , <i>D. vanrijiae</i> <i>Rh. glutinis</i> , <i>Rh. mucilaginosa</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>Y. lipolytica</i>	+25 °C/3 d	Potato-Dextrose-Agar mit Weinsäure	VILJOEN et al. (1998)
Hühnchenfleisch, verdorben (verpackt in Polyethylen-Beutel)	<i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Debaryomyces</i> spp. <i>Trichosporon</i> spp. <i>Yarrowia</i> sp.	<i>C. catenulata</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. saitoana</i> , <i>C. zeylanoides</i> <i>Cr. albidus</i> , <i>Cr. curvatus</i> <i>D. hansenii</i> , <i>D. vanrijiae</i> <i>Tr. beigellii</i> , <i>Tr. cutaneum</i> <i>Y. lipolytica</i>	+25 °C/3 d	Potato-Dextrose-Agar mit Weinsäure	
d=Tag <i>C. =Candida</i> <i>Cr.=Cryptococcus</i> <i>D.=Debaryomyces</i>		<i>Pi.=Pichia</i> <i>Rh.=Rhodotorula</i> <i>S.=Saccharomyces</i> <i>Tr.= Trichosporon</i> <i>Y.=Yarrowia</i>			

FFortsetzung Tabelle 6: Überblick über isolierte Hefen aus Fleisch und Fleischerzeugnissen

Fleisch bzw. Fleischerzeugnisse (Verpackungsart)	Gattung	Art	Bebrütungs- und Inkubationszeit (d)	Nährmedium und Antibiotikum	Quelle
Fleisch ¹					
(verpackt unter normalen atmosphärischen Bedingungen)	<i>Debaryomyces</i> sp. <i>Pichia</i> sp. <i>Yarrowia</i> sp.	<i>D. hansenii</i> <i>P. membranaefaciens</i> <i>Y. lipolytica</i>	+25 °C/14 d	Sabouraud-Agar	GUERZONI et al. (1993)
Rinderhack, Hühner- und Putenfleisch, Hühnchen- und Putenaufschnitt, ital. Salami und Mortadella, Frühstücksfleisch, Burger ² , Fresh British sausage (n.a., teilweise vakuumverpackt)	<i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> sp. <i>Debaryomyces</i> sp. <i>Rhodotorula</i> sp.	<i>C. zeylanoides</i> , <i>C. lipolytica</i> ² , <i>C. humicola</i> , <i>C. rugosa</i> <i>Cr. laurentii</i> <i>D. hansenii</i> <i>Rh. glutinis</i>	+25 °C/7 d +5 °C/14 d	Rose-Bengal- Chloramphenicol- Agar, Oxytetrazyklin- Glukose- Hefeextraktagar mit oder ohne Gentamycin, Plate- Count-Agar mit Zitronensäure; Malzextraktagar mit Weinsäure	BANKS und BOARD (1987)
Salami (getrocknet und fermentiert, griechisch)	<i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Pichia</i> spp. <i>Torulopsis</i> spp. <i>Trichosporon</i> spp.	<i>Candida</i> spp. ¹ <i>Cryptococcus</i> spp. ¹ <i>Pichia</i> spp. ¹ <i>Torulopsis</i> spp. ¹ <i>Trichosporon</i> spp. ¹	+25 °C/5 d	Potato -Dextrose- Agar mit Chloramphenicol	SAMELIS et al. (1994)
<p>a=Schweine-, Lamm-, Bacon-, Rind- und Putenburger, die Sulfit enthielten ¹= nicht näher definiert ²= Anamorphe Form von d= Tage C.=<i>Candida</i></p> <p>Cr.=<i>Cryptococcus</i> Pi.=<i>Pichia</i> Rh.=<i>Rhodotorula</i> T.=<i>Torulopsis</i> Tr.=<i>Trichosporon</i> Y.=<i>Yarrowia</i></p>					

Fortsetzung Tabelle 6: Überblick über isolierte Hefen aus Fleisch und Fleischerzeugnissen

Fleisch bzw. Fleischerzeugnisse	Gattung	Art	Bebrütungstemperatur und Inkubationszeit (d)	Nährmedium und Antibiotikum	Quelle
	<i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Debaryomyces</i> spp. <i>Galactomyces</i> sp. <i>Lipomyces</i> sp. <i>Pichia</i> spp. <i>Rhodotorula</i> spp. <i>Sporobolomyces</i> sp. <i>Torulaspota</i> sp. <i>Trichosporon</i> sp. <i>Yarrowia</i> sp.	<i>C. gropengiesseri</i> , <i>C. haemulonii</i> , <i>C. vinaria</i> , <i>C. zeylanoides</i> <i>Cr. albidus</i> , <i>Cr. hungaricus</i> , <i>Cr. laurentii</i> <i>D. hansenii</i> , <i>D. occidentalis</i> , <i>D. vanriijae</i> , <i>D. polymorphus</i> <i>G. geotrichum</i> <i>L. tetrasporus</i> <i>Pi. farinose</i> , <i>Pi. philogaea</i> <i>Rh. minuta</i> , <i>Rh. mucilaginoso</i> <i>Sp. roseus</i> <i>T'spora. deibrueckii</i> <i>Tr. beigellii</i> <i>Y. lipolytica</i>	+25 °C/4 d	Hefeextrakt-Glukose-Chloramphenicol-Agar	OSEI ABUNYEWA et al. (2000)
Salami (kommerziell)					
	<i>Candida</i> sp. <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Debaryomyces</i> spp. <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Saccharomyces</i> sp. <i>Sporobolomyces</i> sp. <i>Torulaspota</i> sp. <i>Trichosporon</i> sp. <i>Yarrowia</i> sp.	<i>C. zeylanoides</i> <i>Cr. hungaricus</i> , <i>Cr. laurentii</i> <i>D. hansenii</i> , <i>D. vanriijii</i> <i>Rh. mucilaginoso</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>Sp. roseus</i> <i>T'spora delbrueckii</i> <i>Tr. beigellii</i> <i>Y. lipolytica</i>	+25 °C/5 d, Aufbewahrung bei +4 °C	Hefe-Glukose-Chloramphenicol-Agar	WOLTER et al. (2000)
Salami, Biltong, Cabanossi, Rohwurst					
	<i>Candida</i> spp. <i>Citeromyces</i> sp. <i>Debaryomyces</i> sp. <i>Trichosporon</i> sp. <i>Yarrowia</i> sp.	<i>C. intermedia/curvata</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. zeylanoides</i> <i>C'omyces. matritensis</i> <i>D. hansenii</i> <i>Tr. ovooides</i> <i>Y. lipolytica</i>	+25 °C-5-7 d	Oxytetrazyklin-Glukose-Hefeextrakt-Agar	ENCINAS et al. (2000)
Würstchen, (fermentiert, spanisch)					
d=Tage <i>C. = Candida</i> <i>C'omyces=Citeromyces</i>	<i>Cr. : Cryptococcus</i> <i>D. = Debaryomyces</i> <i>G. = Galactomyces</i>	<i>L. = Lipomyces</i> <i>Pi. = Pichia</i> <i>Rh. = Rhodotorula</i> <i>S. = Saccharomyces</i> <i>Sp. = Sporobolomyces</i> <i>T. = Torulopsis</i>			<i>T'spora = Torulaspora</i> <i>Tr. = Trichosporon</i> <i>Y. = Yarrowia</i>

Fortsetzung Tabelle 6: Überblick über isolierte Hefen aus Fleisch und Fleischerzeugnissen

Fleisch bzw. Fleischerzeugnisse	Gattung	Art	Bebrütungstemperatur und Inkubationszeit (d)	Nährmedium und Antibiotikum	Quelle
Wurst, (fermentiert, italienisch)	<i>Candida</i> sp. <i>Debaryomyces</i> sp. <i>Metschnikova</i> sp. <i>Pichia</i> sp.	<i>C. zeylanoides</i> <i>D. hansenii</i> <i>Me. pulcherrima</i> <i>Pi. triangularis</i>	+25 °C/3-5 d	Malz-Extrakt-Agar mit Tetrazyklin; WLN-Agar (Oxoid) mit Tetrazyklin	COCOLIN et al. (2006)
Wurst (Chorizo, fermentiert spanisch,)	<i>Candida</i> sp. <i>Debaryomyces</i> sp.	<i>C. cretensis</i> <i>D. hansenii</i>	n.a.	YMAC-Agar mit Glukose, Proteose, Pepton, Hefeextrakt, Malzextrakt und Chloramphenicol	QUIRÓS et al. (2008)
Wurst („Salsiccia sotto sugna“, traditionell süd-italienisch)	<i>Candida</i> spp. <i>Debaryomyces</i> sp. <i>Rhodotorula</i> spp. <i>Saccharomyces</i> sp. <i>Yarrowia</i> sp.	<i>C. boidinii</i> , <i>C. cariosilignicola</i> , <i>C. citrea</i> , <i>C. diversa</i> , <i>C. domercqiae</i> , <i>C. edax</i> , <i>C. famata</i> , <i>C. hellenica</i> , <i>C. maltose</i> , <i>C. pintolopesii</i> , <i>C. silvanorum</i> , <i>C. sphaerica</i> , <i>C. valvidiana</i> , <i>Rh. mucilaginosa</i> , <i>Rh. glutinis</i> <i>D. hansenii</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>Y. lipolytica</i>	+25 °C/5 d	Potato-Dextrose-Agar mit Chloramphenicol	GARDINI et al. (2001)
Wurst („Fenalar“, trockengepökelt, nicht geräuchert, norwegisch)	<i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> sp. <i>Debaryomyces</i> sp. <i>Rhodospiridium</i> sp. <i>Rhodotorula</i> spp. <i>Yarrowia</i> sp.	<i>C. zeylanoides</i> , <i>C. norwegica</i> , <i>C. sake</i> <i>Cr. victorae</i> <i>D. hansenii</i> <i>R. kratochvilovae</i> <i>Rh. slooffiae</i> , <i>Rh. glutinis</i> <i>Y. lipolytica</i>	+25±1 °C/3-5 d	Dichloran-18 %-Glyzerol-Agar	ASEFA et al. (2009)
d=Tag l=nicht näher definiert n.a.=nicht angegeben C.= <i>Candida</i> Cr.= <i>Cryptococcus</i> D.= <i>Debaryomyces</i>		<i>Me.=Metschnikova</i> <i>Pi.=Pichia</i> <i>R.=Rhodosporidium</i> <i>Rh.=Rhodotorula</i> <i>Y.=Yarrowia</i>			

Fortsetzung Tabelle 6: Überblick über isolierte Hefen aus Fleisch und Fleischerzeugnissen

Fleisch bzw. Fleischerzeugnisse	Gattung	Art	Bebrütungstemperatur und Inkubationszeit (d)	Nährmedium und Antibiotikum	Quelle
Fleischerzeugnis („nem chua“, fermentiert, traditionell vietnamesisch)	<i>Candida</i> spp. <i>Debaryomyces</i> sp. <i>Meyerozyma (Pichia)</i> sp. <i>Moniliella</i> spp. <i>Torulaspota</i> sp.	<i>C. sake</i> , <i>C. haemulonii</i> <i>D. hansenii</i> <i>M'zyma guilliermondii</i> <i>Mo. carnis</i> , <i>Mo. dehoogii</i> <i>T'spora delbrueckii</i>	n.a.	Malzextrakt-Glukose-Agar mit Chloramphenicol	THANH et al. (2012)
Fleischerzeugnis („laçon“, trocken gepökelt, traditionell spanisch)	<i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> sp. <i>Debaryomyces</i> sp. <i>Rhodotorula</i> spp.	<i>C. zeylanoides</i> , <i>C. deformans</i> <i>Cr. curvatus</i> <i>D. hansenii</i> <i>Rh. glutinis</i> , <i>Rh. mucilaginosa</i>	+25 °C/4-5 d	Oxytetracyclin-Glukose-Hefeextrakt-Agar mit Oxytetracyclin	PURRINOS et al. (2013)
d: Tage n.a.: nicht angegeben C.= <i>Candida</i> Cr.= <i>Cryptococcus</i> D.= <i>Debaryomyces</i>		<i>Mo.</i> = <i>Moniliella</i> <i>M'zyma</i> = <i>Meyerozyma</i> <i>Rh.</i> = <i>Rhodotorula</i> <i>T'spora</i> = <i>Torulaspota</i> <i>Y.</i> = <i>Yarrowia</i>			

2.3.3.1 Verderbspotential lebensmittelassoziierter Hefen

Seit Jahrtausenden erweisen sich Hefen als nützliche Mikroorganismen für den Menschen. Sie werden in vielen verschiedenen Bereichen der modernen Biotechnologie eingesetzt. Gerade für die wissenschaftlichen, lebensmittelassozierten, landwirtschaftlichen und medizinischen Gebiete der industriellen Biotechnologie sind sie von grundlegender Bedeutung. In der industriellen Lebensmittelbiotechnologie werden Hefen für die Fermentation von Bier, Cidre, Wein, Brot, Backwaren, Käse, Würsten und anderen fermentierten Lebensmitteln genutzt (WALKER, 1998; JOHNSON und ECHAVARRI-ERASUN, 2011).

Jedoch können Hefen auch unerwünschte Veränderungen von Lebensmitteln und Getränken hervorrufen, wobei nur ein Teil der zahlreichen lebensmittelassozierten Hefen dazu in der Lage ist, Verderb zu verursachen (STRATFORD, 2006). Von den derzeit ungefähr 1.500 bekannten Hefespezies werden ca. 100 bis 150 Spezies gewöhnlich aus Lebensmitteln isoliert. Lediglich 10 bis 15 % dieser lebensmittelassozierten Hefen werden regelmäßig mit Verderbsausbrüchen in Verbindung gebracht (Tabelle 8) (FLEET, 2011). Hefen verwerten die im Lebensmittel enthaltenen Nährstoffe und metabolisieren sie zu verschiedenen Stoffwechselprodukten, wodurch sie die chemischen, physiologischen und sensorischen Eigenschaften eines Lebensmittels verändern (FLEET, 2011). STRATFORD (2006) definiert den durch Hefen bedingten Verderb als „das Hefewachstum in einem Lebensmittel, das stark genug ist eine für den Verbraucher deutlich wahrnehmbare Veränderung des Lebensmittels hervorzurufen. Diese Veränderung des Lebensmittels zieht eine Verbraucherunzufriedenheit mit sich, die schließlich zu einer Beschwerde oder Ablehnung des Lebensmittels durch den Verbraucher führt“. Veränderungen der sensorischen Eigenschaften von Lebensmitteln können ab einem Hefewachstum von 10^4 - 10^5 KbE/g erscheinen, und werden meistens deutlicher bei Populationen von 10^7 - 10^8 KbE/g (FLEET, 2011).

Wie sich dieser Verderb äußert und ob er offensichtlich ist, hängt von der Art des Lebensmittels sowie der Hefespezies ab (TUDOR und BOARD, 1993; STRATFORD, 2006). In Konserven, Dosen, Getränkekartons und Glasflaschen kann die Kohlenstoffdioxidproduktion durch Hefen einen internen Druck von 5 bis 10 Atmosphären verursachen, sodass sich diese Verpackungen aufblähen, explodieren (STRATFORD, 2006; FLEET, 2011) und dadurch sogar zu Verletzungen führen können (GRINBAUM et al., 1994). Beschrieben sind außerdem aufgeblähte Salatverpackungen sowie pralle Joghurt- und Quarkbecher (FLEET, 1992).

Primär vom Verderb durch Hefen betroffen sind Lebensmittel, die einen niedrigen pH-Wert, oder eine niedrige Wasseraktivität (a_w), bedingt durch eine hohe Zucker- oder Salzkonzentration, aufweisen, antibakterielle Substanzen enthalten oder gekühlt werden (STRATFORD, 2006).

Hefen können ihre Nährstoffe sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen verwerten. Ungefähr die Hälfte aller Hefespezies ist dazu in der Lage, Zucker zu fermentieren, d.h. sie anaerob zu verstoffwechseln. Diese Hefen sind fakultativ anaerob (DEÁK, 2008). Die Stoffwechselvorgänge, die zum Verderb durch Hefen führen sind der Energiestoffwechsel, der Metabolismus von Stickstoff und Schwefel, der Abbau von Polysacchariden und Fetten sowie die Autolyse der Hefezellen (Tabelle 7) (DEÁK, 2008; FLEET, 2011).

Hefen, die auf den Oberflächen fester Lebensmittel wachsen, sind entweder als Einzelkolonien sichtbar oder sie bilden einen trüben, trockenen oder schleimigen Biomassefilm (FLEET, 2011). Optisch fallen weiße und hellfarbige Hefe-Kolonien auf der Oberfläche dunkler Lebensmittel optisch auf, jedoch bleiben sie auf der Oberfläche von hellen Lebensmitteln, wie z. B. Naturjoghurt, oft unbemerkt. Im Gegensatz dazu sind pinke und rote Hefe-Kolonien auf festen Lebensmitteln fast unübersehbar (STRATFORD, 2006). Bei flüssigen Produkten können sich Hefen sowohl an der Oberfläche als auch im Produkt befinden. Als Biomassefilm treiben sie an der Oberfläche oder bedecken diese. Befinden sie sich im flüssigen Produkt, bilden sie Sedimente, Flocken oder eine nebelartige Trübung (FLEET, 2011). Die Wahrnehmung der geschmacklichen und geruchlichen Veränderungen eines Lebensmittels, die durch Hefe-Verderb hervorgerufen werden, hängt einerseits von den sensorischen Fähigkeiten des Konsumenten ab. Andererseits muss der Konsument die sensorischen Eigenschaften des jeweiligen Lebensmittels im unveränderten Zustand kennen, um geschmackliche und geruchliche Abweichungen von den speziellen sensorischen Eigenschaften des Lebensmittels zu unterscheiden (STRATFORD, 2006).

Die geschmacklichen und geruchlichen Veränderungen eines Lebensmittels sind beim hefebedingten Verderb auf die Produktion kleiner, aber sensorisch aktiver Moleküle des Primär- oder Sekundärmetabolismus der Hefen zurückzuführen. Hierzu zählen Ethanol, Kohlenstoffdioxid, organische Säuren und Ester, wie z. B. Essigsäure (Geruch nach Essig), Acetaldehyd (Geruch nach bitteren oder stechend riechenden Äpfeln), Ethylacetat (süßliche Note, Geruch nach Ananas), Diazetyl (Geruch nach Butter) und Acetoin (butterähnlicher

Geruch) (BERRY und WATSON, 1987; GRANCHI et al., 2002; DIAS et al., 2003; MARTORELL et al., 2006; STRATFORD, 2006; FLEET, 2011). Manche dieser Stoffe sind für die spezifischen Aromen und Geschmäcker fermentierter Lebensmittel und alkoholischer Getränke verantwortlich, so dass Verbraucher, die solche Lebensmittelprodukte bzw. Getränke konsumieren, Positives bei der Wahrnehmung dieser Stoffe assoziieren und den möglichen Verderb nicht bemerken (FLEET, 1992).

Tabelle 7: Verderbsverursachende Stoffwechselprozesse von Hefen und dadurch entstehende Verderbskomponenten (DEÁK, 2008)

Stoffwechselprozess	Verderbskomponenten
Energiestoffwechsel	
Fermentation	Ethanol, CO ₂ , flüchtige organoleptische Stoffe
Assimilation	Organische Säuren, Ester, Carbonyle
Stickstoffstoffwechsel	
Proteine	Produkte der Proteolyse
Aminosäuren	Höhere Alkohole, organische Säuren, Amine
Abbau von Polyssachariden	
Stärke	Verderb von Bier durch Vergärung
Pectin	Erweichung pflanzlichen Gewebes
Abbau von Fetten	
Hydrolyse von Triglyceriden	Freisetzung von freien Fettsäuren
Schwefel-Stoffwechsel	
Aminosäuren, SO ₂	H ₂ S, Dimethylsulfid
Autolyse	
Hefezelle	Fettsäuren, Thiamin (Hefe-Geruch)

CO₂=Kohlenstoffdioxid, H₂S=Schwefelwasserstoff, SO₂=Schwefeldioxid

Verderbsverursachende Hefespezies gehören zu unterschiedlichen Gattungen, haben unterschiedliche Eigenschaften und sind für den Verderb unterschiedlicher Lebensmittelgruppen verantwortlich (Tabelle 8). Zu ihnen zählen auch nützliche Hefespezies, wie z. B. *Saccharomyces (S.) cerevisiae*. Diese Hefe ist für ihre Schlüsselrolle bei der alkoholischen Fermentation von Bier und Wein bekannt (FLEET, 2011). Dieselbe Hefe kann das verpackte Endprodukt jedoch vergären und somit zu Verderbserscheinungen, wie Trübung und Gasbildung führen (FLEET, 2006; FLEET, 2008).

Tabelle 8: Übersicht über das Vorkommen und die Eigenschaften verderbsverursachender Hefen bei Lebensmitteln und Getränken (FLEET, 2011)

Hefe	Wichtige Eigenschaften
<i>Debaryomyces hansenii</i> (<i>Candida famata</i>) ^a	Stark halotolerant; oft isoliert aus gesalzenen Fleischprodukten, Käse und eingelegtem Gemüse, bei denen sie Oberflächen-Biofilme und Geschmacksabweichungen verursachen
<i>Dekkera/Brettanomyces</i> (z. B. <i>De. anomala</i> , <i>De. bruxellensis</i>)	Langsam wachsend, tolerant gegen Ethanol und CO ₂ , oft mit dem Verderb von alkoholischen und karbonisierten Getränken sowie der Weinkrankheit assoziiert; Trübungen, saurer und phenolischer Geschmack
<i>Hanseniaspora uvarum</i> (<i>Kloeckera apiculata</i>) ^a	stark säuretolerant; oft mit dem durch Fermentationsreaktionen hervorgerufenen Verderb von frischem und verarbeitetem Obst sowie Obstprodukten assoziiert
<i>Kazachstania exiguus</i> (<i>Candida holmii</i>) ^a	Mäßig tolerant gegen Konservierungsmittel, Essigsäure und Salz; Fermentativer Verderb von Fruchtsäften, karbonisierten Getränken, Mayonnaise, Salaten, Milch- und Fleischprodukten
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (<i>Candida kefir</i>) ^a	Fermentation von Laktose, proteolytisch, pectinolytisch, Wachstum bei +40-45 °C und Kühlschranktemperaturen, Verderb von Milchprodukten und pflanzlichen Lebensmitteln
<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Candida crusei</i>) ^a	Säuretolerant, resistent gegen Konservierungsmittel, verursacht bei Lebensmitteln mit niedrigem pH-Wert fermentativen Verderb und Oberflächen-Biofilme
<i>Pichia membranifaciens</i> (<i>Candida valida</i>) ^a	Oxidativ, Ethanol-tolerant, resistent gegen Konservierungsmittel, verursacht Oberflächen-Biofilme sowie Geruchs- und Geschmacksabweichungen vieler Lebensmittel
<i>Rhodotorula</i> spp.	Oxidativ, rote Kolonien, lipolytisch, proteolytisch, pectinolytisch, oft als Verderbserreger auf den Oberflächen von Milchprodukten, Fleisch, Obst, Gemüse und Backwaren
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fermentativer Verderb in verschiedenen Lebensmitteln, die Mono- und Disaccharide enthalten
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Tolerant gegen hohe Zucker- und Ethanolkonzentrationen, resistent gegen Konservierungsmittel, fermentativer Verderb von alkoholischen Getränken und Lebensmitteln mit hohem Zuckeranteil
<i>Wickerhamomyces</i> (<i>Pichia</i>) <i>anomalous</i> (<i>Candida pelliculosa</i>) ^a	Säuretolerant, halotolerant, produziert große Mengen Ethylacetat, verursacht Verderb von Milchprodukten, Obst und Backwaren
<i>Yarrowia lipolytica</i> (<i>Candida lipolytica</i>) ^a	Oxidativ, stark proteo- und lipolytisch, mäßig tolerant gegenüber niedrigem pH, hoher Salzkonzentration und Konservierungsmitteln; verursacht Geruchs- und Geschmacksabweichungen bei Fleisch- und Milchprodukten
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Resistent gegen Konservierungsmittel, Säure- und Ethanol-tolerant, fermentativer Verderb von Obst, Fruchtsäften, Sirup, Saucen und alkoholischen Getränken
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	Eigenschaften und fermentativer Verderb liegt ungefähr zwischen <i>Z. bailii</i> und <i>Z. rouxii</i>
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Tolerant gegenüber sehr hohen Zucker- und Salzkonzentrationen, resistent gegen Konservierungsmittel, fermentativer Verderb von Fruchtsaftkonzentraten, Zuckersirup, Honig, Marmelade, Konfiserie-Produkten und getrockneten Früchten

^a=Anamorphe Bezeichnung, °C=Grad Celcius, *De.*=*Dekkera*

Das Verderbspotential von Hefestämmen innerhalb einer Spezies kann stark variieren (FLEET, 2011). Beispielsweise stellt die Produktion von Schwefelwasserstoff durch Hefen eine besondere Verderbsreaktion dar, allerdings ist diese Produktion bei verschiedenen Stämmen innerhalb einer Hefespezies unterschiedlich stark ausgeprägt (MENDES-FERREIRA et al., 2002).

2.3.3.2 Überblick über die Pathogenität von Hefen

Im Folgenden werden die wichtigsten Krankheitsbilder beim Menschen, die allgemein durch Hefen hervorgerufen werden können, beschrieben. Die betroffenen Risikogruppen sind hierbei in der Regel Patienten mit Immunsuppression oder anderen systemischen Grunderkrankungen.

Die am weitesten verbreiteten pathogenen Hefespezies gehören zur Gattung *Candida*, namentlich *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* und *C. guilliermondii*, und sind als opportunistische Erreger von diversen Mykosen bekannt (Tabelle 9) (KAUFFMAN, 2006). *Candida* spp. können als opportunistisch pathogene Erreger eine geschwächte lokale oder systemische Immunabwehr der betroffenen Person ausnutzen und Krankheiten an diversen Stellen des Körpers hervorrufen. Aufgrund unterschiedlicher Faktoren wurden diese Infektionen, die mit dem Sammelbegriff „Candidiasis“ zusammengefasst werden, in den letzten Jahrzehnten immer häufiger (COOPER, 2011).

Die orale Krankheit „Soor“ (engl. *thrush*), die zur Candidiasis gehört, wurde zum ersten Mal im fünften Jahrhundert v. Chr. von Hippokrates beschrieben (AINSWORTH, 1986). Seitdem wurden der Hefe *C. albicans*, der primären Ursache der Candidiasis, zahlreiche andere Krankheitsformen zugesprochen. Die klinischen Erscheinungsbilder variieren und hängen von der Lokalisation ab. Zu den möglichen Erkrankungsbildern zählen Stomatitis, Vaginitis, Hautmykosen, Nagelbettentzündungen und Konjunktivitis (HAZEN, 1995) (Tabelle 9).

Des Weiteren werden verschiedene *Candida*-Spezies, wie *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, und andere Hefearten für nosokomiale Infektionen verantwortlich gemacht (Tabelle 9).

Die Pathogenität von *Cr. neoformans* ist seit Jahrzehnten bekannt (HAZEN, 1995) und zusammen mit *Cr. gatti* sind diese zwei Spezies die pathogenen der Gattung *Cryptococcus* (COOPER, 2011). Die Kryptokokkose zeigt verschiedene klinische Erscheinungsbilder (Tabelle 9) (CHAYAKULKEEREE und PERFECT, 2006). Andere Hefespezies wie *Blastoschizomyces*

capitatus, *Malassezia (Ma.) furfur*, *Tr. beigeli* und werden ebenfalls als pathogen eingestuft, da sie für diverse Infektionen verantwortlich sein können (Tabelle 9) (REDLINE et al., 1985; WALSH et al., 1986; KLOTZ, 1989; MARTINO et al., 1990; TEGLIA et al., 1991; WARNOCK und JOHNSON, 1991; MARCON und POWELL, 1992; POLACHECK et al., 1992; WALSH et al., 1993; BOUZA und MUÑOZ, 2004; GIRMENIA et al., 2005). Für lebensmittelasoziierte Erkrankungen besitzen diese Hefespezies keine Bedeutung.

Tabelle 9: Übersicht über die Krankheitsbilder, Infektionswege und Risikogruppen der wichtigsten opportunistisch pathogenen Hefespezies

Pathogene Hefespezies	Krankheitsbild/wichtigste Symptome/Organbeteiligung	Infektionsweg	Risikogruppe/Risikofaktoren	Quelle
<i>C. albicans</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. guilliermondii</i>	“Candidiasis”, Soor, Stomatitis, Vaginitis, Hautmykosen, Nagelbettentzündung, Konjunktivitis Candidämie; Am häufigsten betroffene Organe: Augen, Leber, Nieren, Milz, Gehirn	Endogen (Voraussetzung: gestörte Immunabwehr), über Schmierinfektionen, operative Wunden und die Harnwege, hämatogen, aerogen, oral	Immunsupprimierte z. B. Patienten mit AIDS, Diabetes mellitus, Neoplasien, Neutropenie	HAZEN (1995) KAUFFMAN (2006) CHEN et al. (1997)
<i>Cr. neoformans</i> <i>Cr. gatti</i>	„Kryptokokkose“: Subakute/chronische Meningitis, pulmonale Abszesse, Dermatitis, Osteitis, Blutinfektion	Aerogen (Inhalation der in der Umwelt weit verbreiteten Hefen)	Immunsupprimierte mit AIDS, hämato-onkologische Patienten, Rheumatologie, chronische Organerkrankungen, Organtransplantation; Selten immunkompetente Menschen	HAZEN (1995) SUKROONGREUNG et al. (1998) CHAYAKULKEEREE und PERFECT (2006) COOPER (2011) RKI (2012)
<i>Ma. furfur</i>	Kleienpilzflechte, Follikulitis Pulmonale Infiltrate, Pneumonie, Fieber, Thrombozytopenie, Leukopenie, Sepsis;	Hämatogen (Lipid-Infusionen über zentralen Venenkatheter)	AIDS-Patienten, Säuglinge mit kardio-pulmonalen Erkrankungen, Erwachsene mit schwerer gastrointestinalen Erkrankung und Immunsuppression	REDLINE et al. (1985) KLOTZ (1989) TEGLIA et al. (1991) MARCON und POWELL (1992)
<i>Tr. beigellii</i>	Dermatitis; Invasive Pilzinfektion mit Sepsis, Pneumonie	Haut, n. a.	Immunsupprimierte, Krebspatienten, seltener immunkompetente Menschen	HOY et al. (1986) WALSH et al. (1986) ERER et al. (2000) KRCMERY JR et al. (1999)
<i>Blastomyces capitatus</i>	Invasive Pilzinfektion mit Fungämie, pulmonalen Infiltraten, Fieber; Infektionen des zentralen Nervensystems; fokale Hepatitis; Endokarditis	Respirations- und Verdauungstrakt, Haut, hämatogen	Immunsupprimierte, vor allem Leukämie-Patienten	MARTINO et al.(1990) BOUZA und MUÑOS (2004) POLACHECK et al. (1992) GIRMENIA et al. (2005)

Blastomyces=*Blastoschizomyces*, *C.*=*Candida*, *Cr.*=*Cryptococcus*, *Ma.*=*Malassezia*, *Tr.*=*Trichosporon*, n. a.=nicht angegeben

2.3.3.3 Pathogenität lebensmittelassoziierter Hefen

Im Hinblick auf die Lebensmittelsicherheit werden Hefen als ungefährlich betrachtet. Im Gegensatz zu Bakterien, Viren und manchen Schimmelpilzen werden Hefen sehr selten mit Ausbrüchen von Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen in Zusammenhang gebracht (FLEET und BALIA, 2006; FLEET, 2011). Jedoch finden sich in der Literatur Berichte, die das Vorkommen von Hefen in Lebensmitteln mit diversen allergischen und hypersensitiven Reaktionen beim Menschen, wie gastrointestinale, pulmonale und dermatologische Störungen, in Verbindung bringen (CROOK, 1984; FLEET, 2011). Das chronische Müdigkeitssyndrom, das dysfunktionale und irritable Darmsyndrom sowie die intestinale Dysbiose sind die überwiegenden Formen unter diesen Störungen. Es herrscht die Auffassung, dass die Überbesiedlung von Hefen im Gastrointestinal-Trakt zu diesen Störungen führen kann (FLEET and BALIA, 2006). Nach LOUREIRO und QUEROL (1999) verbreiteten sich in diesem Zusammenhang die sogenannten „Hefe-freien“-Diäten. Dabei wird *C. albicans* in vielen Fällen als verantwortliche Hefespezies genannt, aber auch andere Spezies scheinen beteiligt zu sein. Es wird angenommen, dass verschiedene Hefe-Metaboliten, z.B. Acetaldehyd, über den Gastrointestinal-Trakt in den Blutkreislauf gelangen und unerwünschte Reaktionen auslösen. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass diverse Komponenten der Hefe-Zellwände, wie 1,3- β -Glukane und Mannane, immunogene und/oder immunmodulierende Einflüsse haben, und dies lässt darauf schließen, dass die tatsächlichen Wirkmechanismen von Hefen vermutlich komplexer sind (FLEET and BALIA, 2006; LINDBERG et al., 1992, KIM et al., 2002, INSTANES et al., 2004). Die Verknüpfung der genannten gesundheitlichen Störungen beim Menschen mit Hefen basiert auf Beobachtungen, die hinsichtlich der Ernährung dieser Menschen gemacht wurden. In verschiedenen Studien zeigte sich, dass nach der Entfernung der Hefe-verdächtigen Lebensmittel aus dem Ernährungsplan, die Symptome in der Regel abklangen. Wurden diese Lebensmittel erneut in die Diät einbezogen, tauchten die Symptome wieder auf (GRANT, 1979; WUTHRICH und HOFER, 1986; EATON und HOWARD, 1998). Solche Lebensmittel sind u.a. Hefeextrakt, Sauerteigbrot, alkoholische Getränke und schimmelgereifte Käsesorten (EATON and HOWARD, 1998).

JACQUES und CASAREGOLA (2008) äußerten die Ansicht, dass die in der Lebensmittelgruppe Käse nachgewiesenen Hefespezies nicht im Zusammenhang mit der Entstehung von Krankheiten bei gesunden Menschen stehen.

WONG et al. (1982) beschrieb eine Knocheninfektion (Osteitis), die er auf die lebensmittelassoziierte Hefe *D. hansenii* zurückführte. Dieselbe Hefe wurde von WAGNER et al. (2005) als Ursache einer persistierenden Fungämie (Candidämie) bei einem immunsupprimierten Hochrisikopatienten beschrieben, der letztlich aufgrund einer Candidämie und Pneumonie verstarb. Aus dem Lungensekret und dem Blut des Patienten konnte *C. famata* (Teleomorph von *D. hansenii*) isoliert werden. Der Schimmelpilz *Scopulariopsis brevicaulis* wurde ebenfalls aus dem Lungensekret isoliert. In keinem dieser Fälle wurde ein Zusammenhang mit dem Lebensmittelverzehr erstellt.

Auch andere Fallberichte von invasiven Infektionen durch *Scopulariopsis brevicaulis* (STEINBACH et al., 2004; WUYTS et al., 2005; BELTRAME et al., 2009; YANG et al., 2012) und *C. famata* (QUINDÓS et al., 1994) zeigen die Fatalität dieser Pathogene bei immunsupprimierten Patienten und bezeugen die relativ niedrige Sensibilität wenn nicht sogar Resistenz dieser Keime gegen neue Antimykotika.

Die Hefe *Y. lipolytica*, die ebenfalls mit Lebensmitteln wie Aufschnitt, fermentierte Würste, Hühner- und Putenfleisch, Rinderhack, Rohwurst und Salami, in Verbindung gebracht wird (Tabelle 6) (JOHANNSEN et al., 1984; BANKS und BOARD, 1987; DIRIYE et al., 1993; WOLTER et al., 2000), wurde mit einer rezidivierenden Fungämie bei einem Leukämie-Patienten assoziiert (CHANG et al., 2001).

Vor wenigen Jahren wurde erstmalig die pathogene Hefe *C. albicans* aus traditionellem ägyptischen „Domiat“-Käse isoliert. Ein weiterer interessanter Befund derselben Studie war die Identifizierung diverser Isolate aus „Domiat“- und „Kariesh“-Käse als *Clavispora* (*Cv.*) *lusitaniae* (EL-SHAROUD et al., 2009).

Cv. lusitaniae ist der Gattung *Candida* spp. zugehörig und wurde im Jahr 1979 als opportunistisch humanpathogen beschrieben, nachdem sie aus dem Blut eines Patienten mit akuter myelogener Leukämie isoliert wurde (PAPPAGIANIS et al., 1979). Das (wenn auch seltene) Vorkommen von *Cv. lusitaniae*, *Issatchenkia* (*I.*) *orientalis* (teleomorphe Form von *C. krusei*) und *C. rugosa* in Käse ist in der Literatur beschrieben (JACQUES und CASAREGOLA, 2008).

Aus einem Versuch von MENDEL et al. (2006) resultierte, dass ein Transfer von genetischem Material zwischen unterschiedlichen Hefespezies möglich ist, wobei der genaue Transfermechanismus unklar bleibt. Sie wiesen den Plasmid-Transfer zwischen der pathogenen Hefe *C. glabrata* und den lebensmittelassoziierten Hefen *S. cerevisiae* und

S. bayanus nach. Daraus resultiert, dass der Austausch sowohl von diversen Virulenzfaktoren als auch von Medikament-Resistenzen zwischen weit entfernten Hefespezies möglich ist. Dieser DNA-Transfer könnte außerdem die Mutation von harmlosen, saprophytischen zu potentiell pathogenen Hefen ermöglichen und schließlich neue Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier hervorrufen (MENTEL et al., 2006).

Die Fähigkeit mancher Hefespezies Toxine zu produzieren ist bekannt (MAGLIANI et al., 1997). Solche toxinproduzierenden Hefen werden im Englischen als „killer yeasts“ bezeichnet. Die produzierten Toxine sind niedermolekulare Proteine oder Glykoproteine, die sensible Zellen derselben oder anderer Hefe-Gattungen töten, ohne dass dabei direkter Zellkontakt besteht (MAGLIANI et al., 1997; SCHMITT und BREINIG, 2002).

Dabei sind die toxischen Hefestämme zwar gegen ihr eigenes Toxin immun, sie sind jedoch sensibel für Toxine, die von anderen toxinproduzierenden Hefestämmen ausgeschüttet werden. Das Vorkommen dieses „Killer“-Phänotyps ist nicht unüblich, sowohl bei den in der freien Natur vorkommenden Hefen als auch bei Hefestämmen aus Stammsammlungen. Toxinproduzierende „killer yeasts“ finden sich in verschiedenen Gattungen wie *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Ustilago*, *Torulopsis*, *Williopsis* und *Zygosaccharomyces*. Somit spricht dies für die weite Verbreitung des „Killer“-Phänomens (MAGLIANI et al., 1997).

Die Pathogenität dieser „killer yeasts“ für marine Krebstiere, wie Schrimps und Krabben, ist bekannt (SUN und SUN, 1998; MOORE und STROM, 2003; WANG et al., 2007) und hat teilweise zu enormen finanziellen Verlusten in der Aquakultur in manchen Regionen Chinas geführt (XU et al., 2003; XU, 2005).

2.3.3.4 Nachweis lebensmittelassoziierter Hefen

Die Isolierung, die Keimzahlbestimmung und die Identifizierung von lebensmittelassozierten Hefen basiert auf denselben Prinzipien und Verfahren, die allgemein für Hefen verwendet werden. Diese beinhalten das Suspensieren der Probe im Vortex, die Verdünnung der entstandenen Suspension und das anschließende Ausspateln auf Agarplatten, das MPN-Verfahren (most probable number), die Membranfiltration, licht- oder elektronenmikroskopische Verfahren, die Subkultivierung der Isolate bis zur Entstehung von Reinkulturen und die Identifizierung der Isolate auf Genus-, Spezies- oder Stamm-Ebene (FLEET, 2011).

Kulturelle Verfahren

Gängige Nährmedien für die Isolierung von Hefen sind u.a. der Malzextrakt-Agar (MEA-Agar), der Glukose-Hefeextrakt-Pepton-Agar (GYP-Agar), Trypton-Glukose-Hefeextrakt-Agar (TGY-Agar) und der Dichloran-Rose-Bengal-Chloramphenicol-Agar (DRBC). Durch die Zugabe von Antibiotika wie z.B. Oxytetracyclin, Gentamycin, Streptomycin, Chloramphenicol und Penicillin, mit einer Konzentration von ca. 100 mg/l, kann das bakterielle Wachstum kontrolliert werden (FLEET, 2011). Da die meisten Hefen mesophil sind, eignet sich für die Inkubation der Agarplatten eine Temperatur von +20 °C bis +25 °C. Für die Isolierung psychrophiler Hefen eignet sich eine Inkubationstemperatur von +4 °C bis +15 °C (KURTZMAN et al., 2011). Das parallele Wachstum von Schimmelpilzen kann durch die Zugabe von Biphenyl, Propionsäure oder Dichloran gehemmt werden (FLEET, 1992; DEÁK, 2001). Beim parallelen Vorkommen hoher Populationen von *S. cerevisiae* können Nicht-*Saccharomyces*-Spezies selektiv durch den klassischen Lysin-Agar isoliert werden, da *S. cerevisiae* Lysin nicht als Stickstoffquelle verwerten kann (FLEET, 2011).

Durch die Zugabe von Ethanol in das Nährmedium lassen sich Ethanol-tolerante Hefen in Anwesenheit von weniger toleranten Hefen isolieren. Für die Isolierung von xerotoleranten Hefen, die in Lebensmitteln mit hoher Zucker- oder Salzkonzentration vorkommen, eignen sich Nährmedien mit einer Sukrose-Konzentration von 50-60 % oder einer NaCl-Konzentration von 10-15 %. Alternativ können andere gelöste Stoffe, wie z. B. Glycerol, verwendet werden (FLEET, 2011).

In vielen verarbeiteten Lebensmitteln kommen sublethale Hefezellen vor, die sich zu einem späteren Zeitpunkt erholen und Verderb verursachen können. Unter den oben genannten kulturellen Bedingungen könnten diese durch den Verarbeitungsprozeß geschwächten oder verletzten Hefezellen möglicherweise keine Kolonien bilden und daher nicht erfasst werden. Die Wiederbelebung von sublethalen Hefezellen kann durch die Inkubation in 2-%iger Malzextraktbrühe für zwei bis drei Stunden bei +25 °C erfolgen (FLEET und MIAN, 1998; FLEET, 2011).

Molekularbiologische Methoden für die Identifizierung lebensmittelassoziierter Hefen

Gegenwärtig werden Hefen durch die Sequenzierung des SSU (small-subunit) oder LSU (large-subunit) ribosomalen RNA (rRNA) Gene sowie der internal transcribed spacers (ITS) der rRNA-Wiederholung auf Spezies-Ebene identifiziert. Die meisten dieser Sequenzen sind

durch öffentliche Datenbanken, z.B. GenBank, frei zugänglich (FLEET, 2011). Die Sequenzen der D1/D2-Domäne des LSU ribosomalen RNA Gens aller aktuell akzeptierten Hefen sind inzwischen festgelegt worden (Ascomyceten und Basidiomyceten) (KURTZMAN und ROBNETT, 1998; FELL et al., 2000; SCORZETTI et al., 2002; KURTZMAN und FELL, 2006). Beim Vergleich von ascomycetischer Doppelstrang-DNA können Unstimmigkeiten bis zu drei der 500-600 Nukleotiden der D1/D2-Domäne innerhalb einer Spezies auftauchen. Unstimmigkeiten ab sechs der 500-600 Nukleotide (>1 %) indizieren, dass es sich um verschiedene Spezies handelt (KURTZMAN and ROBNETT, 1998). Auch KABISCH et al. (2013) stellten beim Vergleich der Doppelstrang-DNA einer aus vakuumverpacktem Fleisch neu isolierten *Kazachstania*-Spezies mit der am engsten verwandten Spezies, *K. lodderae*, eine Unstimmigkeit von 17-23 Nukleotiden in der D1/D2-Domäne fest.

Das Prozedere beinhaltet die Extraktion der DNA aus der Hefekultur, die Amplifikation der Zielsequenz mittels PCR, die Sequenzierung des PCR-Produktes und letztlich den Vergleich der Ergebnis-Sequenz mit anderen Sequenzen einer Datenbank. Eine schnellere und einfachere, jedoch ungenauere, Methode basiert auf der PCR-RFLP (restriction –enzyme fragment length polymorphism)-Analyse der ITS- und anderer Regionen ribosomaler RNA Gene (FLEET, 2011). Für die Differenzierung von Hefen auf Sub-Spezies-Ebene wurden diverse molekularbiologische Methoden wie PFGE (Pulsfeld-Gelelektrophorese) der chromosomalen DNA, RAPD (random amplification of polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphisms), RFLP (restriction fragment length polymorphism) und profiling of microsatellite DNA, entwickelt. Eine einfachere und schnellere Methode basiert auf der RFLP Analyse mitochondrialer DNA, bei der keine DNA-Amplifikation mittels PCR nötig ist (ANDRADE et al., 2006; BEH et al., 2006; FERNANDEZ-ESPINAR et al., 2006; LOPANDIC et al., 2006).

Biochemische und physiologische Tests für die Charakterisierung von Hefen

Hefen können aufgrund ihrer physiologischen und biochemischen Eigenschaften charakterisiert werden. Untersucht werden u.a. die Assimilierung, d.h. die aerobe Verwertung von verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen, die Fermentation von Zuckern, die Hydrolyse von Harnstoff, das Wachstum bei +37 °C und anderen Temperaturen sowie das Wachstum in hohen Zucker- und Salzkonzentrationen, die Lipase-Aktivität, der Vitaminbedarf und die Resistenz gegen bestimmte Antibiotika, wie z. B.

Cycloheximid (KURTZMAN et al., 2011). Zur Bestimmung einiger dieser biochemischen und physiologischen Eigenschaften sind kommerziell erhältliche Kits verfügbar. Solche Kits, u.a. der API 20C®, ATB 32C®, SIM®, RapID yeast Plus®, Yeast-Ident-Food® und BIOLOG®-Systeme, erfassen das Wachstum und die Reaktionsfähigkeit von Hefen in Anwesenheit von sorgfältig ausgewählten Substraten. Anschließend werden die Ergebnisse mithilfe von Software ausgewertet und in Datenbanken mit bereits vorhandenen Daten verglichen (FLEET, 2011). Bei den Fermentationsreaktionen kann die Kohlenstoffdioxidproduktion detektiert werden. Von den verschiedenen dafür entwickelten Methoden (VAN DER WALT, 1970), hat sich die Methode mit den Durham-Röhrchen für die Routine-Diagnostik als nützlichste erwiesen (WICKERHAM, 1951) und wird heutzutage angewendet (KURTZMAN et al., 2011).

Für die klassischen Methoden, mit denen viele dieser biochemischen und physiologischen Untersuchungen durchgeführt werden, gibt es keine standardisierte Verfahren. In jedem Fall sollten junge, schnell wachsende Hefekulturen als Inokulum eingesetzt werden. Für die Herstellung der Nährmedien der Tests sollten reine und hochwertige Kohlenhydrate verwendet werden (KURTZMAN et al., 2011).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Anzahl und Herkunft der Fleischproben

Insgesamt wurden 93 vakuumverpackte Fleischproben (60 Rind- und 33 Lammfleischproben) untersucht. Die Rindfleischproben stammten aus Europa (20), Nordamerika (2), Südamerika (18) und Ozeanien (20) (Tabelle 10), während die Lammfleischproben aus Europa (20) und Ozeanien (13) stammten (Tabelle 11). Der Großteil der Proben wurde aus Großmärkten und Supermärkten in Süddeutschland bezogen. Ein kleinerer Teil stammt aus dem norddeutschen Raum oder wurde bei Fleischanbietern des Internethandels bestellt. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, dass sowohl original verpackte Fleischstücke aus den Ursprungsländern sowie in Deutschland neu verpackte Ware in den Probenumfang mit einfließen.

Lammfleischproben aus Nord- und Südamerika waren weder in regionalen bzw. überregionalen Großmärkten noch über das Internet beziehbar und konnten daher nicht untersucht werden. Bezüglich der australischen Lammfleischproben wurde lediglich ein Großmarkt in München periodisch und unregelmäßig mit diesem Fleisch beliefert, womit lediglich drei australische Lammfleischproben von dort bezogen werden konnten.

Die Proben wurden unter Kühlung mittels handelsüblicher Kühlakkus in den Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit, Tierärztliche Fakultät der LMU München gebracht und dort bis zum Zeitpunkt der Untersuchung im Kühlschrank bei +4 °C gelagert. Mit Ausnahme von sechs Proben wurden die Fleischproben frühestens zwei Tage vor und spätestens am Tag des Verbrauchsdatums bzw. Mindesthaltbarkeitsdatums untersucht. Die sechs Proben wurden einen Tag nach Ablauf ihres Mindesthaltbarkeitsdatums untersucht.

Tabelle 10: Herkunft und Anzahl der untersuchten Rindfleischproben

Kontinent und Anzahl der Proben (n)	Land	Probenanzahl (n)	
		Original-verpackte Ware	In Deutschland verpackte Ware
Europa (20)	Deutschland	12	0
	Frankreich	1	1
	Irland	4	0
	Niederlande	2	0
Nordamerika (2)	USA	1	1
Südamerika (18)	Argentinien	4	7
	Brasilien	1	0
	Uruguay	5	1
Ozeanien (20)	Australien	1	9
	Neuseeland	10	0
Gesamtanzahl		41	19

n=Anzahl

Tabelle 11: Herkunft und Anzahl der untersuchten Lammfleischproben

Kontinent und Anzahl der Proben (n)	Land	Probenanzahl (n)	
		Original-verpackte Ware	In Deutschland verpackte Ware
Europa (20)	Deutschland	9	0
	Irland	4	2
	Wales, UK	5	0
Ozeanien (13)	Australien	3	0
	Neuseeland	10	0
Gesamtanzahl		31	2

n=Anzahl

3.1.2 Nährmedien

Für die Anzucht und Isolierung von Hefen wurden der Malzextraktagar [MEA⁺-Agar, Merck, Darmstadt, Deutschland] mit Novobiocin (0,125 g, Merck Millipore, Merck, Darmstadt, Deutschland) und der Glukose-Hefe-Extrakt-Agar verwendet. Für die mikrobiologische Untersuchung wurden verschiedene Selektiv-Agars benutzt. Alle verwendeten Nährmedien sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Nährmedien mit Herstellerangaben

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Menge	Hersteller/Artikelnummer
Malzextrakt-Agar (MEA ⁺)	Fertigmischung	48,0 g	Merck, Art.-Nr. 105398
mit Antibiotikum	Novobiocin	0,125 g	Merck, Art.-Nr. D00117915
	Aqua dest.	ad 1000 ml	
Glukose-Hefe-Extrakt-Pepton-Agar (GYP)	D- Glukose	20,0 g	Merck, Art.-Nr. 1.08373.1000
	Hefeextrakt	5,0 g	Oxoid, Wesel, Deutschland, Art.-Nr. LP0021
	Universalpepton M66	10,0 g	Merck, Art.-Nr. 1.07043
	Agar Technical, No. 3	20,0 g	Oxoid, Art.-Nr. LP0013
	Aqua dest.	ad 1000 ml	
Plate Count-Agar (PC)	Fertigmischung	22,5 g	Merck, Art.-Nr. 1.05463.0500
	Aqua dest.	ad 1000 ml	
VRBD-Agar nach Mossel	Fertigmischung	39,5 g	Merck, Art.-Nr. 1.10275.0500
	Aqua dest.	ad 1000 ml	
MRS-Agar nach De Man, Rogosa und Sharpe	Fertigmischung	68,2 g	Merck, Art.-Nr. 1.10275.0500
	Agar Technical, No. 3	3,0 g	Oxoid, LP0013
	Aqua dest.	ad 1000 ml	
	Salzsäure (HCl) 1mol/l	nach Bedarf*	Merck, Art.-Nr. 9057.1000
Verdünnungsflüssigkeit	Pepton	1,0 g	Merck, Art.-Nr. 1.07214.1000
	NaCl, Sodium Chloride for analysis	1,5 g	Merck, Art.-Nr. 1.06404.1000

*=benötigte Menge, um den pH-Wert auf 5,0 bzw. 5,7 einzustellen

3.1.3 Sonstige Materialien und Geräte für die kulturellen Verfahren

- Anaerocult A® mini Spezialbebrütungsbeutel
[Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 1.01611.0001]
- Anaerotest® Anaerobiose-Indikator
[Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 1.15112.0001]
- Kanülen 21G [Sterican, BBraun Medical AG, Emmenbrücke, Schweiz]

Geräte:

- Bunsenbrenner [Fuego basic, Typ 088 BO 165, WLD-TEC GmbH, Göttingen, Deutschland]
- Brutschränke
Heraeus [B 6200, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA]
Heraeus Incubator [B 6420, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA]
- Heizplatte [Monotherm, Variomag Elektronikrührer, St. Louis, Missouri, USA]

- Kühlschrank [Kühl-Gefrierkombi, Typnummer 27145, Liebherr, Deutschland]
- pH-Meter [WTW, Microprocessor, Multi Cal 535, Weilheim, Deutschland]
- Pipette Eppendorf Research 100-1.000 µl [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland]
- Pipette Eppendorf Research 200 µ [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland]
- Pipettenspitzen [1-200 µl, Kisker, Nümbrecht, Deutschland, Art.-Nr. 10513156]
- Pipettenspitzen (100-1000 µl, Kisker, Nümbrecht, Deutschland, Art.-Nr. 120820-157)
- Spritzen [100 ml, Becton, Dickinson and Company, Fraga, Spanien, Art.-Nr. 309110]
- Stomacher [Seward, Stomacher 400 Circulator, Worthing, UK]
- Stomacher-Beutel [Tempo, SACS, Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich, Art.-Nr. 234520]
- Vortexer [Janke und Kunkel, IKA-Labortechnik, VF2, Staufen, Deutschland]
- Waage [CP32025-OCE, Sartorius, AG Göttingen, Deutschland]
- Wasserbad [RM 20 LAUDA, Lauda-Königshofen, Deutschland]

3.1.4 Materialien und Geräte für die lichtmikroskopische Untersuchung

- Gram-Färbung:
 - Kristallviolettlösung [Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 1.092180.2500]
 - Lugols Lösung [Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 1.09261.2500]
 - Safraninlösung [Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 1.09217.2500]
 - Ethanol [Rotipuran® ≥99,8%, p.a., Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 90653]
 - 0,9%-ige NaCl-Lösung [Merck, Art.-Nr. 1.06404.1000]
- Deckgläser 24 x 24 mm [Merck, Art.-Nr. 613F9415]
- Immersionsöl [Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 1.15577.0100]
- Methylenblaulösung 0,1%ig [Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 1.592700010]
- Objektträger [Microscope slides, ECN 631-1551, VWR, Darmstadt, Deutschland]

Geräte:

- Digitalmikroskop Leica DM 5000 B [Leika, Solms, Deutschland]
 - Grundstativ Leica DM 5000 B,
 - Elektronikbox CRT 5000
 - Kamera DFC 480
- Pipette Eppendorf Research 200 µ [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland]
- Mikroskop Aristoplan Type 307-148.002 [Leitz, Wetzlar, Deutschland]
 - Kamera DFC 320 [Leika, Solms, Deutschland]

3.1.5 Materialien für die biochemische Untersuchung

Die biochemischen Untersuchungen wurden mithilfe der kommerziellen Kits API 20 C AUX® und API Candida® [Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich] durchgeführt. Diese sowie hierfür verwendete Materialien sind nachfolgend aufgeführt.

- API 20 C AUX® [Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich, Art.-Nr. 20 210]
- API Candida® [Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich, Art.-Nr. 10 500]
- Blut-Agarplatten [Columbia Agar with sheep blood plus, Oxoid, Wesel, Deutschland, Art.-Nr. 1372324]

- Densimat [Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich, Art.-Nr. 99234]
- MEA+-Agar [Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 105398]
- Paraffin-Öl [Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich, Art.-Nr.70 100]
- Pipette Eppendorf Research 100-1.000 µl [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland]
- Pipette Eppendorf Research 200 µl [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland]
- Pipette Eppendorf Research 500-5.000 µl [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland]
- Pipettenspitzen [1-200 µl, Kisker, Nümbrecht, Deutschland, Art.-Nr. 10513156]
- Pipettenspitzen (100-1000 µl, Kisker, Nümbrecht, Art.-Nr. 120820-157]
- Sterile 0,9%ige NaCl-Lösung []
- Suspensionsmedium [2ml, Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich, Art.-Nr. 70 700]

3.1.6 Materialien und Geräte für die molekularbiologischen Untersuchungen

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden die folgenden Materialien und Geräte verwendet.

3.1.6.1 PCR

- Agarose [Molecular Biology Agarose, 125 g, Biorad, Hercules, California, USA, Art.-Nr. 161-3101]
- AmpliTaq Gold TAQ-Polymerase, mit Gold Buffer und MgCl₂ [Life Technologies, Darmstadt, Deutschland, Art.-Nr. 4311806]
- Aqua dest.
- Aqua bidest.
- DNase freies Wasser [Water, Molecular Biology Grade, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Art.-Nr. 0032 006-302]
- DNeasy Blood and Tissue Kit® [Qiagen, Hilden, Deutschland, Art.-Nr. 69504]
- dNTP-Mix [2 mM each, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland Art.-Nr. R0242, Bezug über VWR, Darmstadt, Deutschland]
- Ethidiumbromidlösung 1%ig [10mg/ml, Biorad, Hercules, California, USA, Art.-Nr. 1610433]
- HotStarTaq Master Mix Kit (1000 U) [Qiagen, Hilden, Deutschland, Art.-Nr. 203445]
- Längenstandart [EZ Load 100bp, Molecular Ruler 50 µg/ml, Biorad, Hercules, California, USA, Art.-Nr. L9703457]
- Ladepuffer [Nucleic Acid Loading Buffer 5x, Biorad, Hercules, California, USA, Art.-Nr. L9703448]
- Pipettenspitzen [1-200 µl, Kisker, Nümbrecht, Deutschland, Art.-Nr. 10513156]
- Pipettenspitzen (100-1000 µl, Kisker, Nümbrecht, Art.-Nr. 120820-157]
- Primer NL1 (5´GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3´)
[Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Konzentration 0,2 mM]
- Primer NL4 (5´GGTCCGTGTTTCAAGACGG3´)
[Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Konzentration 0,2 mM]
- Primer ITS 1 (5´TCCGTAGGTGAACCTGCGG´3)
[TIB® MOLBIOL Syntheselabor, Berlin, Deutschland]
- Primer ITS 4 (5´TCCTCCGCTTATTGATATGC´3)
[TIB® MOLBIOL Syntheselabor, Berlin, Deutschland]
- Messzylinder [Witek, Deutschland]

- Reaktionsgefäße Safe-Lock-Tubes 1,5 ml [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland, Art.-Nr. 0030 121.848]
- Referenzstamm *Yarrowia lipolytica* DSMZ 70561 [Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland]
- TBE-Puffer [10x Tris/Boric Acid/EDTA Buffer, Biorad, Hercules, California, Art.-Nr. 161-0733]
- TBE-Pufferlösung:
 - 100 ml TBE-Puffer
 - ad 900 ml A. bidest

Geräte:

- Analysenwaage [Sartorius, Typ CP32025-OCE, Göttingen, Deutschland]
- Gel-Laufkammer [Sub-Cell GT MINI, Biorad, Hercules, California, USA, Art.-Nr. 51782]
- Mikrowelle [Microstar MM 6460, Micromaxx, MTC Medion Technologie Center, Mühlheim/Ruhr, Deutschland]
- Pipette Eppendorf Research 0,5-10 µl [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland]
- Pipette Eppendorf Research 200 µl [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland]
- Pipette Eppendorf Research 100-1.000 µl [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland]
- Power Supply [PowerPac Basic, Biorad, Hercules, California, USA,]
- Power Supply [PowerPac 200, Biorad, Hercules, California, USA,]
- Schüttler [Thermomixer comfort, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland]
- Thermocycler [iCycler, Biorad, Hercules, California, USA,]
- Software Agarose-Gel [Quantity One, Version 4.5, Biorad, Hercules, California, USA,]
- UV-Kammer [Molecular Imager, Gel Doc, Typnummer 170-8060, Biorad, Hercules, California, USA,]
- Zentrifuge [Centrifuge, Typ 5415 D, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland]

3.1.6.2 Sequenzierung

- Elutionspuffer [QIAquick® PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland]
- Ethanol [Rotipuran® ≥99,8%, p.a., Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. 90653]
- Küvetten [UVette, RNase free-DNA-free, 50-2000cµl, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland]
- Pipette Eppendorf Research 0,5-10 µl [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland]
- Pipette Eppendorf Research 200 µl [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland]
- Pipette Eppendorf Research 100-1.000 µl [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland]
- Pipettenspitzen [1-200 µl, Kisker, Nümbrecht, Deutschland, Art.-Nr. 10513156]
- Pipettenspitzen (100-1000 µl, Kisker, Nümbrecht, Art.-Nr. 120820-157]
- Photometer [Bio Photometer, 8,5 mm, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland]
- Primer NL1 [Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Konzentration 0,2 mM]
- Primer NL4 [Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Konzentration 0,2 mM]
- Primer ITS 1 [TIB® MOLBIOL, Syntheselabor, Berlin, Deutschland Konzentration 0,2 mM]
- Primer ITS 4 [TIB® MOLBIOL, Syntheselabor, Berlin, Deutschland Konzentration 0,2 mM]
- QIAquick® PCR Purification Kit [Qiagen, Hilden, Deutschland, Art.-Nr. 28104]
- Reaktionsgefäße Safe-Lock-Tubes 1,5 ml [Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland, Art.-Nr. 0030 121.848]
- Tischzentrifuge [mini Spin plus, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland]

3.2 Methoden

3.2.1 Untersuchung der Fleischproben

3.2.1.1 Prüfung der Verpackungen

Die Vakuumverpackungen aller Proben wurden vor der Untersuchung visuell auf Beschädigungen untersucht. Eventuelle Gasansammlung in den Verpackungen wurden anhand des „Pack Blowing Score“ nach BOEREMA et al. (2007) von 0 bis 5 eingeteilt und beurteilt (Tabelle 13). Die Einstufung in Score 0 und 1 wird dabei als Normalzustand betrachtet, während die Scores 2 bis 5 zunehmend starke produktuntypische Abweichungen beschreiben.

Tabelle 13: Einteilung des „Pack Blowing Score“ nach BOEREMA et al. (2007)

Score	Zustand der Vakuumverpackung
0	Keine sichtbaren Gasblasen
1	Wenige kleine Gasblasen im Fleischtropfsaft sichtbar
2	Aussehen wie bei Vakuumverlust
3	Offensichtlich aufgebläht, puffig
4	Auf volle Größe aufgebläht, noch nicht prall gespannt
5	Auf volle Größe aufgebläht, Folie straff gespannt

3.2.1.2 Sensorische Untersuchung

Zur Öffnung der Verpackung wurde diese mit einer sterilen Pinzette an einer Stelle fixiert und mit einer sterilen Schere so aufgeschnitten, dass die Oberfläche des Fleisches für die Probenentnahme zugänglich war. Die sensorische Untersuchung umfasste die Bewertung des Geruchs, der visuellen Farbe, der Konsistenz und der Saftigkeit bzw. Trockenheit der Fleischproben. Der Geruch wurde unmittelbar nach dem Öffnen der Vakuumverpackung beurteilt und anhand eines selbstentworfenen Punkteschemas in Punkten von eins bis vier angegeben (Tabelle 14).

Die Farbe des Fleisches wurde visuell nach ihrer Intensität beurteilt und dokumentiert. Um einen Eindruck über die Konsistenz und Festigkeit des Fleisches zu erhalten, wurde das Fleisch mithilfe einer sterilen Pinzette gedehnt und eingedrückt. Die Saftigkeit bzw.

Trockenheit des Fleisches wurde subjektiv anhand der Konsistenz und der optischen Erscheinung des Fleisches bewertet.

Tabelle 14: Punkteverteilung und Bewertung des Geruchs

Punkte	Sensorische Bewertung des Geruchs
1	frisch, fleischig, produktspezifisch, mit leicht säuerlicher Note
2	Säuerlich, jedoch nicht unappetitlich
3	Sauer, leicht unangenehm, nicht mehr frisch
4	Muffig, stark unappetitlich, verdorben

3.2.1.3 Lichtmikroskopische Untersuchung und Färbemethoden

Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurde ein Tropfen Fleischtropfsaft auf einen Objektträger gegeben, mit einem Tropfen steriler 0,9%iger NaCl-Lösung vermischt, und mit einem Deckglas verschlossen. Anschließend erfolgte die Beurteilung des Nativpräparats im Lichtmikroskop bei 100- bis 1000-facher Vergrößerung. Neben der Beurteilung eines Nativpräparates erfolgte die bakterioskopische Untersuchung zusätzlich mittels Gram-Färbung. Dazu wurde erneut ein Tropfen Fleischtropfsaft mit einem Tropfen steriler 0,9%iger NaCl-Lösung auf einem Objektträger vermischt und anschließend zur Hitzefixierung dreimalig zügig durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen. Danach wurde die Gram-Färbung durchgeführt.

Die Bakterioskopie wurde an zwei verschiedenen Lichtmikroskopen vollzogen [Aristoplan Type 307-148.002 Leitz, Wetzlar, Deutschland und Leica DM 5000 B, Leica, Solms, Deutschland].

3.2.1.4 Mikrobiologische Untersuchung

Für die mikrobiologische Untersuchung wurde von zwei bis drei verschiedenen Stellen insgesamt $20 \pm 0,1$ g Probenmaterial herauspräpariert und in einen sterilen Stomacherbeutel gegeben. Zur Herstellung einer Erstverdünnung wurden 180 ml Verdünnungsflüssigkeit hinzugegeben und im Stomacher für 30 Sekunden bei 230 rpm homogenisiert. Anschließend erfolgte die Herstellung einer dezimalen Verdünnungsreihe bis zum Wert 10^{-4} .

Tabelle 15: Übersicht über Nährmedien, Bebrütungstemperaturen und –zeiten sowie Milieubedingungen zur Bestimmung des mikrobiellen Status der Fleischproben

Mikroorganismen	Nährmedium	Temperatur	Dauer	Milieu-Bedingung
Mesophile Keimzahl	Plate Count Agar	+30 °C	72 h	Aerob
	Plate Count Agar	+30 °C	72 h	Anaerob
<i>Enterobacteriaceae</i>	VRBD-Agar	+37 °C	24 h	Aerob
	VRBD-Agar	+37 °C	48 h	Anaerob
Laktobazillen	MRS-Agar 5.0	+25 °C	72 h	Anaerob
Milchsäurebakterien	MRS-Agar 5.7	+25 °C	72 h	Aerob
Psychrophile Hefen	MEA ⁺ -Agar	+10 °C	> 6 Tage	Aerob
	GYP-Agar	+10 °C	> 6 Tage	Aerob

GYP-Agar: Glukose-Yeast-Pepton-Agar

h: Stunden

MEA⁺-Agar: Malzextrakt-Agar mit Novobiocin

MRS-Agar 5.0: de Man, Rogosa and Sharpe-Agar, pH 5,0

MRS-Agar 5.7: de Man, Rogosa and Sharpe-Agar, pH 5,7

VRBD-Agar: Violett Red Bile Glucose Agar

Zur Bestimmung der aeroben und anaeroben mesophilen Keimzahl wurden je 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-3} und 10^{-4} auf einer Plate Count-Agarplatte ausgespatelt (Tabelle 15). Um die Anzahl der aeroben und anaeroben *Enterobacteriaceae* zu ermitteln wurden je 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-2} und 10^{-3} auf einer VRBD-Agarplatte ausgespatelt. Die Anzahl der Milchsäurebakterien wurde mithilfe der MRS-Agarplatten (pH 5,7) ermittelt, auf die ebenfalls je 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-3} und 10^{-4} ausgespatelt wurden. Zur Bestimmung der Laktobazillen wurde ebenfalls der MRS-Agar verwendet, jedoch mit einem pH-Wert von 5,0. Je 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-3} und 10^{-4} wurden hierzu auf einer MRS-Agarplatte ausgespatelt (Tabelle 15).

Zur Kontrolle des anaeroben Milieus wurde bei allen Proben bei den anaerob bebrüteten Agarplatten ein Teststreifen des Anaerotest[®] mitgeführt.

Die Bestimmung der Keimzahlen erfolgte in Anlehnung an die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB). Dazu wurden die Kolonien auf den verschiedenen Nährmedien nach Ablauf der Bebrütungszeit ausgezählt. Die Berechnung der Keimzahlen (KbE/g) erfolgte nach folgender Formel:

$$c = \frac{\sum c}{n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 0,1}$$

C	Gewogenes arithmetisches Mittel der Koloniezahlen (KbE / g)
$\sum c$	Summe der Kolonien aller Petrischalen, die zur Berechnung herangezogen werden (niedrigste und nächst höhere auswertbare Verdünnungsstufe)
n_1	Anzahl Petrischalen der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe
n_2	Anzahl Petrischalen der nächsthöheren Verdünnungsstufe

Bei der Auszählung der *Enterobacteriaceae* auf den aerob bebrüteten VRBD-Agarplatten wurde auf eine Differenzierung der Pseudomonaden verzichtet, da dies nicht Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war. Die Zahlen, die für die Anzahl der aeroben *Enterobacteriaceae* stehen, schließen somit eventuell gewachsene *Pseudomonas* spp. mit ein.

3.2.2 Anzucht und Isolierung von Hefen

Zur Anzucht psychrophiler Hefen wurden je 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-1} und 10^{-2} auf MEA⁺- und GYP-Agarplatten ausgespatelt und anschließend entsprechend bebrütet (Tabelle 15). Die Platten wurden aerob bei +10 °C solange bebrütet, bis das Hefewachstum deutlich sichtbar wurde. Die minimale Bebrütungszeit betrug dabei sechs Tage. Bei Wachstum mehrerer morphologisch unterschiedlicher Hefen auf einer Platte wurden alle gewachsenen Hefen subkultiviert und im Anschluss daran untersucht. Für die weitergehenden Untersuchungen wurde primär der MEA⁺-Agar benutzt. In seltenen Fällen, in denen Hefen nur auf dem GYP-Agar isoliert wurden, wurde mit diesem Agar auch weiter gearbeitet.

3.2.3 Morphologische Differenzierung isolierter Hefen

Makroskopische Differenzierung

Für eine morphologische Differenzierung der isolierten Hefen wurden alle Hefe-Isolate fotografiert und morphologisch beschrieben. In Anlehnung an die Vorgaben von KURTZMAN et al. (2011) wurden die Textur, die Farbe, die Oberfläche, die Erhebung und die Ränder der jeweiligen Kolonie bzw. des Ausstrichs dokumentiert.

Lichtmikroskopische Differenzierung

Für die lichtmikroskopische Differenzierung der Hefe-Isolate wurde ein Nativ-Präparat und im Anschluss daran ein Gram-Präparat angefertigt. Die Präparate wurden bei 400-facher und 1000-facher Vergrößerung mit dem (Digital-) Mikroskop untersucht. Die Zellform bzw. die Zellformen, die eventuelle Sprossung/Knospung sowie die Anwesenheit von (Pseudo)hyphen wurden notiert.

3.2.4 Charakterisierung isolierter Hefen

3.2.4.1 Biochemische Untersuchungen und Fermentation von Kohlenhydraten

Für die biochemische Untersuchung der Hefen wurden zwei kommerziell erhältliche Testkits verwendet: für die Assimilationsreaktionen der API 20 C AUX[®] [Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich] und für die Fermentationsreaktionen und die Hydrolyse von Urea der API Candida[®] [Biomérieux]. Die Tests wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Subkulturen, die für den API 20 C AUX[®] verwendet wurden, wurden auf MEA⁺-Agar angelegt, während die Subkulturen für den API Candida[®] den Herstellerangaben entsprechend auf Blut-Agar angelegt wurden. Die Keimsuspensionen wurden den Herstellerangaben entsprechend hergestellt, wobei der Trübungsstandart McFarland mithilfe eines Densimats gemessen wurde. Der API 20 C AUX[®] wurde bei +30 °C für 48 h und der API Candida[®] bei +37 °C für 24 h unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die Reaktionen wurden anschließend anhand der Ablesetabelle der Arbeitsanleitung der Kits abgelesen und in Form von + (positiv) oder – (negativ) auf dem Ergebnisblatt notiert.

3.2.4.2 Molekularbiologische Untersuchungen

Konventionelle PCR

Für die Bestätigung und Identifizierung der Hefe-Isolate wurden die D1/D2 Domäne des 26S rRNA Gens sowie der ITS-Genabschnitt mittels konventioneller PCR amplifiziert. Dazu wurden die Primer NL 1 (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3') und NL 4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3') nach LIBKIND et al. (2003) sowie die Primer ITS 1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG'3) und ITS 4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC'3) nach WHITE et al. (1990) verwendet.

Für die DNA-Extraktion zur molekularbiologischen Untersuchung erfolgte zuerst die Anzucht isolierter Hefen auf MEA⁺-Agar bei +10 °C für mindestens 14 Tage. Anschließend wurden zwei bis drei Kolonien mit einer sterilen Pipette von der Agarplatte abgetragen. Die Extraktion der DNA wurde mit dem DNeasy Blood and Tissue Kit® nach Herstellerangaben durchgeführt.

Der PCR-Mastermix für die Amplifizierung der D1/D2 Domäne des 26S rRNA Gens wurde in Anlehnung an die Beschreibung von LIBKIND et al. (2003) zusammengesetzt.

Tabelle 16: Reaktionsansatz für die PCR der D1/D2 Domäne des 26S rRNA Gens (nach LIBKIND et al., 2003)

	Konzentration Stammlösung	Konzentration im 50 µl-Ansatz	µl/Ansatz
DNase freies Wasser			29,5
PCR buffer Gold®	10x	1x	5,0
dNTP-Mix (10mM each)	2 mM	0,2 mM	5,0
MgCl ₂ (1,5 mM)	25mM	1,5 mM	3,0
AmpliTaq Gold DNA Taq-Polymerase® (0,05 U/µl)	5 U/µl	0,05 U/µl	0,5
Primer NL 1 (0,2 mM)	10 mM	0,2 mM	1,0
Primer NL 4 (0,2 mM)	10 mM	0,2 mM	1,0
Templat (DNA)			5,0
Gesamtvolumen			50,0

In Vorversuchen wurde der Referenzstamm *Y. lipolytica* - DSMZ 70561 - als Positivkontrolle aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) mitgeführt. Für den Mastermix wurden 5,0 µl PCR buffer Gold, 1,0 µl jeden Primers (0,2 mM), 5,0 µl dNTP-Mix (je 10 mM), 3,0 µl MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µl AmpliTaq Gold DNA Taq-Polymerase (0,05 U/µl) [Applied Biosystems] und 5,0 µl Templat pipettiert. Das Volumen wurde mit DNase freiem Wasser auf 50 µl aufgefüllt (Tabelle 16).

In allen PCR-Reaktionen wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle bei der ersten PCR wurde der Referenzstamm *Y. lipolytica* (DSMZ 70561) aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) eingesetzt. Anschließend erfolgte die Amplifikation im Thermocycler unter den in Tabelle 17 angegebenen Bedingungen.

Tabelle 17: PCR-Protokoll zum Nachweis der D1/D2 Domäne des 26S rRNA Gens (nach LIBKIND et al, 2003)

Zyklen	Protokollschritt	Temperatur	Zeit
1x	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min.
	Denaturierung	92 °C	40 sec.
40x	Annealing	55 °C	40 sec.
	Elongation	72 °C	30 sec.
1x	Elongation	72 °C	10 min.

Zur Darstellung der Amplifikate wurden im Anschluss 2 µl von jedem Amplifikat mit je 2 µl Gel-Loading-Buffer vermischt. Je 4 µl der Proben-Puffer-Mischung wurden in die Kammern eines 1,5%- igen Agarose-Gels pipettiert und anschließend bei 100 V für 60±5 Minuten elektrophoretisch in einer Gel-Laufkammer [Sub-Cell GT MINI, Biorad] aufgetrennt. Im nächsten Schritt wurde das Gel 15 Minuten lang mit 1%iger Ethidiumbromidlösung gefärbt; unmittelbar danach erfolgte die ebensolange Entfärbung mit Aqua dest. Abschließend wurden die Amplifikate mittels UV-Licht als Banden sichtbar gemacht und dann dokumentiert. Die zu erwartenden Banden bestehen aus 500 bis 600 Nukleotiden (KURTZMAN und BOEKHOUT, 2011).

Für die Amplifizierung des ITS-Abschnittes wurde der Qiagen HotStarTaq Mastermix® und das Primerpaar ITS1/ITS4 (WHITE et al., 1990) verwendet (Tabelle 18).

Anschließend erfolgte die Amplifikation im Thermocycler nach dem in Tabelle 19 dargestellten PCR-Protokoll.

Tabelle 18: Reaktionsansatz für die PCR des ITS-Genabschnittes (HUBER, 2012)

	Konzentration Stammlösung	Endkonzentration	µl/Ansatz
DNase freies Wasser			6,5
Qiagen HotStar Taq® Mastermix	2x	1x	12,5
Primer ITS1	10 µM	0,2 µM	0,5
Primer ITS4	10 µM	0,2 µM	0,5
Templat (DNA)			5,0
Gesamtvolumen			25,0

Tabelle 19: PCR-Protokoll zum Nachweis des ITS-Genabschnittes (HUBER, 2012)

Zyklen	Protokollschritt	Temperatur	Zeit
1x	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min.
	Denaturierung	95 °C	20 sec.
45x	Annealing	52 °C	30 sec.
	Elongation	72 °C	90 sec.
1x	Elongation	72 °C	10 min.

Im Anschluss an die Amplifikation wurden zur Darstellung der Amplifikate jedem Amplifikat je 2 µl Gel-Loading-Buffer hinzugefügt. Je 7 µl der Proben-Puffer-Mischung wurden in die Kammern eines 2%-igen Agarose-Gels pipettiert und anschließend bei 100 Volt für 50±5 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt [Mini-Sub Cell, Biorad]. Im nächsten Schritt wurde das Gel 15 Minuten lang mit 1%iger Ethidiumbromidlösung gefärbt; unmittelbar danach erfolgte die eben solange Entfärbung mit Aqua dest. Abschließend wurden die Amplifikate mittels UV-Licht als Banden sichtbar gemacht.

Sequenzierung

Die amplifizierten PCR-Produkte (zwei je Isolat) wurde mit dem QIAquick® PCR Purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration des aufgereinigten PCR-Produktes. Dazu wurden 50 µl des PCR-Produktes in eine DNase-freie Küvette pipettiert, in die dafür vorgesehene Kammer des Photometers gesteckt und die Messung der DNA durchgeführt. Im nächsten Schritt wurde die DNA-Konzentration auf 5 ng/µl eingestellt, wobei der Elutionspuffer des QIAquick® PCR Purification Kits nach Vorgabe der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland), als Verdünnungsmedium eingesetzt wurde. Abschließend wurde das Amplifikat zur Sequenzierung an die Firma Eurofins MWG Operon verschickt. Jedes Amplifikat wurde vorwärts und rückwärts sequenziert. Alle Ergebnis-Sequenzen wurden mittels BLAST (NCBI) identifiziert.

4 Ergebnisse

4.1 Beurteilung der vakuumverpackten Fleischproben

4.1.1 Übersicht über Anzahl und Herkunft der Proben

Es wurden 60 Rindfleischproben aus vier verschiedenen Kontinenten untersucht (Abbildung 7). Zwanzig Proben davon stammten aus Europa und 20 Proben aus Ozeanien. Achtzehn Rindfleischproben waren Importe aus Südamerika und zwei aus Nordamerika. Von den 60 Rindfleischproben waren 41 originalverpackt, 19 wurden in Deutschland zerlegt und neu abgepackt.

Die Lammfleischproben stammten aus Europa (20) und Ozeanien (13). Zwei irländische Lammfleischproben waren in Deutschland abgepackt worden, die restlichen Proben waren originalverpackt (Abbildung 7).

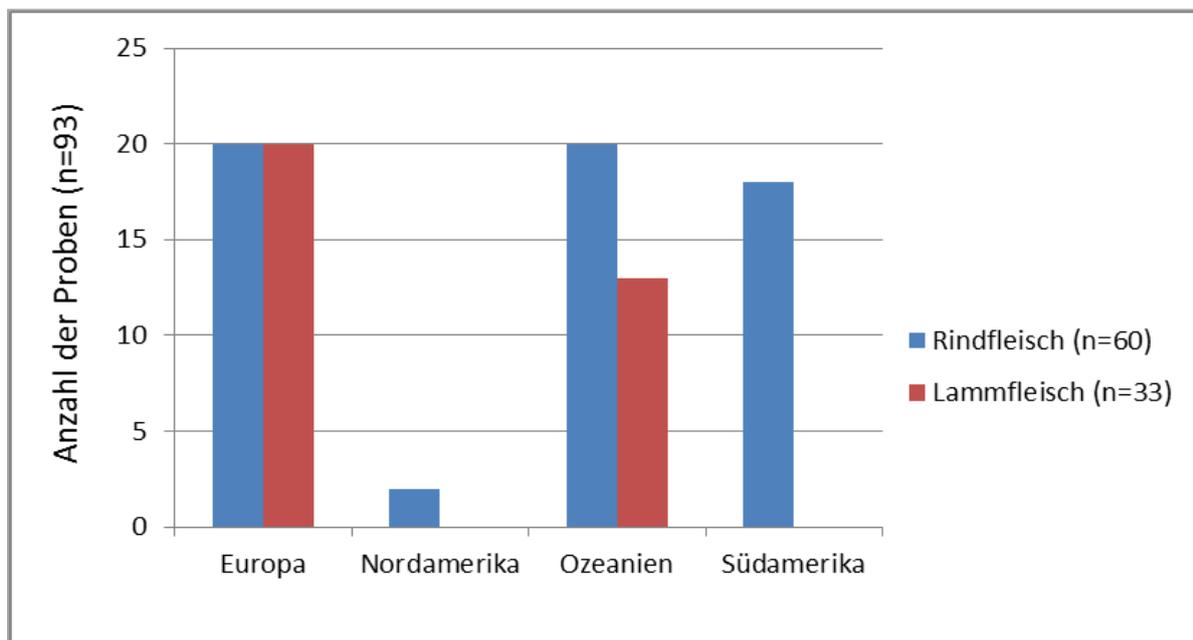


Abbildung 7: Herkunft der untersuchten Lamm- und Rindfleischproben

Zu den europäischen Herkunftsländern der Rindfleischproben zählten Deutschland (12), Frankreich (2), Irland (4) und die Niederlande (2). Als nordamerikanischer Vertreter wurden die USA (2) gewählt, während die südamerikanischen Rindfleischproben aus Argentinien (11), Brasilien (1) und Uruguay (6) bezogen wurden. Australien (10) repräsentierte zusammen mit Neuseeland (10) den Kontinent Ozeanien. Das europäische Lammfleisch

stammte aus Deutschland (9), Irland (6) und Wales (5). Aus Ozeanien waren auch bei dieser Probengruppe sowohl Neuseeland (10) als auch Australien (3) vertreten. Es wurden keine Lammfleischproben aus Nord- und Südamerika untersucht.

4.1.2 Visuelle Beurteilung der Vakuumverpackungen

Die Vakuumverpackungen der Fleischproben wurden visuell auf Undichtigkeiten untersucht. Alle 93 Verpackungen waren unversehrt und wiesen keine makroskopisch sichtbaren Schäden auf. Weitergehend wurden die Vakuumverpackungen mittels Pack Blowing Score (1-5) nach BOEREMA et al. (2007) beurteilt. Diese Beurteilung wurde am Tag des Probenansatzes vorgenommen.

Es ergaben sich Pack Blowing Scores von 0 bis 5. Bei den insgesamt 27 Proben, die dem Pack Blowing Score 0 zugeteilt wurden, lag die Verpackung eng am Fleisch an und es waren keine Gasblasen sichtbar (Abbildung 10). Bei Pack Blowing Score 1 (insgesamt 36 Proben) waren wenige sichtbare Gasblasen im Fleischtropfsaft sichtbar (Abbildung 11). Bei 23 Proben zeigte sich Pack Blowing Score 2, d.h. Aussehen wie bei Vakuumverlust mit der Bildung von großflächigen Hohlräumen zwischen der Folie und dem Fleisch (Abbildung 12). Pack Blowing Score 3 wurde bei insgesamt fünf Proben beobachtet, bei denen die Verpackungen offensichtlich aufgebläht und puffig waren (Abbildung 13). Eine Lammfleischprobe aus Wales zeigte als einzige von allen Fleischproben Pack Blowing Score 4. Bei ihr war die Verpackung auf ihre volle Größe aufgebläht, jedoch nicht straff gespannt. Die Fleischtropfsaftmenge dieser Probe betrug ca. 10 ml (Abbildung 14). Die Verpackung von einer neuseeländischen Rindfleischprobe war auf ihre volle Größe aufgegastr und prall gespannt. Diese Probe war der einzige Vertreter des Pack Blowing Scores 5 (Abbildung 15).

Siebenunddreißig der 60 Rindfleischproben konnten als unauffällig eingestuft werden (Score 0 und 1). Großflächige Hohlräume zwischen Folie und Fleisch zeigten sich bei 19 Proben (Score 2), während bei drei Rindfleischproben die Verpackung offensichtlich aufgebläht und puffig war (Score 3). Bei einer neuseeländischen Rindfleischprobe war die Verpackung auf ihre volle Größe aufgebläht und prall gespannt (Score 5). Score 4 war unter den Rindfleischproben nicht vertreten (Tabelle 20).

Von den 33 Lammfleischproben konnten 26 als unauffällig (Score 0 und 1) eingestuft werden. Vier der Lammfleischproben sahen aus wie bei Vakuumverlust mit geringgradigem Luftschluss (Score 2), während bei zwei Lammfleischproben (Wales und Neuseeland) die

Verpackung aufgebläht und puffig war (Score 3). Die Verpackung von einer walisischen Lammfleischprobe war offensichtlich auf ihre volle Größe aufgebläht, jedoch ohne straff gespannt zu sein (Score 4). Keine der Lammfleischproben zeigte einen Score von 5 (Tabelle 21).

Aus 26 der 60 Rindfleisch- und aus zehn der 33 Lammfleischproben wurden Hefen isoliert. Alle diese Proben wurden in die Scores 0 bis 3 eingeteilt (Abbildung 8, Abbildung 9).

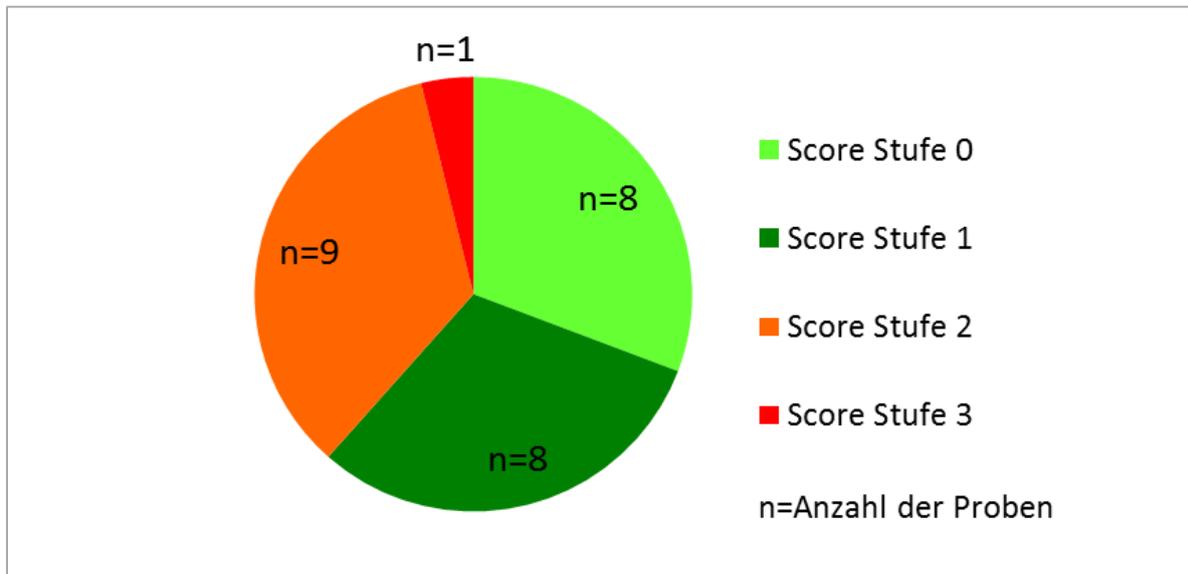


Abbildung 8: Beurteilung des Pack Blowing Scores nach BOEREMA et al. (2007) der Rindfleischproben, aus denen Hefen isoliert wurden

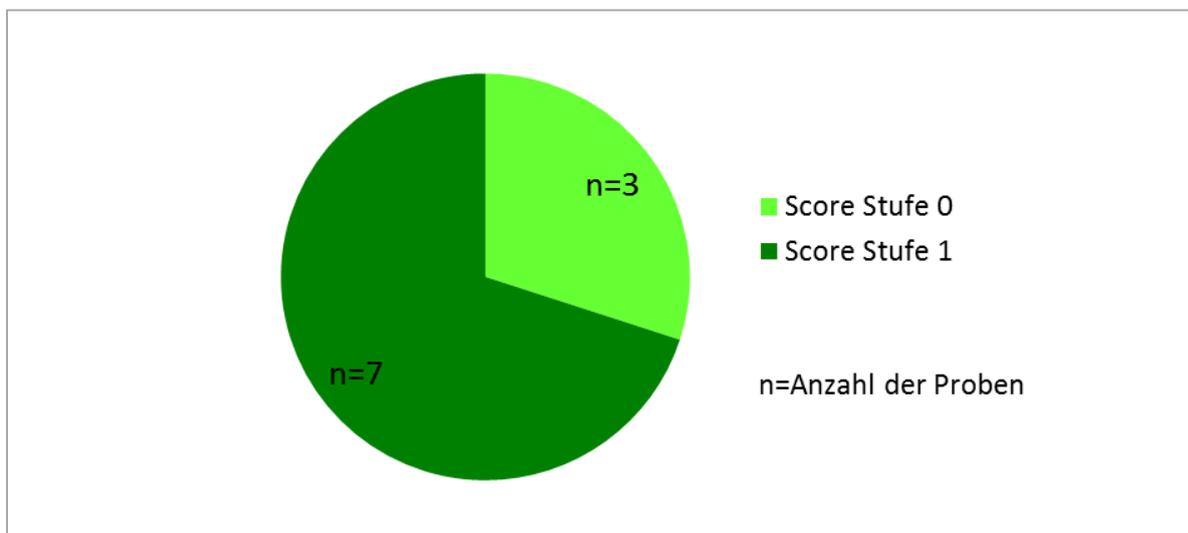


Abbildung 9: Beurteilung des Pack Blowing Scores nach BOEREMA et al. (2007) der Lammfleischproben, aus denen Hefen isoliert wurden



Abbildung 10: Australische Rindfleischprobe mit einem Pack Blowing Score 0 (A); vergrößerter Ausschnitt (B)

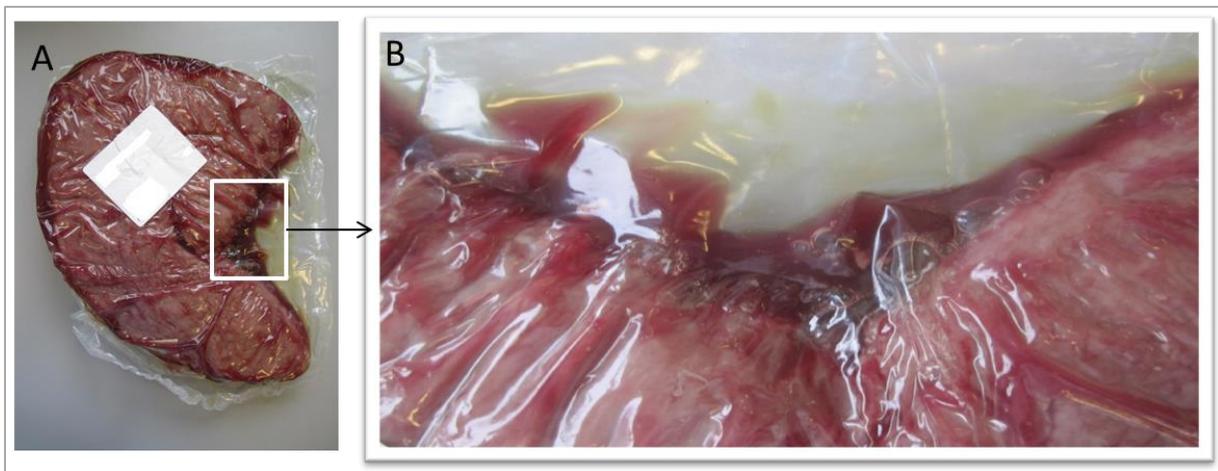


Abbildung 11: Französische Rindfleischprobe mit einem Pack Blowing Score 1 (A); vergrößerter Ausschnitt; wenige Gasblasen im Fleischtropfsaft sichtbar (B)

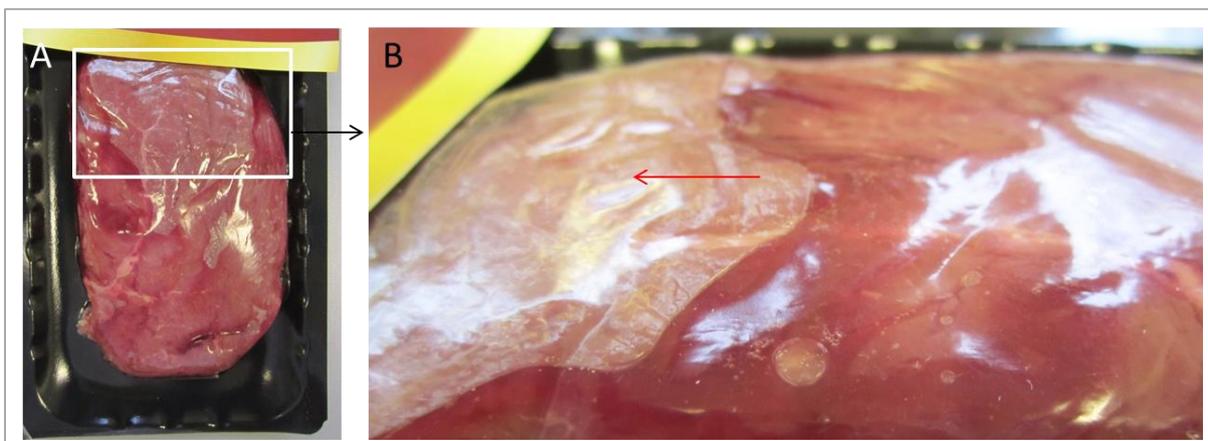


Abbildung 12: Argentinische Rindfleischprobe mit Pack Blowing Score 2 (A); Nahaufnahme des großflächigen Hohlraumes zwischen Folie und Fleisch (B)

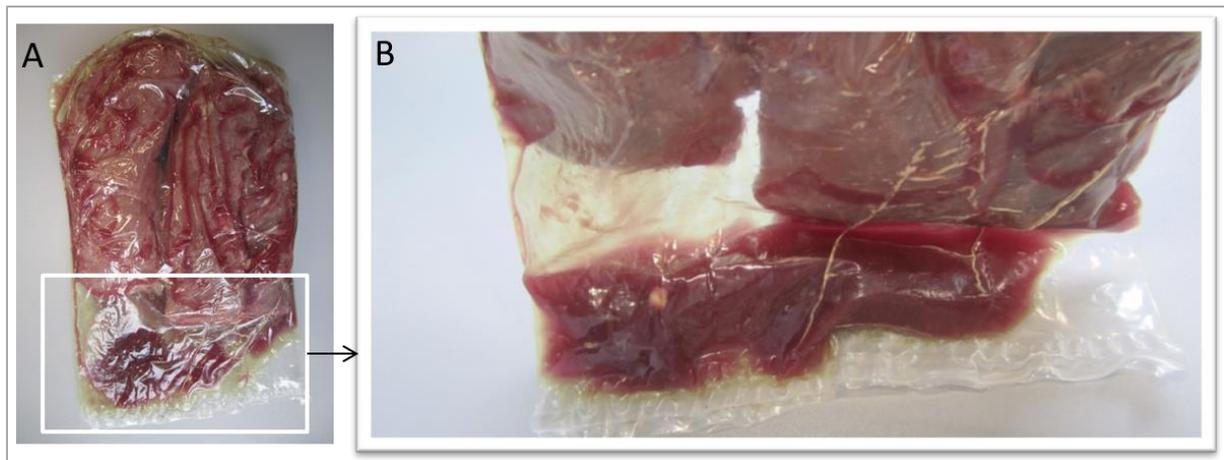


Abbildung 13: Walisische Lammfleischprobe mit Pack Blowing Score 3 (A); Nahaufnahme des Hohlraumes zwischen Folie und Fleisch sowie der großen Fleischtropfsaftmenge (B)



Abbildung 14: Walisische Lammfleischprobe mit Pack Blowing Score 4 (A); Seitliche Nahaufnahme der nahezu vollständig aufgeblähten Verpackung sowie der großen Fleischtropfsaftmenge (B)

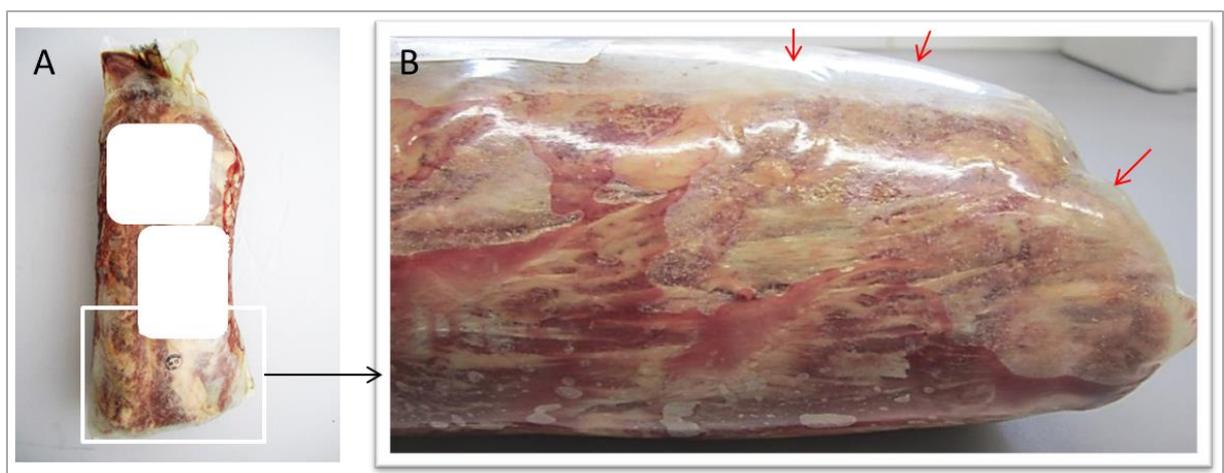


Abbildung 15: Neuseeländische Rindfleischprobe mit Pack Blowing Score 5 (A); Seitliche Nahaufnahme der prall aufgegastrn Verpackung (B)

Tabelle 20: Beurteilungsergebnisse für die Rindfleischproben nach dem Pack Blowing Score von BOEREMA et al. (2007)

Herkunft	Anzahl der Proben in der jeweiligen Score Stufe (0-5)					
	0	1	2	3	4	5
Europa						
Deutschland	4	5	3	0	0	0
Frankreich	0	2	0	0	0	0
Irland	4	0	0	0	0	0
Niederlande	0	1	1	0	0	0
Nordamerika						
USA	0	2	0	0	0	0
Ozeanien						
Australien	7	2	1	0	0	0
Neuseeland	1	2	3	3	0	1
Südamerika						
Argentinien	0	5	6	0	0	0
Brasilien	0	0	1	0	0	0
Uruguay	1	1	4	0	0	0
Gesamt	17	20	19	3	0	1

Tabelle 21: Beurteilungsergebnisse für die Lammfleischproben nach dem Pack Blowing Score von BOEREMA et al. (2007)

Herkunft	Anzahl der Proben in der jeweiligen Score Stufe (0-5)					
	0	1	2	3	4	5
Europa						
Deutschland	2	7	0	0	0	0
Irland	2	3	1	0	0	0
Wales	1	1	1	1	1	0
Ozeanien						
Australien	0	2	1	0	0	0
Neuseeland	5	3	1	1	0	0
Gesamt	10	16	4	2	1	0

4.1.3 Sensorische Untersuchung

Die sensorische Untersuchung umfasste die Bewertung des Geruchs, der Farbe und der Konsistenz der Fleischproben. Der Geruch wurde unmittelbar nach dem Öffnen der Vakuumverpackung beurteilt und in Punkten angegeben (Tabelle 22). Fünfundvierzig der 60 Rindfleischproben wiesen einen einwandfreien, frischen und produktspezifischen Geruch auf (Skala 1). Sechs rochen leicht säuerlich, aber durchaus angenehm (Skala 2), wohingegen der Geruch von sechs Rindfleischproben als sauer, leicht unappetitlich und „nicht frisch“ (Skala 3) charakterisiert wurde. Verdorben, muffig bzw. schlecht rochen drei Proben aus Südamerika (Skala 4) (Tabelle 22).

Von den 33 Lammfleischproben wiesen 20 einen einwandfreien und produkttypischen Geruch auf. Fünf zeigten eine leicht säuerlich Note und wurden der Skala 2 zugeteilt, während fünf als sauer, leicht unappetitlich und nicht frisch beschrieben wurden (Skala 3). Drei südamerikanische der insgesamt 33 Lammfleischproben wiesen einen stark unangenehmen, muffigen bzw. verdorbenen Geruch auf (Skala 4) (Tabelle 23).

Tabelle 22: Beurteilung des Geruchs der Rindfleischproben anhand einer Punkteskala

Einteilung der Fleischproben anhand der Punkteverteilung (Tabelle 10)				
	1 (frisch, fleischig, produktspezifisch, mit leicht säuerlicher Note)	2 (säuerlich, jedoch nicht unangenehm)	3 (sauer, leicht unappetitlich, nicht frisch)	4 (muffig, verdorben, stark unappetitlich)
Herkunft	Anzahl der Proben in jeder Punkteskala			
Europa				
Deutschland	10	0	2	0
Frankreich	2	0	0	0
Irland	4	0	0	0
Niederlande	2	0	0	0
Nordamerika				
USA	1	1	0	0
Ozeanien				
Australien	10	0	0	0
Neuseeland	9	0	1	0
Südamerika				
Argentinien	5	3	2	1
Brasilien	0	0	1	0
Uruguay	2	2	0	2
Gesamt	45	6	6	3

Tabelle 23: Beurteilung des Geruchs der Lammfleischproben anhand einer Punkteskala

Einteilung der Fleischproben anhand der Punkteverteilung (Tabelle 10)				
Herkunft	1	2	3	4
	(frisch, fleischig, produktspezifisch, mit leicht säuerlicher Note)	(säuerlich, jedoch nicht unangenehm)	(sauer, leicht unappetitlich, nicht frisch)	(muffig, verdorben, stark unappetitlich)
Anzahl der Proben in jeder Punkteskala				
Europa				
Deutschland	5	1	1	2
Irland	4	2	0	0
Wales	2	1	2	0
Ozeanien				
Australien	0	1	1	1
Neuseeland	9	0	1	0
Gesamt	20	5	5	3

Die Farbe des Fleisches wurde kurz nach dem Öffnen der Verpackung visuell nach ihrer Intensität beurteilt. Alle Fleischproben wiesen eine rote Farbe auf, wobei die Rindfleischproben ein intensiveres Rot als die Lammfleischproben zeigten.

Zur Ermittlung der Konsistenz des Fleisches wurde das Fleisch mithilfe einer sterilen Pinzette gedehnt und eingedrückt (Tabelle 24). Der Großteil der Rindfleischproben (47) wies eine produkttypische, fest-elastische Konsistenz auf. Dreizehn der 60 Rindfleischproben zeigten eine eher weiche Beschaffenheit. Bezüglich der Saftigkeit erschienen 57 Proben saftig und die restlichen drei eher trocken bzw. „brüchig“.

Bei den Lammfleischproben waren 17 Proben von fest-elastischer und 16 Proben von eher weicher Konsistenz. Bezüglich der Saftigkeit wurden bis auf vier Proben alle als saftig charakterisiert (Tabelle 25).

Tabelle 24: Beurteilung der Konsistenz des Rindfleisches unter Berücksichtigung der subjektiven Elastizität und der Saftigkeit

Herkunft	Festigkeit		Saftigkeit	
	Fest, elastisch	weich	saftig	trocken
Europa				
Deutschland	10	2	12	0
Frankreich	2	0	2	0
Irland	3	1	4	0
Niederlande	2	0	2	0
Nordamerika				
USA	2	0	1	1
Ozeanien				
Australien	9	1	10	0
Neuseeland	9	1	10	0
Südamerika				
Argentinien	5	6	11	0
Brasilien	1	0	1	0
Uruguay	4	2	4	2
Gesamt	47	13	57	3

Tabelle 25: Beurteilung der Konsistenz des Lammfleisches unter Berücksichtigung der subjektiven Elastizität und der Saftigkeit

Herkunft	Festigkeit		Saftigkeit	
	Fest, elastisch	weich	saftig	trocken
Europa				
Deutschland	3	6	7	2
Irland	4	2	6	0
Wales	4	1	3	2
Ozeanien				
Australien	1	2	3	0
Neuseeland	5	5	10	0
Gesamt	17	16	29	4

4.1.4 Lichtmikroskopische Untersuchung

Der Fleischtropfsaft aller 93 Fleischproben wurde bakterioskopisch untersucht. Sowohl bei den Nativ-Präparaten als auch bei den Gram-Präparaten war bei den meisten Fleischproben eine Mischmikrobiota aus Stäbchen und Kokken zu sehen. Insgesamt wurden bei neun

Rindfleischproben (Tabelle 26) und bei 15 Lammfleischproben die Anwesenheit von Hefen beobachtet (Tabelle 27). Bei zwei Rindfleischproben und drei Lammfleischproben wurden Hefen sowohl bei den Nativ- als auch bei den Gram-Präparaten gesehen. Bei keiner Rindfleischprobe und bei sieben Lammfleischproben wurden Hefen nur bei den Nativ-Präparaten beobachtet, jedoch nicht bei den entsprechenden Gram-Präparaten. Umgekehrt wurden bei sieben Rindfleischproben (Tabelle 26) und fünf Lammfleischproben (Tabelle 27) Hefen bei den Gram-Präparaten beobachtet, aber nicht bei den dazugehörigen Nativ-Präparaten.

Tabelle 26: Anzahl der in der lichtmikroskopischen Untersuchung Hefe-positiver Rindfleisch-tropfsaftproben (n)

Herkunft und Probenanzahl (n)	Anzahl der Hefe-positiven Tropfsaftproben (n)	Hefe-positive Nativ-Präparate	Hefe-positive Gram-Präparate
Deutschland (12)	0	0	0
Frankreich (2)	0	0	0
Irland (4)	0	0	0
Niederlande (2)	1	1	1
USA	1	0	1
Australien (10)	4	0	4
Neuseeland (10)	1	0	1
Argentinien (11)	1	1	1
Brasilien (1)	0	0	0
Uruguay (6)	1	0	1
Gesamt (60)	9	2	9

n=Anzahl

Tabelle 27: Anzahl der in der lichtmikroskopischen Untersuchung Hefe-positiver Lammfleischtropfsaftproben (n)

Herkunft und Probenanzahl (n)	Anzahl der Hefe-positiven Tropfsaftproben	Hefe-positive Nativ-Präparate	Hefe-positive Gram-Präparate
Deutschland (9)	5	5	0
Irland (6)	4	4	2
Wales (5)	2	1	2
Australien (3)	2	0	2
Neuseeland (10)	2	0	2
Gesamt (33)	15	10	8

n=Anzahl

In den meisten Fällen, in denen Hefezellen in den Nativ- oder Gram-Präparaten des Fleischtropfsaftes beobachtet wurden, handelte es sich um wenige oder sogar nur eine Hefezelle im gesamten Präparat (Abbildung 16, A). Bei zwei Rindfleischproben wurde eine ausgeprägte Anwesenheit von Hefen in den Nativ-Präparaten des Fleischtropfsaftes beobachtet (Abbildung 16, B).

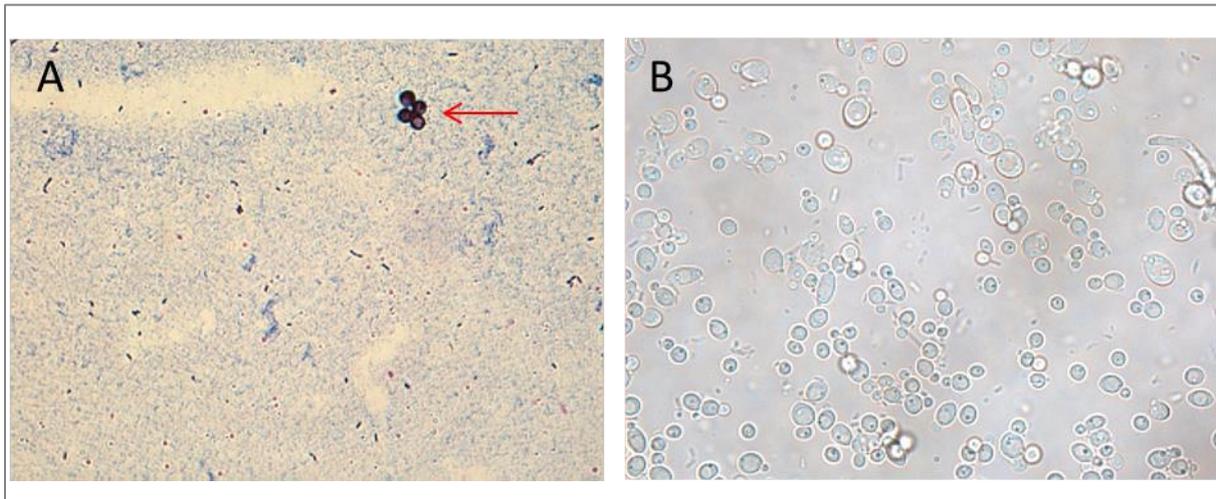


Abbildung 16: (A) Hefezellen (Pfeil) im Fleischtropfsaft einer uruguayischen (Gram-Präparat, 1000fache Vergrößerung) und (B) einer niederländischen Rindfleischprobe (Nativ-Präparat, 1000fache Vergrößerung)

4.1.5 Mikrobiologische Untersuchung

Auswertung der MEA⁺-Agarplatten

Für die kulturelle Untersuchung der Hefekeimzahlen wurden, wie im Methoden-Teil beschrieben, die MEA⁺- sowie die GYP-Agarplatten verwendet. Zur Bestimmung der Hefekeimzahlen wurden die zwei Verdünnungsstufen 10^{-2} und 10^{-3} der MEA⁺-Agarplatten ausgewertet. In sämtlichen Fällen, in denen Rasenwachstum beobachtet wurde, wurde das Ergebnis als $>10^3$ KbE/g angegeben.

Die GYP-Agarplatten wurden parallel nach demselben Schema ausgewertet. Bei manchen Proben wurde ein Hefe-Wachstum lediglich auf diesen Agarplatten festgestellt. In diesen Fällen wurden für die Isolierung von Hefen auf die auf den GYP-Agarplatten gewachsenen Hefe-Kolonien zurückgegriffen.

Rindfleisch

Die meisten Rindfleischproben (17 der 20 amerikanischen, 18 der 20 europäischen und 14 der 20 ozeanischen Proben) wiesen Hefekeimzahlen zwischen $<10^2$ KbE/g und dem Bereich 10^3 KbE/g ($1,0 \times 10^3$ bis $9,9 \times 10^3$ KbE/g) auf (Abbildung 17). Im Bereich 10^2 KbE/g ($1,0 \times 10^2$ bis $9,9 \times 10^2$ KbE/g) befanden sich die Ergebnisse von insgesamt zwölf der 60 Rindfleischproben, und 14 Proben befanden sich mit ihren Werten im Bereich 10^3 KbE/g ($1,0 \times 10^3$ bis $9,9 \times 10^3$ KbE/g) (Abbildung 17). Insgesamt sechs von 60 Proben (drei irländische, zwei australische und eine US-amerikanische Probe) lieferten Werte im Bereich $>10^3$ KbE/g. Bei neun Proben (vier neuseeländische, zwei deutsche und jeweils eine aus den Ländern Frankreich, Niederlande und Argentinien) befanden sich die Hefekeimzahlen im Bereich 10^4 KbE/g ($1,0 \times 10^4$ bis $9,9 \times 10^4$ KbE/g) oder darüber.

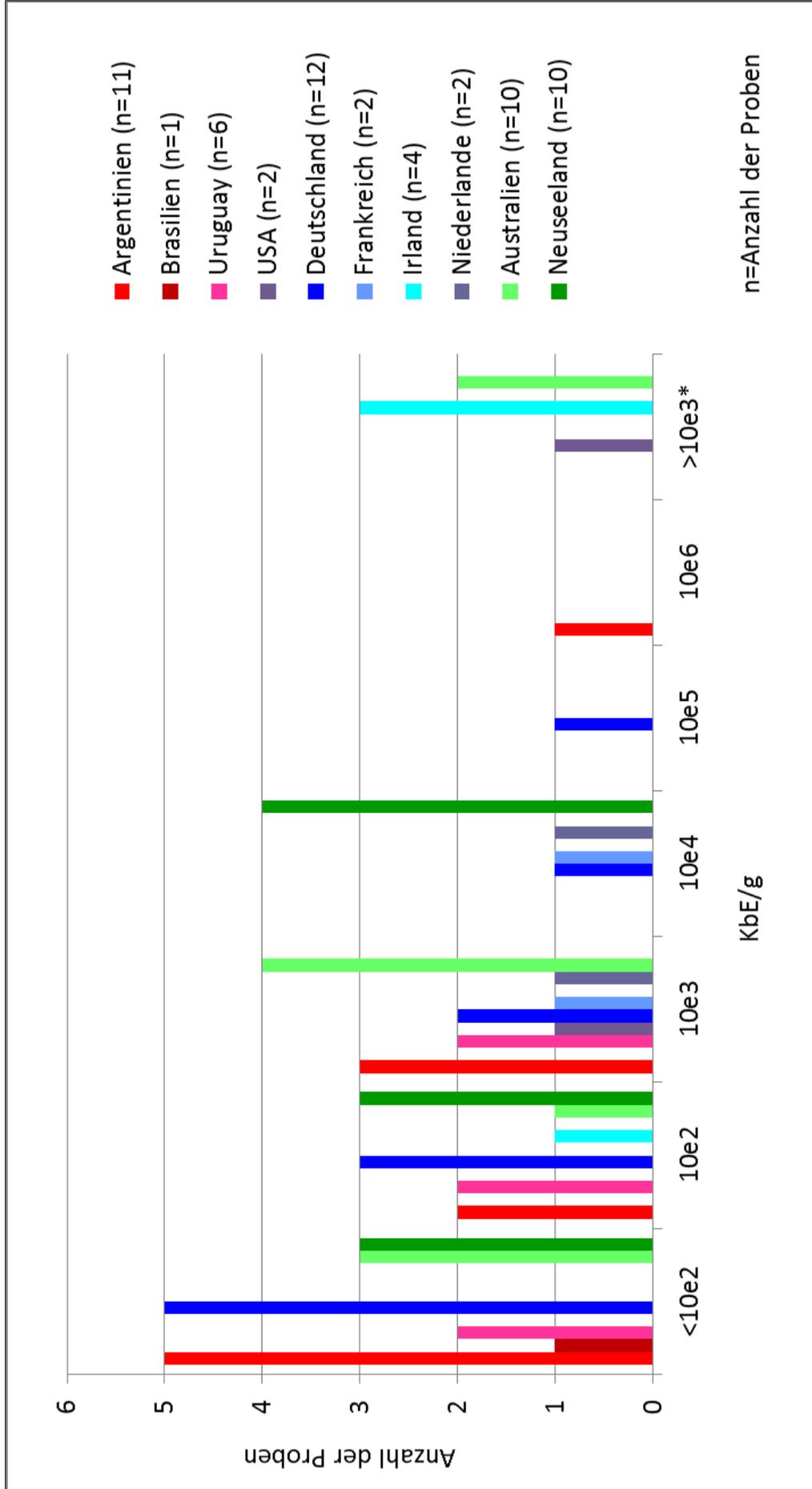


Abbildung 17: Übersicht über die Verteilung der Hefekeimzahlen bei den verschiedenen Rindfleischproben, *=alle Hefeplatten mit Rasenwachstum bzw. schleimigen, nicht zählbaren Hefen

Lammfleisch

Die Lammfleischproben waren mit Hefekeimzahlen in einem Bereich von $1,0 \times 10^2$ bis $7,4 \times 10^3$ KbE/g belastet. Bei 14 der 33 Lammfleischproben wurden Hefekeimzahlen im Bereich von $<10^2$ KbE/g ermittelt, acht Proben zeigten leicht höhere Hefekeimzahlen ($1,0 \times 10^2$ bis $9,9 \times 10^2$ KbE/g). Bei elf Proben wurden Hefekeimzahlen im Bereich 10^3 KbE/g ($1,0 \times 10^3$ bis $9,9 \times 10^3$) (Abbildung 18) festgestellt.

Insgesamt zeigten die Hefekeimzahlen, dass die Rindfleischproben etwas stärker mit psychrophilen Hefen belastet waren, als die Lammfleischproben.

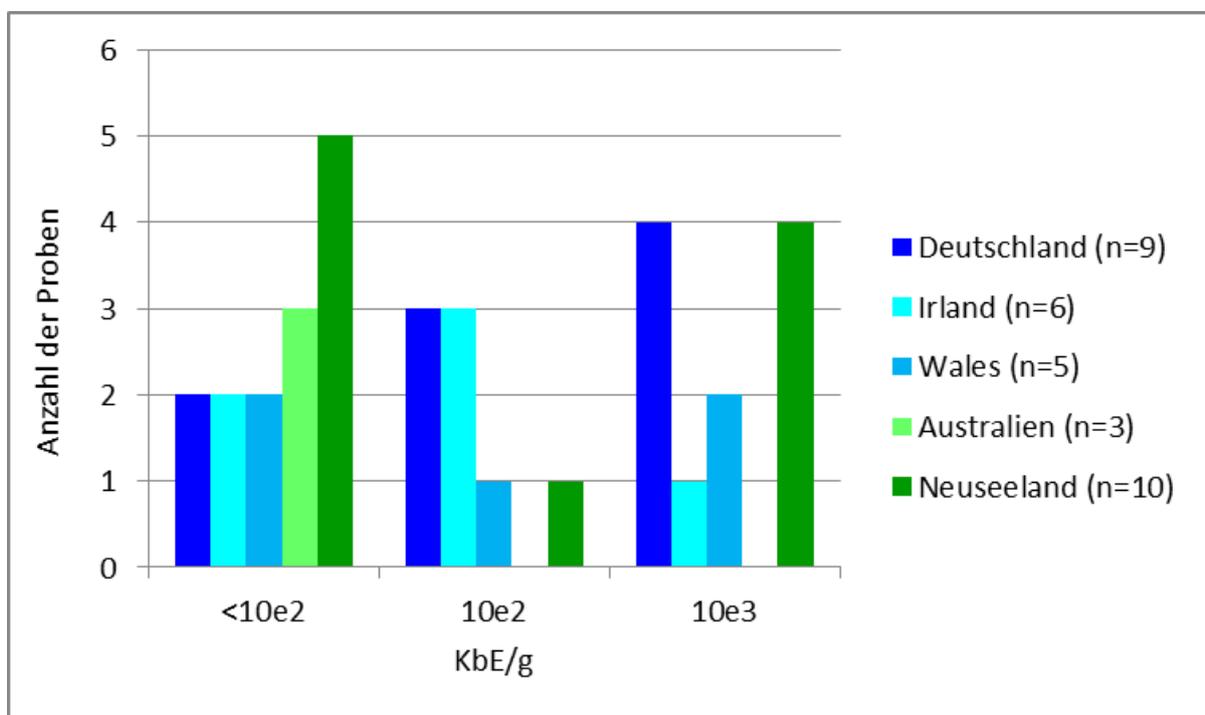


Abbildung 18: Übersicht über die Verteilung der Hefekeimzahlen bei den verschiedenen Lammfleischproben

Aerobe und anaerobe mesophile Keimzahl - Rindfleisch

Die Rindfleischproben waren mit aeroben mesophilen Keimzahlen in einem Bereich von 10^4 bis $>10^8$ KbE/g belastet (Abbildung 19). Dabei wurden bei den europäischen Rindfleischproben im Vergleich zu den Rindfleischproben der zwei anderen Kontinente tendenziell niedrigere aerobe mesophile Keimzahlen ermittelt. Im Gegensatz dazu wurden bei fast allen neuseeländischen Rindfleischproben (18 von 20) Keimzahlen im Bereich von 10^7 bis $>10^8$ KbE/g nachgewiesen. Von den 20 Rindfleischproben aus Europa wurden beim Großteil der Proben (15 von 20) Keimzahlen im Bereich von 10^6 KbE/g ($1,0 \times 10^6$ bis $9,9 \times 10^6$)

KbE) bis 10^7 KbE/g ($1,0 \times 10^7$ bis $9,9 \times 10^7$ KbE/g) ermittelt. Die aerobe mesophile Keimzahl der amerikanischen Proben (20) lag zwischen 10^5 und $>10^8$ KbE/g. Fast alle Proben (19 von 20) verteilten sich dabei relativ gleichmäßig über die Bereiche 10^6 KbE/g bis $>10^8$ KbE/g. Der Großteil der ozeanischen Rindfleischproben (16 von 20) lag bei 10^7 KbE/g.

Die anaeroben mesophilen Keimzahlen der Rindfleischproben lagen weitgehend in der Größenordnung der entsprechenden aeroben Keimzahlen (Abbildung 20). Beim Großteil der europäischen Rindfleischproben (13 von 20) wurden, ebenso wie beim Großteil der ozeanischen Rindfleischproben (15 von 20), anaerobe mesophile Keimzahlen im Bereich von 10^6 KbE/g bis 10^7 KbE/g festgestellt.

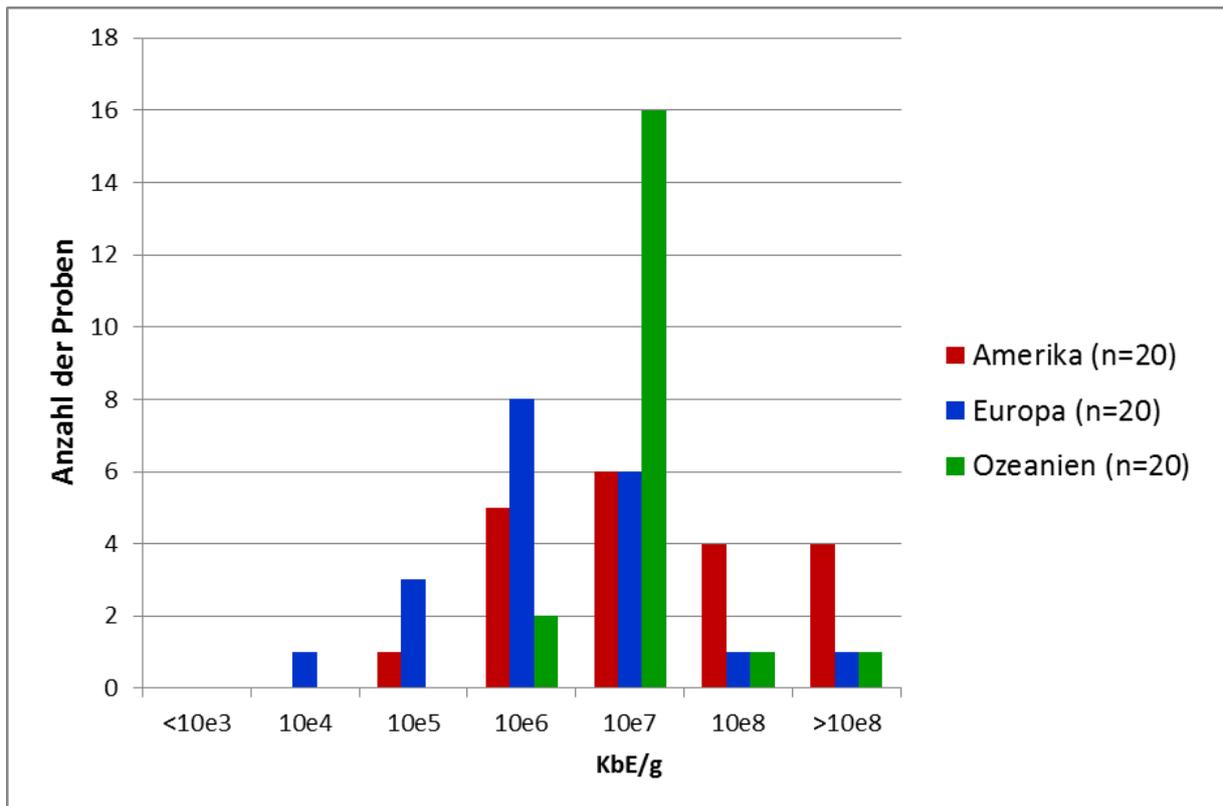


Abbildung 19: Übersicht über die aeroben mesophilen Keimzahlen bei den verschiedenen Rindfleischproben

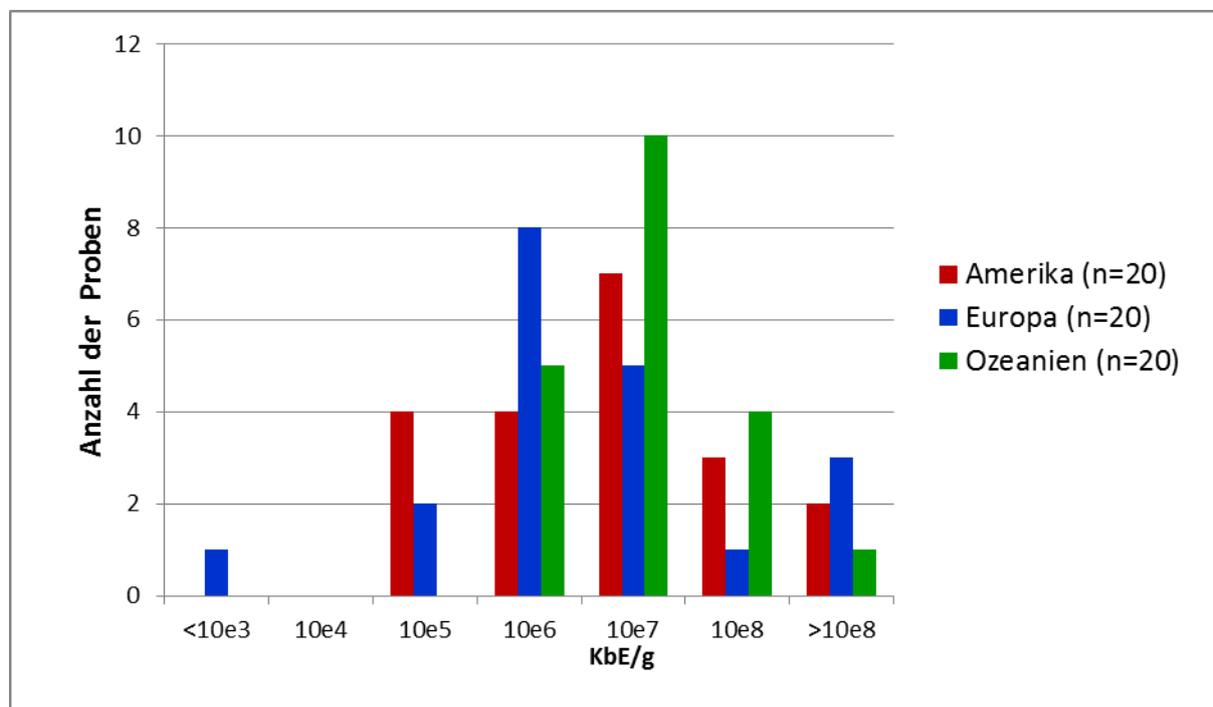


Abbildung 20: Übersicht über die anaeroben mesophilen Keimzahlen bei den verschiedenen Rindfleischproben

Aerobe und anaerobe mesophile Keimzahl - Lammfleisch

Die Lammfleischproben waren mit aeroben mesophilen Keimzahlen in einem Bereich von $<10^4$ KbE/g bis $>10^8$ KbE/g belastet. Sowohl bei der Mehrheit der europäischen Lammfleischproben (15 von 20) als auch bei der der ozeanischen Lammfleischproben (sieben von 13) wurden aerobe mesophile Keimzahlen im Bereich von 10^6 bis 10^7 KbE/g ermittelt. Bei vier ozeanischen Proben wurden Keimzahlen im Bereich von 10^8 KbE/g festgestellt (Abbildung 21). Insgesamt wurden bei den ozeanischen Lammfleischproben im Vergleich zu den europäischen Lammfleischproben höhere aerobe mesophile Keimzahlen nachgewiesen (Abbildung 21).

Ähnlich verhielt es sich mit den anaeroben mesophilen Keimzahlen (Abbildung 22).

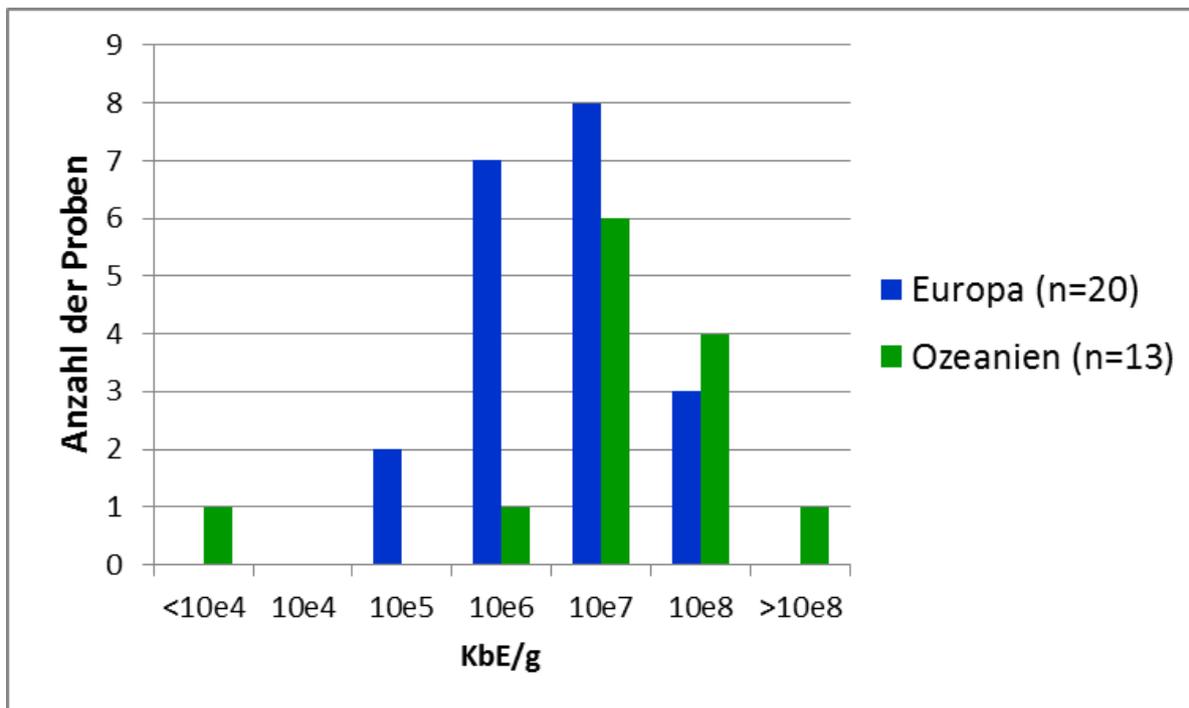


Abbildung 21: Übersicht über die aeroben mesophilen Keimzahlen bei den verschiedenen Lammfleischproben

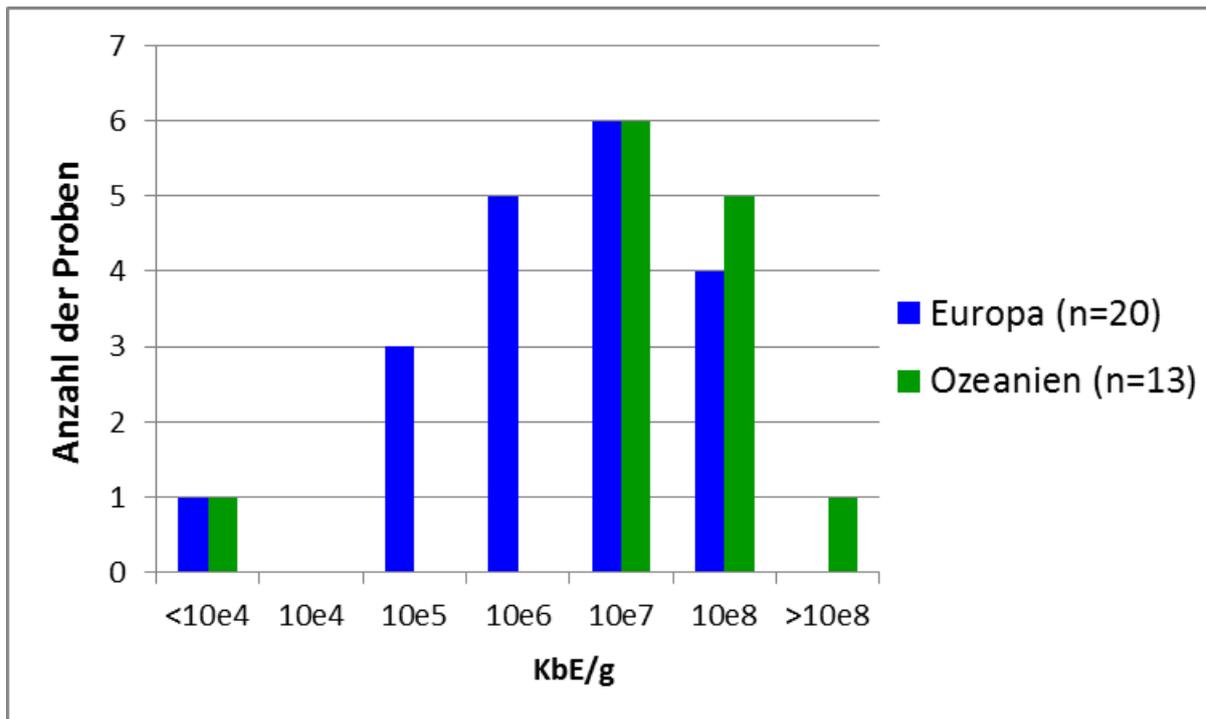


Abbildung 22: Übersicht über die anaeroben mesophilen Keimzahlen bei den verschiedenen Lammfleischproben

Aerobe und anaerobe *Enterobacteriaceae* - Rindfleisch

Der Großteil der europäischen Rindfleischproben (17 von 20) war mit aerob wachsenden *Enterobacteriaceae* Keimzahlen unter dem bzw. im Bereich von 10^5 KbE/g ($<10^3$ bis $9,9 \times 10^5$ KbE/g) belastet. Beim Großteil der ozeanischen Proben (16 von 20) wurden Keimzahlen im Bereich von 10^5 KbE/g oder darüber festgestellt. Die Mehrheit der amerikanischen Proben (15 von 20) wies *Enterobacteriaceae* Keimzahlen im Bereich von 10^3 bis 10^5 KbE/g auf (Abbildung 23).

Die Ergebnisse der anaerob wachsenden *Enterobacteriaceae* Keimzahlen zeigten Ähnlichkeiten zu den Ergebnissen der Keimzahlen der aerob wachsenden *Enterobacteriaceae*. Bei allen europäischen und amerikanischen Rindfleischproben wurden Keimzahlen der anaerob wachsenden *Enterobacteriaceae* unter oder bis 10^6 KbE/g ($<10^3$ bis $9,9 \times 10^6$ KbE/g) festgestellt. Im Vergleich dazu wurden bei allen ozeanischen Rindfleischproben Keimzahlen im Bereich von 10^5 KbE/g oder darüber ($1,0 \times 10^5$ bis $>10^8$ KbE/g) nachgewiesen (Abbildung 24).

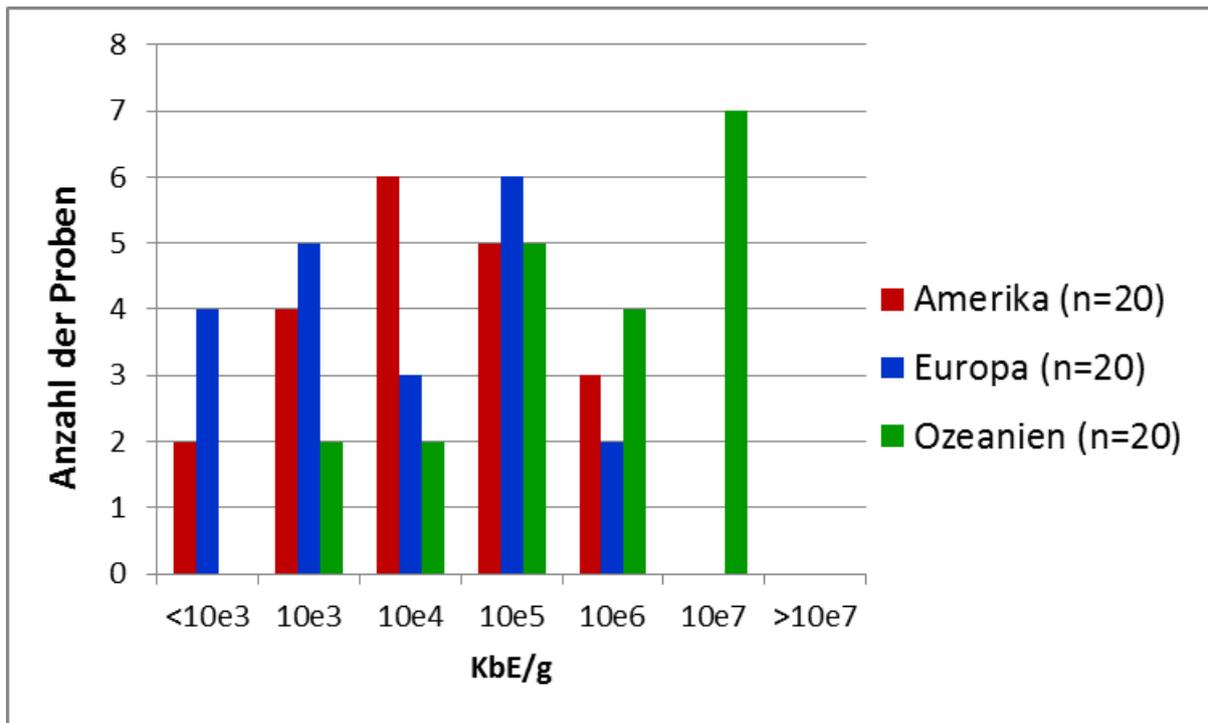


Abbildung 23: Übersicht über die aeroben *Enterobacteriaceae* Keimzahlen bei den verschiedenen Rindfleischproben

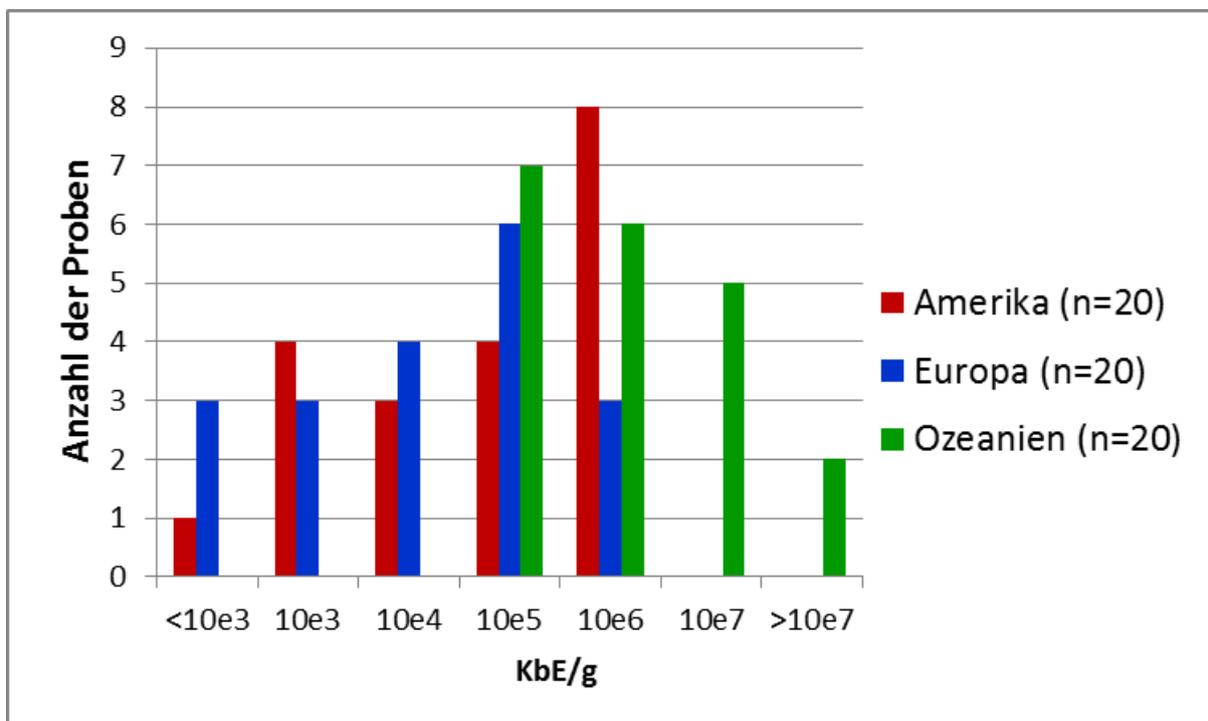


Abbildung 24: Übersicht über die anaeroben *Enterobacteriaceae* Keimzahlen bei den verschiedenen Rindfleischproben

Aerobe und anaerobe *Enterobacteriaceae* - Lammfleisch

Bei den Lammfleischproben wurden Keimzahlen der aerob wachsenden *Enterobacteriaceae* im Bereich von $<10^3$ bis $>10^8$ KbE/g (Abbildung 25) ermittelt. Die Ergebnisse der meisten europäischen Proben (16 von 19) und fast aller ozeanischen Proben (elf von 13) zeigten Keimzahlen im Bereich von $<10^3$ bis 10^5 KbE/g. Im Vergleich zu den ozeanischen wurden bei den europäischen Lammfleischproben tendenziell höhere Keimzahlen der aerob wachsenden *Enterobacteriaceae* nachgewiesen.

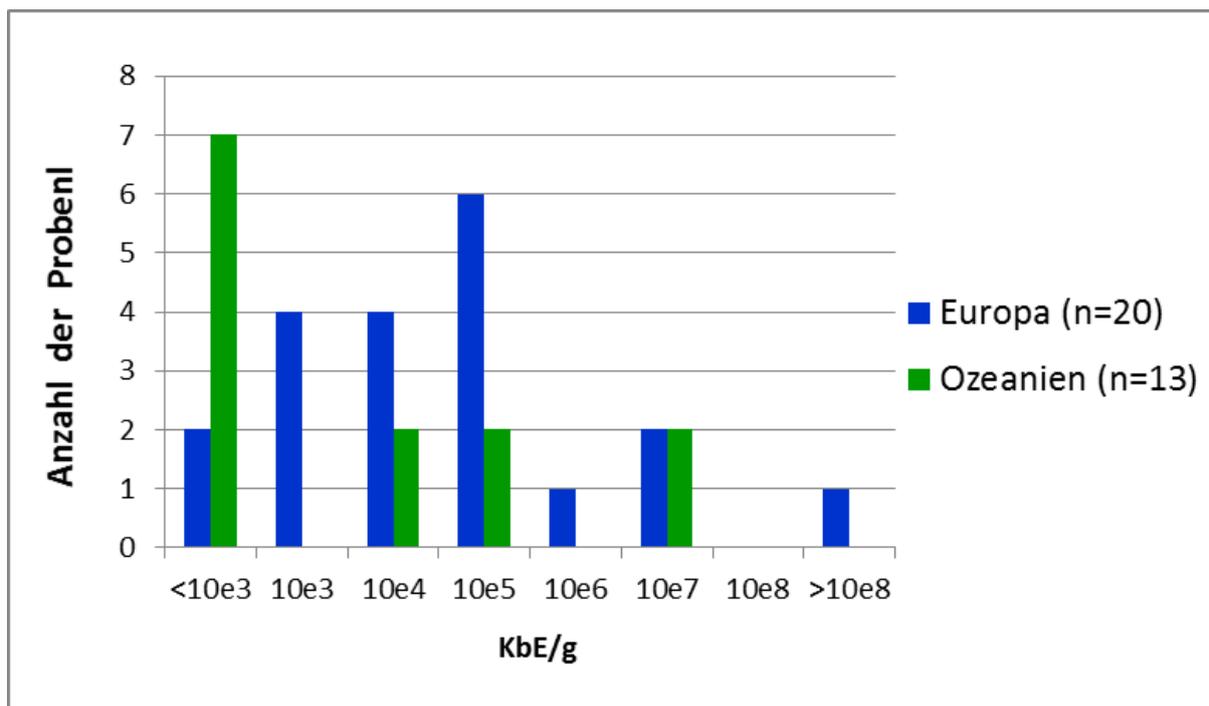


Abbildung 25: Übersicht über die aeroben *Enterobacteriaceae* Keimzahlen bei den verschiedenen Lammfleischproben

Ähnlich verhielt es sich mit den Ergebnissen der anaerob bebrüteten *Enterobacteriaceae*. Die Lammfleischproben waren mit Keimzahlen der anaerob wachsenden *Enterobacteriaceae* in einem Bereich von $<10^3$ bis $>10^8$ KbE/g belastet (Abbildung 26). Die europäischen Proben zeigten eine im Vergleich zu den ozeanischen Proben relativ hohe Keimzahlbelastung. Während beim Großteil der ozeanischen Lammfleischproben (neun von 13) Keimzahlen unter oder im Bereich von 10^5 KbE/g ($<10^3$ bis $9,9 \times 10^5$ KbE/g) festgestellt wurden, wurden bei der Mehrheit der europäischen Proben (zwölf von 20) höhere Keimzahlen im Bereich von 10^5 bis 10^7 KbE/g nachgewiesen.

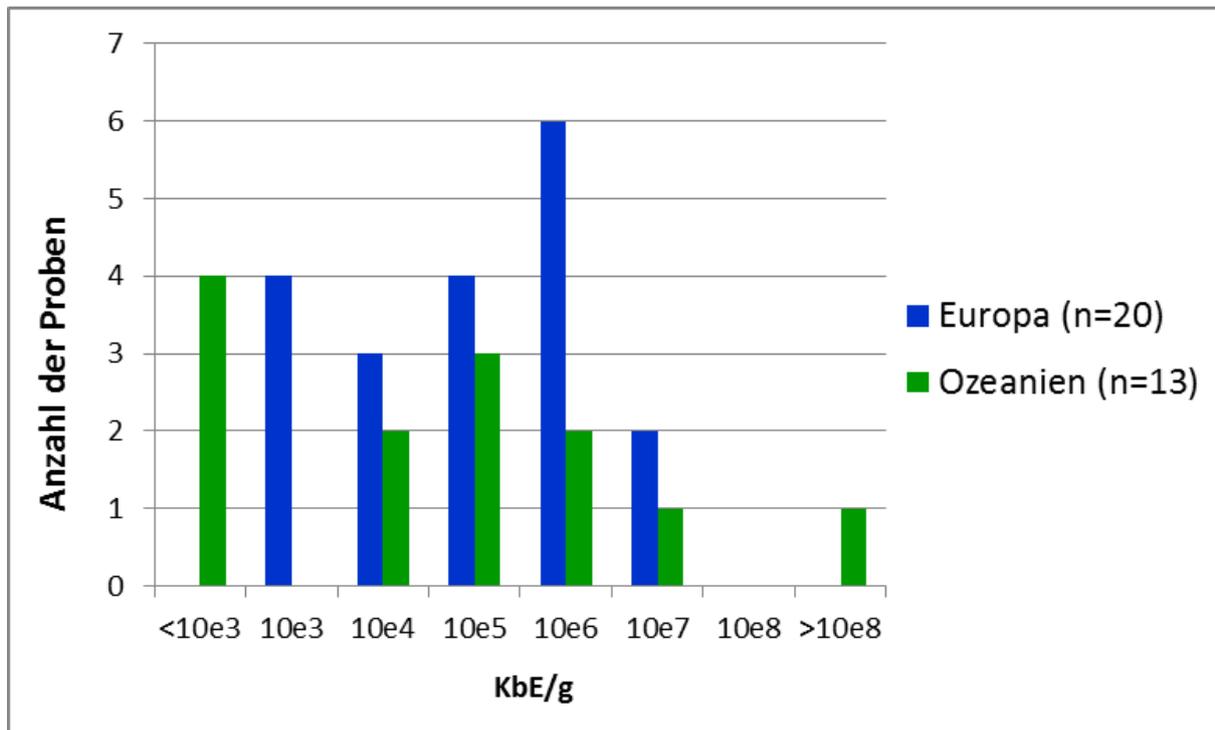


Abbildung 26: Übersicht über die anaeroben *Enterobacteriaceae* Keimzahlen bei den verschiedenen Lammfleischproben

Milchsäurebakterien - Rindfleisch

Insgesamt waren die Rindfleischproben relativ stark mit Keimzahlen der Milchsäurebakterien belastet. Es wurden Keimzahlen im Bereich von $<10^3$ bis $>10^8$ KbE/g ermittelt. Bei den amerikanischen Rindfleischproben wurden hauptsächlich Keimzahlen im Bereich von 10^5 bis 10^8 KbE/g festgestellt. Mit Ausnahme von vier Proben, bei denen Keimzahlen im Bereich von $>10^8$ KbE/g ermittelt wurden, wurden bei den europäischen Rindfleischproben Keimzahlen bis zum Bereich 10^6 KbE/g nachgewiesen. Bezüglich der ozeanischen Rindfleischproben wurden bei der Mehrheit der Rindfleischproben (14 von 20) Milchsäurebakterien Keimzahlen im Bereich von 10^6 bis 10^8 KbE/g festgestellt (Abbildung 27).

Milchsäurebakterien - Lammfleisch

Bezüglich der Keimzahlbelastung mit Milchsäurebakterien ließen sich deutliche Unterschiede zwischen den europäischen und neuseeländischen Lammfleischproben erkennen. Bei der Mehrheit der ozeanischen Proben (acht von 13) wurden Keimzahlen unter dem Bereich von 10^4 KbE/g festgestellt (Abbildung 28). Im Gegensatz dazu wurde beim Großteil der europäischen Lammfleischproben (16 von 20) Keimzahlen im Bereich von 10^5 bis 10^7 KbE/g ermittelt.

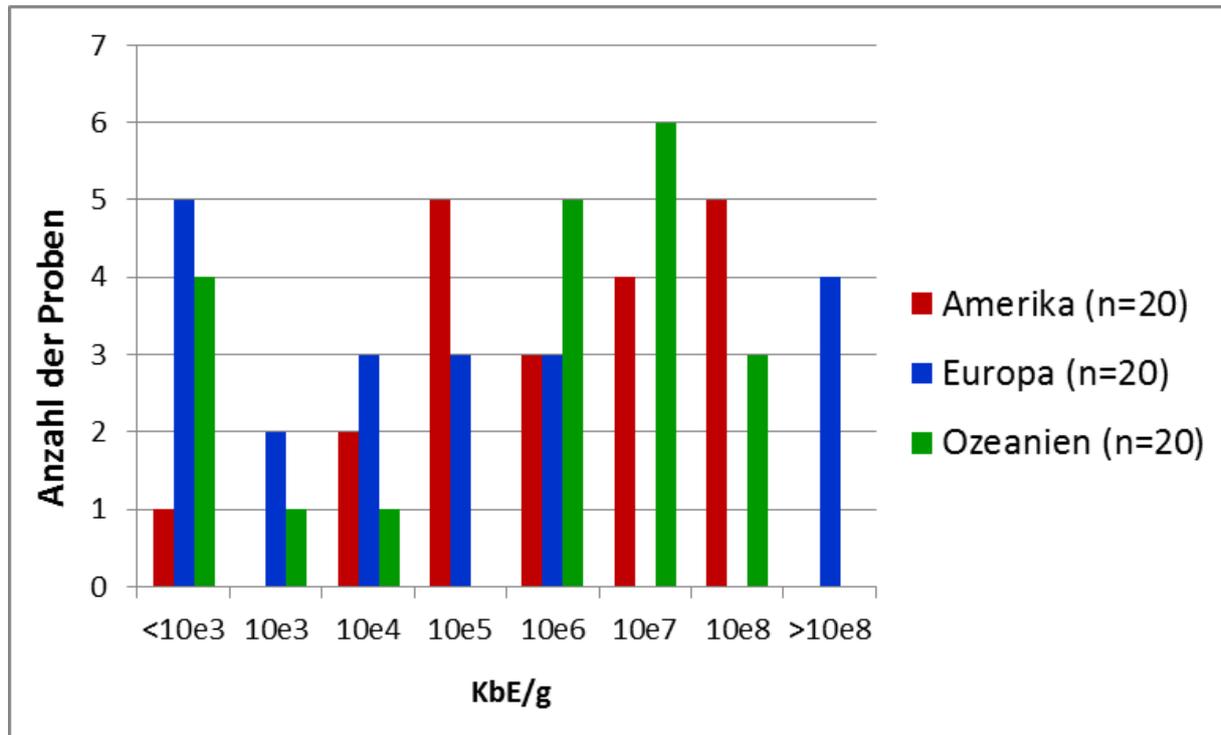


Abbildung 27: Übersicht über die Milchsäurebakterien Keimzahlen bei den verschiedenen Rindfleischproben

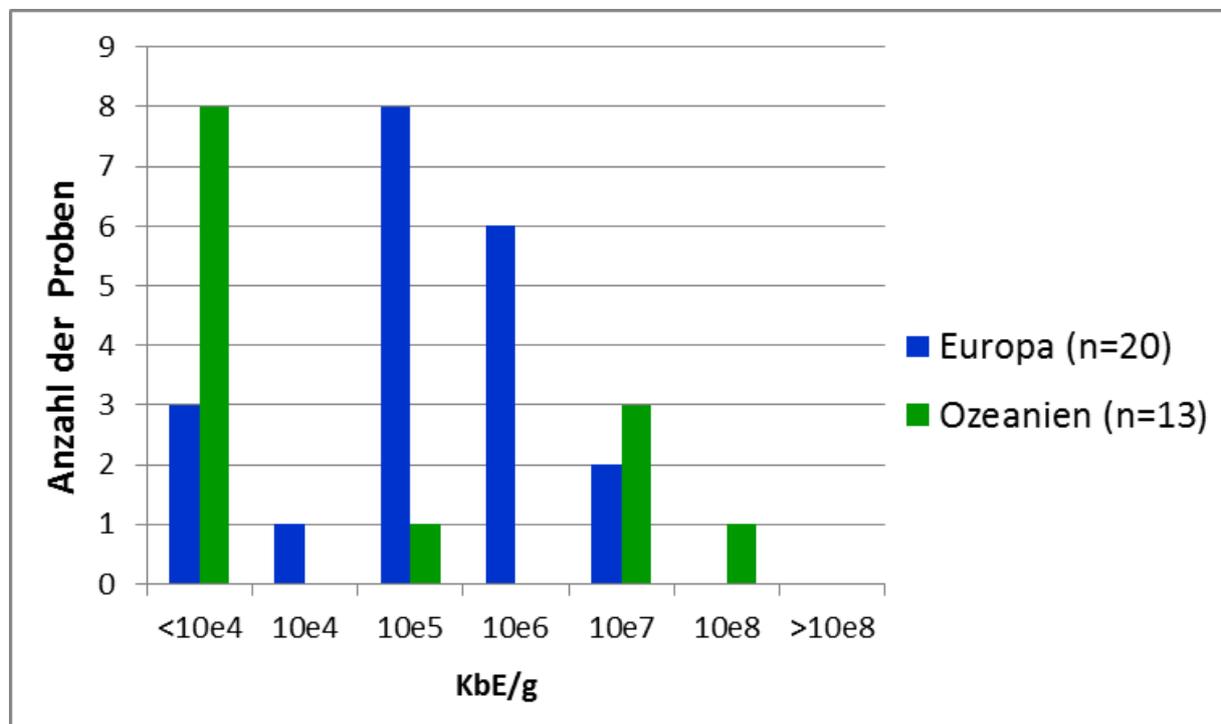


Abbildung 28: Übersicht über die Milchsäurebakterien Keimzahlen bei den verschiedenen Lammfleischproben

Laktobazillen - Rindfleisch

Die Rindfleischproben waren mit Laktobazillen Keimzahlen in einem Bereich von $<10^3$ bis $>10^8$ KbE/g belastet (Abbildung 29). Die Keimzahlbelastung der amerikanischen und neuseeländischen Proben war deutlich höher als die der europäischen Rindfleischproben. Beim Großteil der amerikanischen (15 von 20) und neuseeländischen (14 von 20) Proben wurden Laktobazillen Keimzahlen in einem Bereich von 10^6 bis $>10^8$ KbE/g ermittelt. Im Gegensatz dazu wurden bei der Mehrheit der europäischen Rindfleischproben Keimzahlen in einem Bereich von $<10^3$ bis 10^5 KbE/g festgestellt.

Laktobazillen - Lammfleisch

Die Lammfleischproben waren mit Laktobazillen Keimzahlen in einem Bereich von $<10^4$ bis $>10^8$ KbE/g belastet. Bei den meisten europäischen Lammfleischproben (zwölf von 20) wurden Keimzahlen in einem Bereich von 10^5 bis 10^6 KbE/g ermittelt. Von den restlichen sechs europäischen Lammfleischproben wiesen vier niedrigere Keimzahlen auf. Bei sieben der dreizehn neuseeländischen Lammfleischproben wurden Laktobazillen Keimzahlen in einem Bereich von $<10^4$ KbE/g festgestellt, während bei vier ozeanischen Proben Keimzahlen in einem Bereich von 10^7 bis 10^8 KbE/g ($1,0 \times 10^7$ bis $9,9 \times 10^8$ KbE/g) nachgewiesen wurden (Abbildung 30).

Bei vier Proben (jeweils eine amerikanische und eine europäische Rindfleischprobe, jeweils eine europäische und ozeanische Lammfleischprobe) konnte die Bestimmung der Laktobazillen mithilfe der MRS-Agarplatten 5.0 nicht durchgeführt werden. Bei einer deutschen Lammfleischprobe konnte die anaerobe Reihe nicht ausgewertet werden, da der Teststreifen des Anaerotest® ein anaerobes Milieu nicht verifizierte.

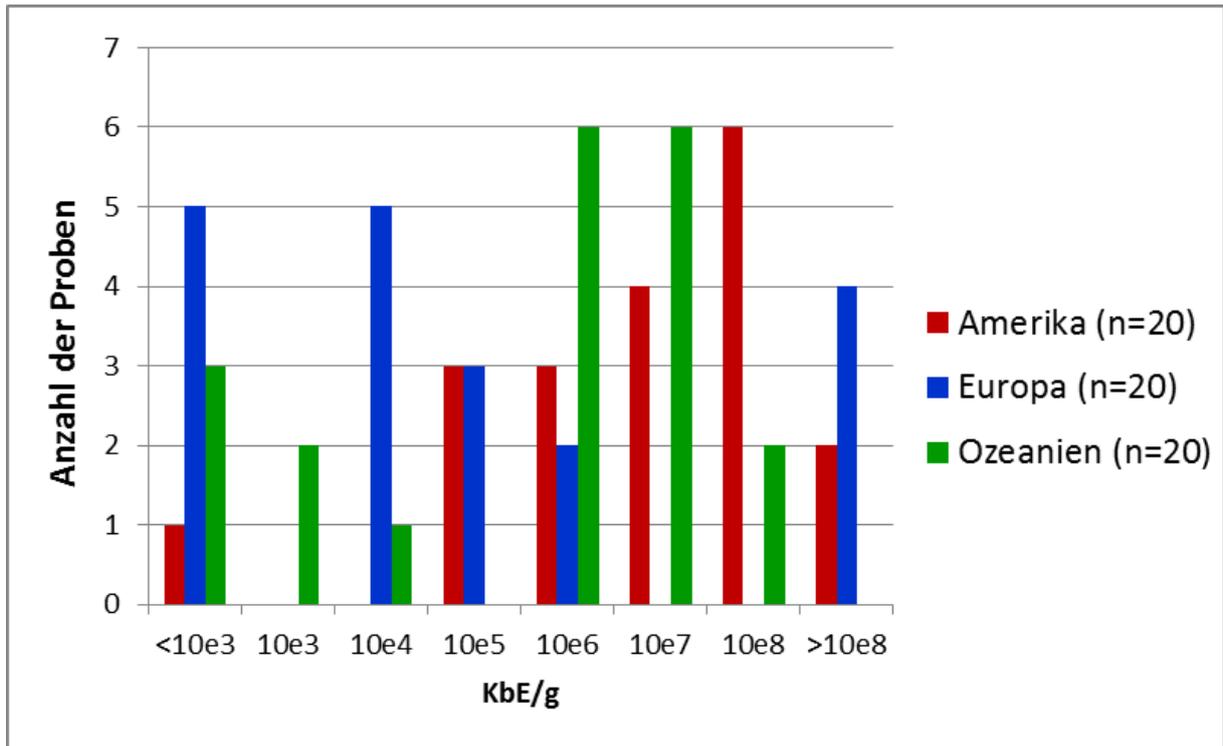


Abbildung 29: Übersicht über die Laktobazillen Keimzahlen bei den verschiedenen Rindfleischproben

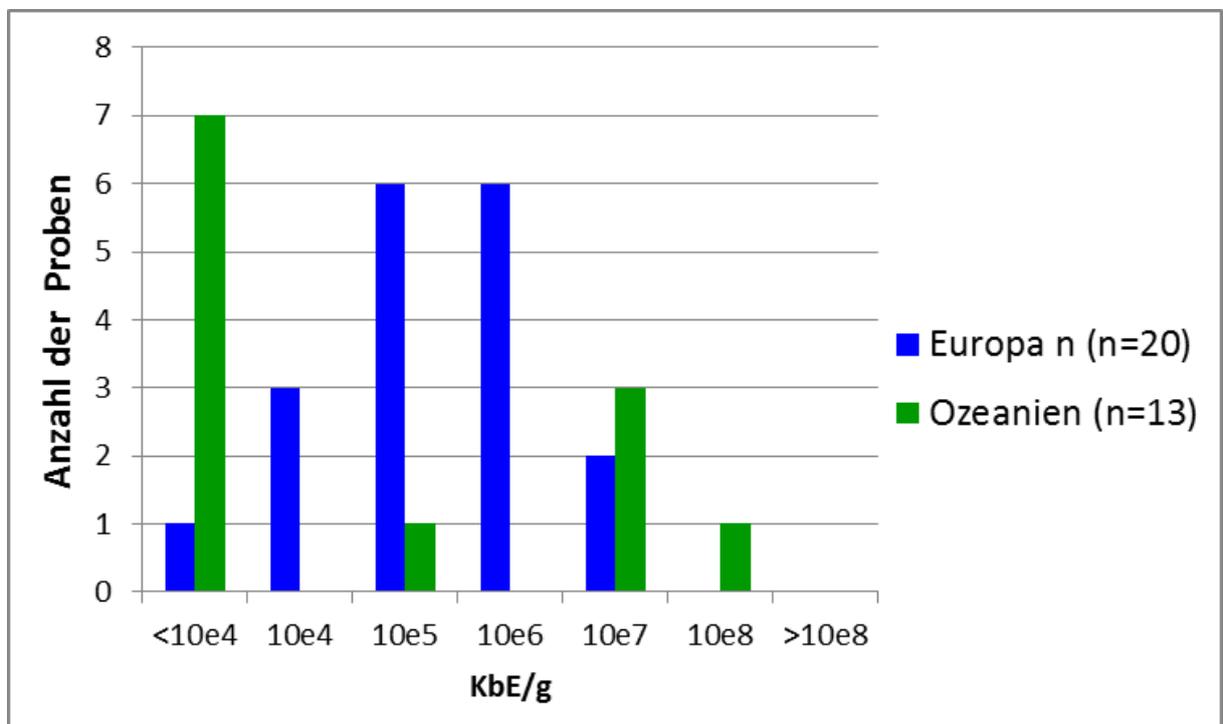


Abbildung 30: Übersicht über die Laktobazillen Keimzahlen bei den verschiedenen Lammfleischproben

4.2 Charakterisierung der Hefe-Isolate

Insgesamt wurden 74 Hefe-Isolate aus 26 Rind- und zehn Lammfleischproben der insgesamt 93 untersuchten Fleischproben gewonnen. Die gewonnenen Isolate wurden den Gattungen *Bulleromyces* (*B.*), *Candida*, *Cryptococcus*, *Kazachstania*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* (*Sp.*) und *Wickerhamomyces* (*W.*) zugeordnet, wobei *C. zeylanoides*, *C. sake* und *K. psychrophila* die dominierenden Hefespezies waren. Acht der 74 Hefe-Isolate ließen sich lediglich in die Gattung *Candida* spp. bzw. ins Reich der Pilze („*Fungal* sp.“) einteilen. Die Rind- und Lammfleischproben aus denen die 74 gewonnenen Hefe-Isolate isoliert wurden, stammten aus Nord- und Südamerika (Argentinien (n=4), Uruguay (n=3) und USA (n=2)), Europa (Deutschland (n=7), Frankreich n=(1), Irland (n=5), Niederlande (n=2) und Wales (n=2)) und Ozeanien (Australien (n=5) und Neuseeland (n=5)) (Abbildung 31).

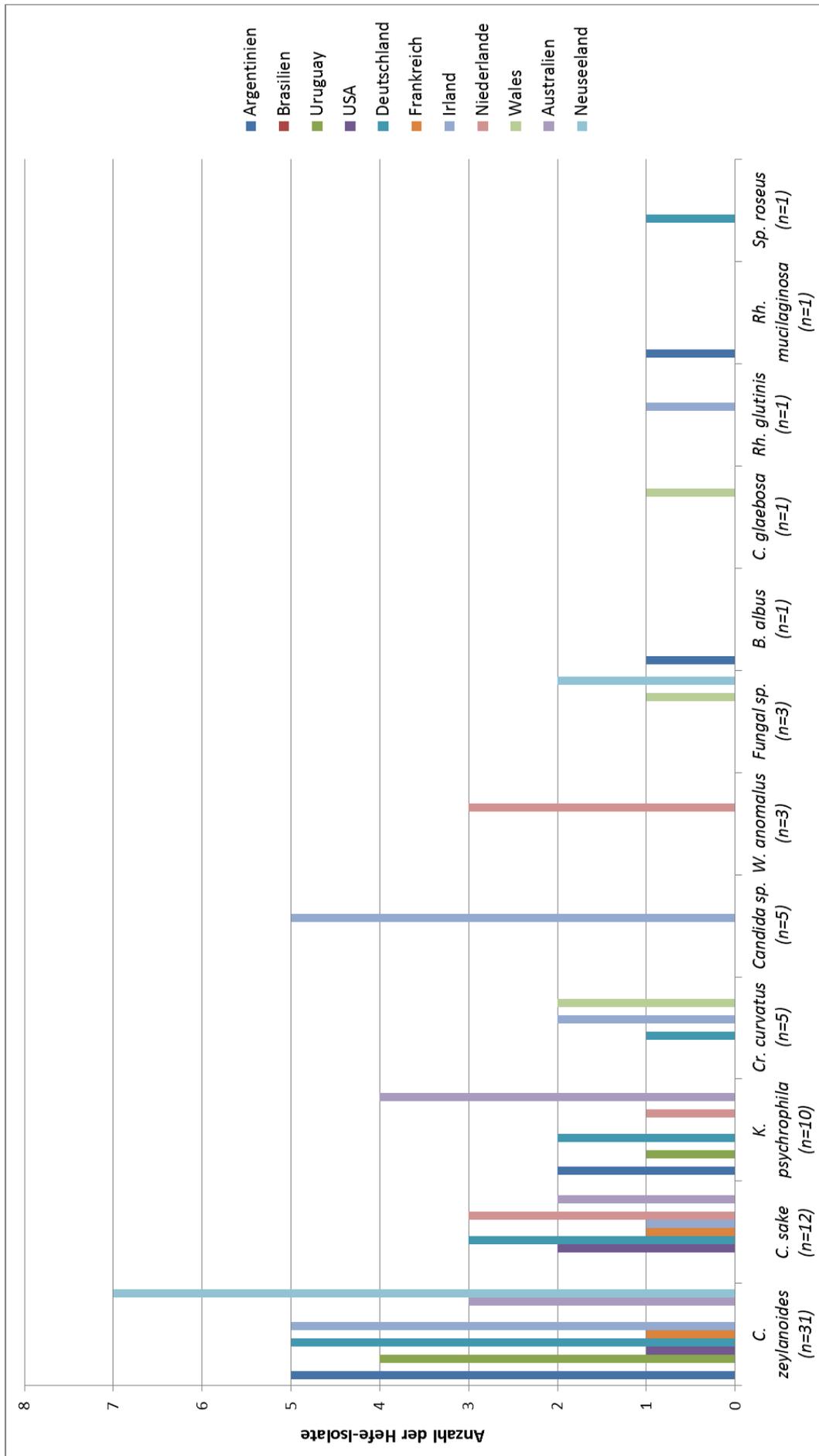


Abbildung 31: Übersicht über die Verteilung der isolierten Hefespezies auf die verschiedenen Probenherkunftsländer; C.=*Candida*, Cr.=*Cryptococcus*, K.=*Kazachstania*, W.=*Wickerhamomyces*, B.=*Bulleromyces*, Rh.=*Rhodotorula*, Sp.=*Sporobolomyces*

4.2.1 Morphologische Charakterisierung

Makroskopische Differenzierung

Die 74 Hefe-Isolate wurden in fünf Gruppen (Gruppe A, B, C, W, P) eingeteilt. Dabei waren die Textur und die Farbe bzw. Pigmentierung der Hefe-Isolate die ausschlaggebenden Einteilungs-Kriterien. Die Hefe-Isolate der drei Gruppen A, B und C unterschieden sich stark in ihrer Konsistenz und Textur. Sechzig Hefe-Isolate zeigten eine cremige oder buttrige Konsistenz sowie eine eher feste Textur und wurden in Gruppe A zusammengefasst (Abbildung 32). Gruppe B wurde von neun Isolaten repräsentiert, die eine zerlaufene, dickflüssige Textur und eine schleimige Konsistenz aufwiesen (Abbildung 32). Fünf Isolate hatten eine cremig-feste Textur mit Faltenbildung und Verschnörkelung ihrer Oberfläche (Gruppe C) (Abbildung 32). Die Farbe von 70 der 74 Hefe-Isolate variierte zwischen weiß, hellbeige und beige. Diese Isolate wurden als nicht pigmentierte Isolate in Gruppe W zusammengefasst (Abbildung 33). Vier der 74 Isolate wiesen eine rötliche, rosane oder orangefarbene Pigmentierung auf und wurden in Gruppe P eingeteilt (Abbildung 34). Die vier pigmentierten Isolate (Gruppe P) waren von zerlaufener Textur und schleimiger Konsistenz.

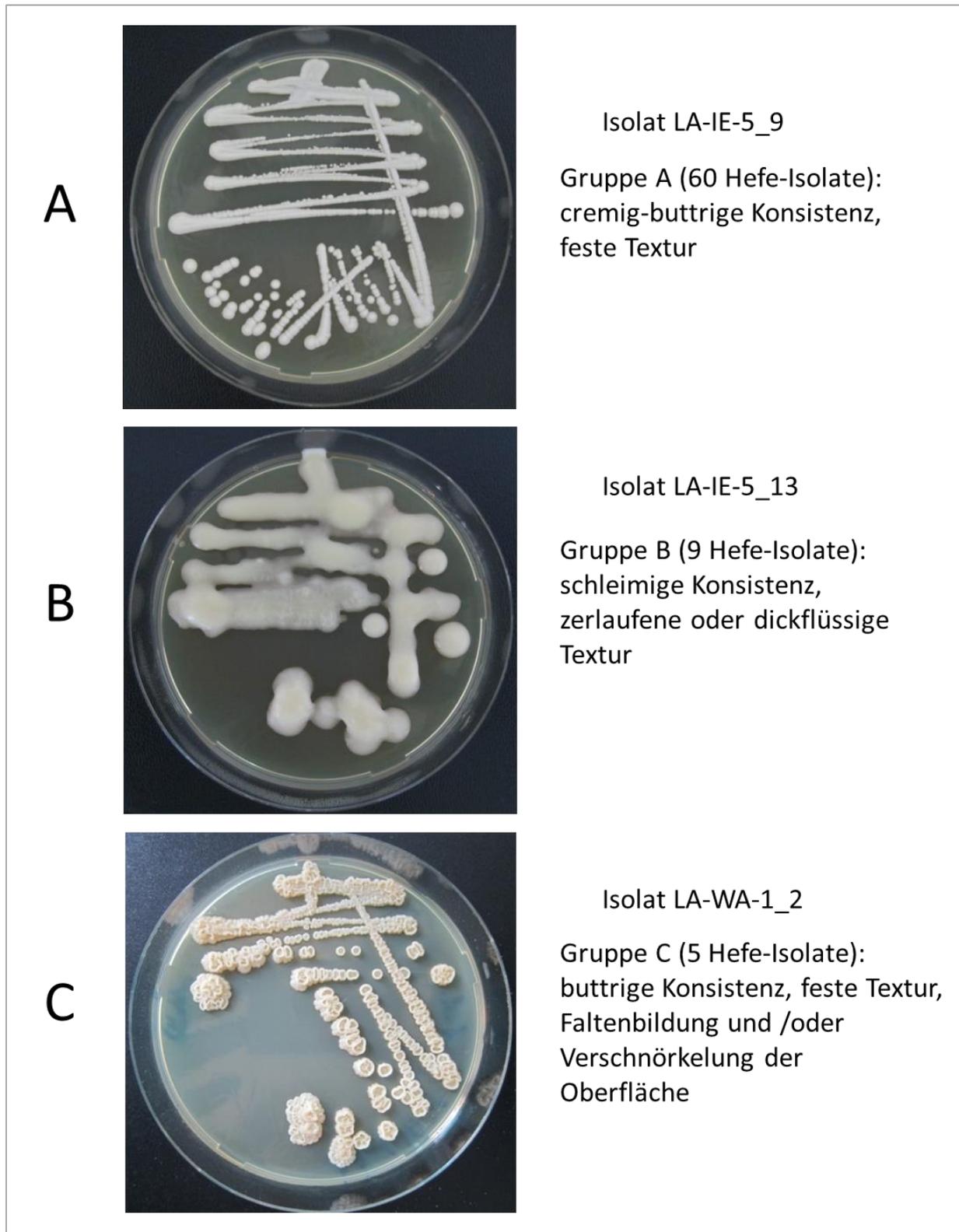


Abbildung 32: Phänotypische Differenzierung der Hefe-Isolate anhand der Konsistenz und der Textur: (A) Gruppe A, cremig-buttrig, fest; (B) Gruppe B, zerlaufen, schleimig; (C) Gruppe C, fest, geschnörkelt, gefaltet; LA=Lammfleisch, IE=Irland, WA=Wales;

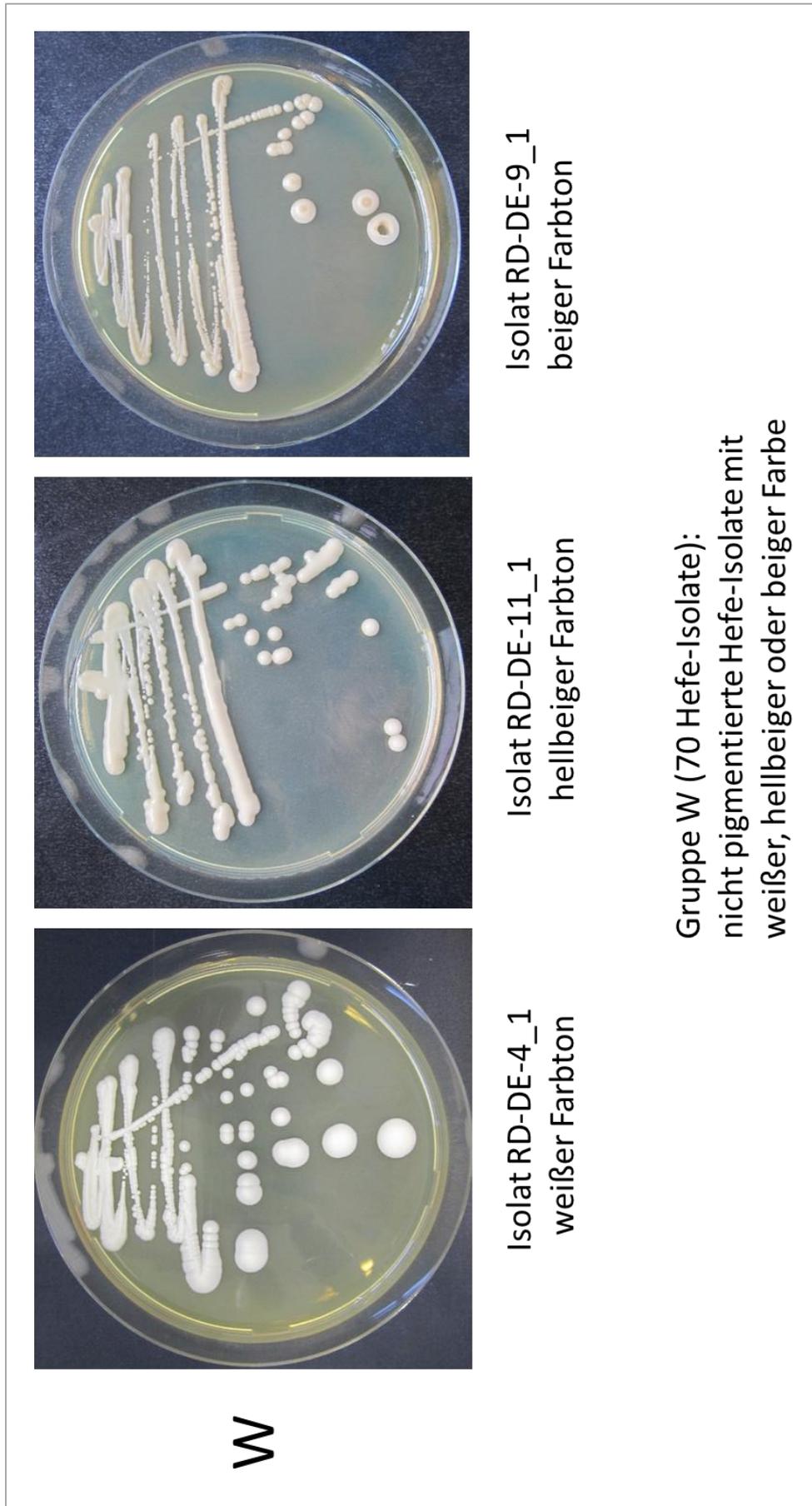


Abbildung 33: Phänotypische Differenzierung der Hefe-Isolate anhand der Farbe: (W) Gruppe W, nicht pigmentierte Isolate mit Farbtönen von weiß bis beige; DE=Deutschland, RD=Rindfleisch;

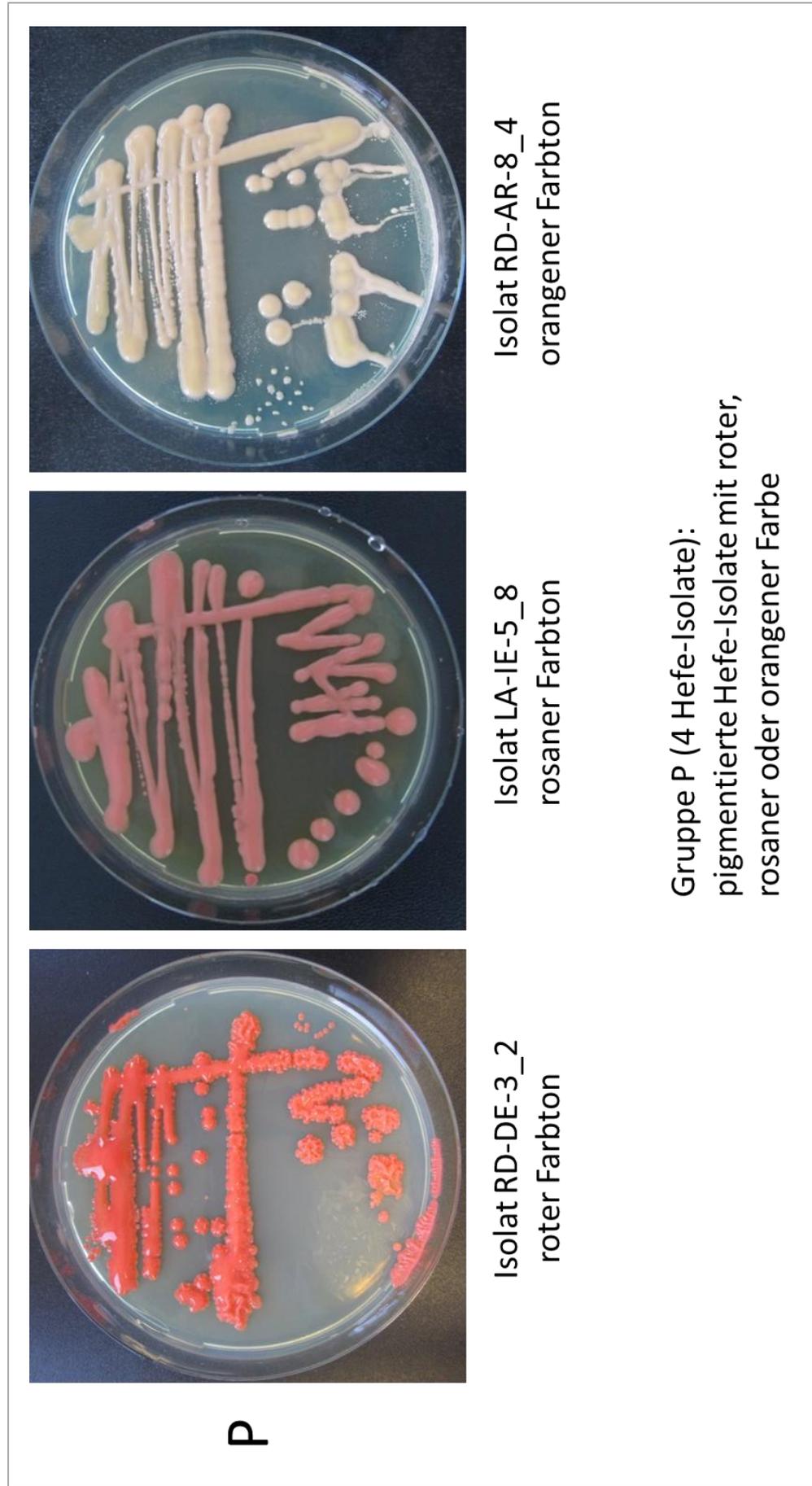


Abbildung 34: Phänotypische Differenzierung der Hefe-Isolate anhand der Farbe: (P) Gruppe P, pigmentierte Isolate mit Farbtönen von rot bis orange; AR=Argentinien, DE=Deutschland, IE=Irland, LA=Lammfleisch, RD=Rindfleisch

Lichtmikroskopische Differenzierung

Mithilfe des Lichtmikroskops wurden die Formen der Hefezellen mikroskopisch beschrieben. Anhand ihrer unter dem Lichtmikroskop untersuchten Zellform wurden die Hefe-Isolate fünf Gruppen (Gruppe 1 bis 5) zugeordnet.

Die Hefezellen waren entweder oval mit abgerundeten Polen (Gruppe 1), zitronenförmig oder elongiert mit eher spitz zulaufenden Polen (Gruppe 3), rund (Gruppe 4) oder „polymorph“ (Gruppe 2). Als „polymorphe“ Isolate wurden diejenigen bezeichnet, die unter dem Lichtmikroskop mehr als eine Zellform zeigten. Manche dieser polymorphen Isolate zeigten zusätzlich die Bildung von (Pseudo)hyphen (Gruppe 5). In einigen Fällen wurden zwei Zellformen beobachtet, oval und rund oder oval und zitronenförmig. Bei diesen Isolaten wurde die jeweils dominierende Zellform (oval oder rund) für die mikroskopische Einteilung des Isolats gewählt. Das Phänomen der Sprossung wurde bei allen Hefe-Isolaten beobachtet. Die meisten Isolate zeigten eine polare Sprossung, einige zeigten zusätzlich eine multilaterale und/oder eine bipolare Sprossung. Einige Hefe-Isolate zeigten beim Nativ-Präparat eine ovale Zellform, beim Gram-Präparat jedoch eine eher runde. Für die mikroskopische Differenzierung wurde die beim Nativ-Präparat erscheinende Zellform gewählt.

Bei 29 Isolaten wurde lichtmikroskopisch eine ellipsoid-ovale Zellform festgestellt (Gruppe 1) (Abbildung 35). Sechzehn Isolate zeigten eine gewisse Polymorphie, da bei ihnen Hefezellen unterschiedlicher Formen (oval, rund und längliche) beobachtet werden konnten (Gruppe 2) (Abbildung 36). Bei 15 Isolaten wurden überwiegend zitronenförmige oder elongierte Hefezellen mit eher spitzen Polen beobachtet (Gruppe 3) (Abbildung 37). Bei vierzehn Isolaten (LA-DE-5_11, LA-IE-5_10, LA-IE-5_13, LA-NZ-9_1, LA-WA-5_1, RD-AUS-8_3, RD-DE-4_1, RD-DE-4_2, RD-DE-11_1, RD-FR-2_1, RD-NL-1_2, RD-NL-2_1, RD-NL-2_5, RD-US-2_2) wurde eine eher runde Zellform festgestellt, wobei es sich manchmal um Zwischenformen handelte und vereinzelt auch ovale Hefezellen beobachtet werden konnten (Gruppe 4) (Abbildung 38). (Pseudo)hyphen wurden bei fünf Isolaten (LA-DE-1_6, LA-IE-5_12, RD-AR-8_1, RD-AUS-8_1 und RD-US-2_1), die in Gruppe 5 zusammengefasst wurden, gesehen und waren mehr oder weniger stark ausgeprägt (Abbildung 39).

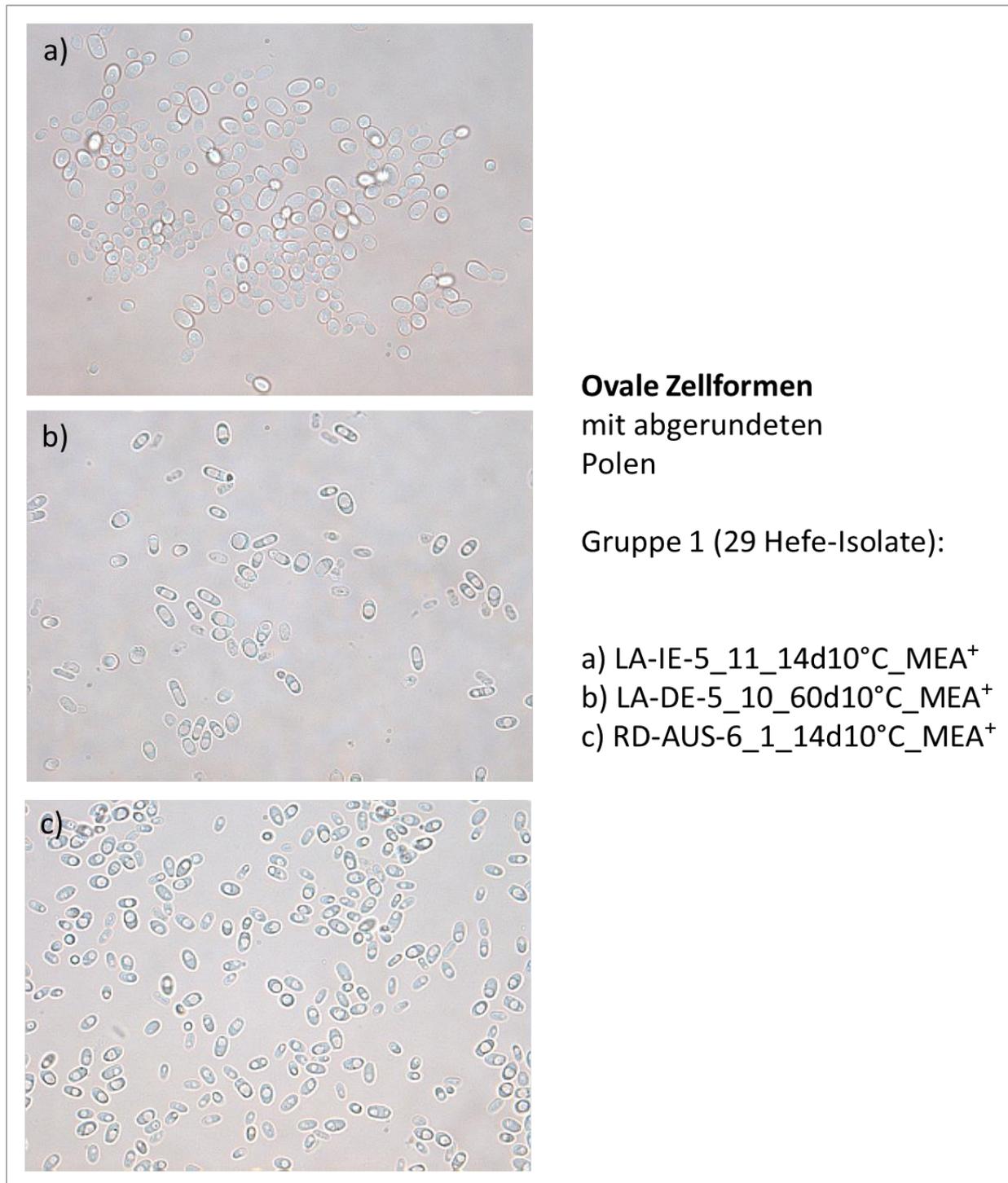


Abbildung 35: Lichtmikroskopische Aufnahmen verschiedener aus Rind- und Lammfleisch isolierter Hefen mit ovaler Zellform (Gruppe 1); a) Isolat LA-IE-5_11; b) Isolat LA-DE-5_10; c) Isolat RD-AUS-6_1 (Nativ-Präparate, 1000fache Vergrößerung); LA=Lammfleisch, RD=Rindfleisch, AUS=Australien, DE=Deutschland, IE=Irland, d=Tage, MEA⁺=Malzextraktagar mit Novobiocin

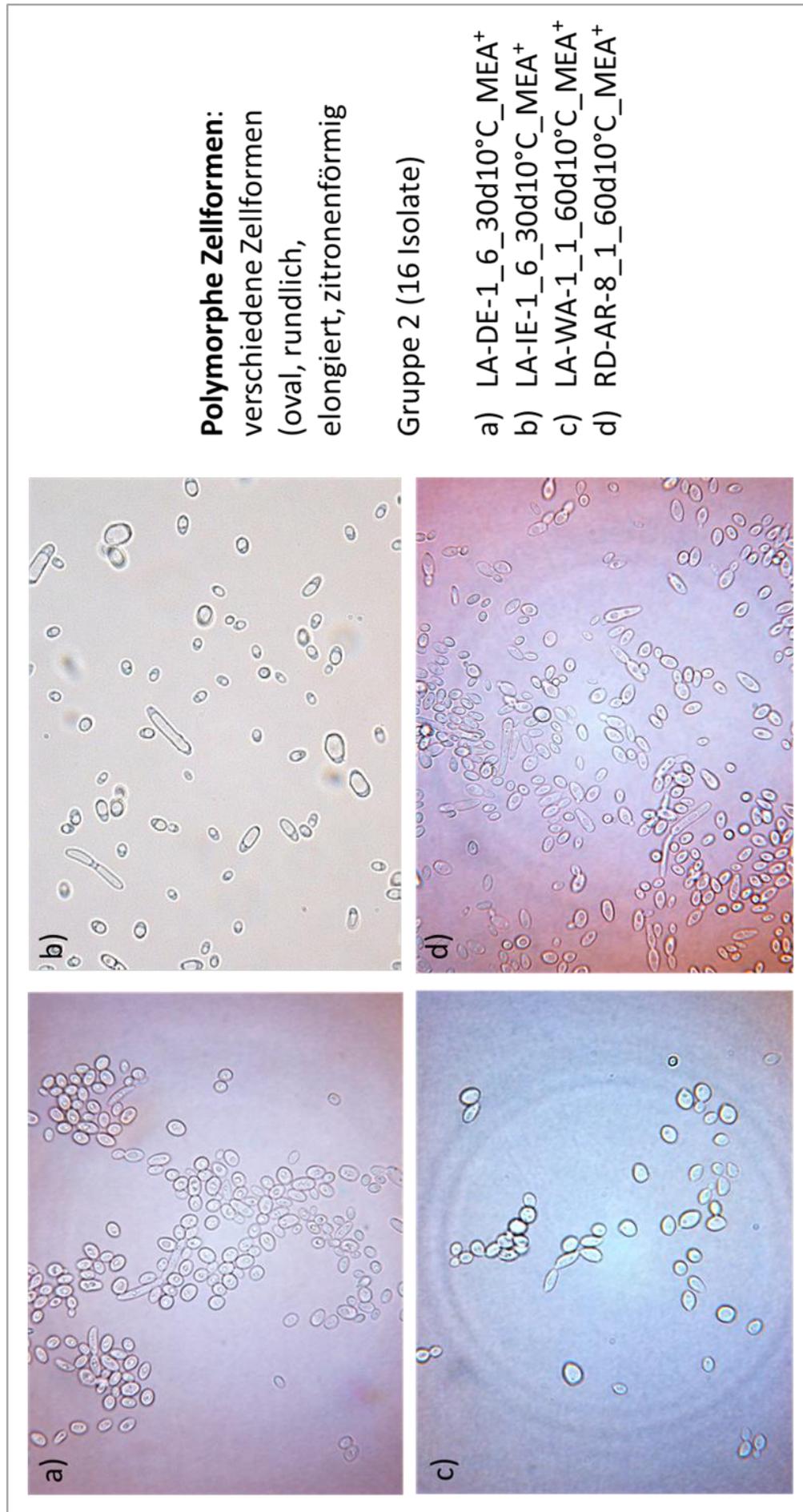


Abbildung 36: Lichtmikroskopische Aufnahmen verschiedener aus Rind- und Lammfleisch isolierter Hefen mit polymorpher Zellform (Gruppe 2)
a) Isolat LA-DE-1_6; b) Isolat LA-IE-1_6; c) Isolat LA-WA-1_1; d) Isolat RD-AR-8_1; Nativ-Präparate, 1000-fache Vergrößerung);
LA=Lammfleisch, RD=Rindfleisch, AR=Argentinien, DE=Deutschland, IE=Irland, WA=Wales, d=Tage, MEA⁺=Malzextraktagar mit
Novobiocin

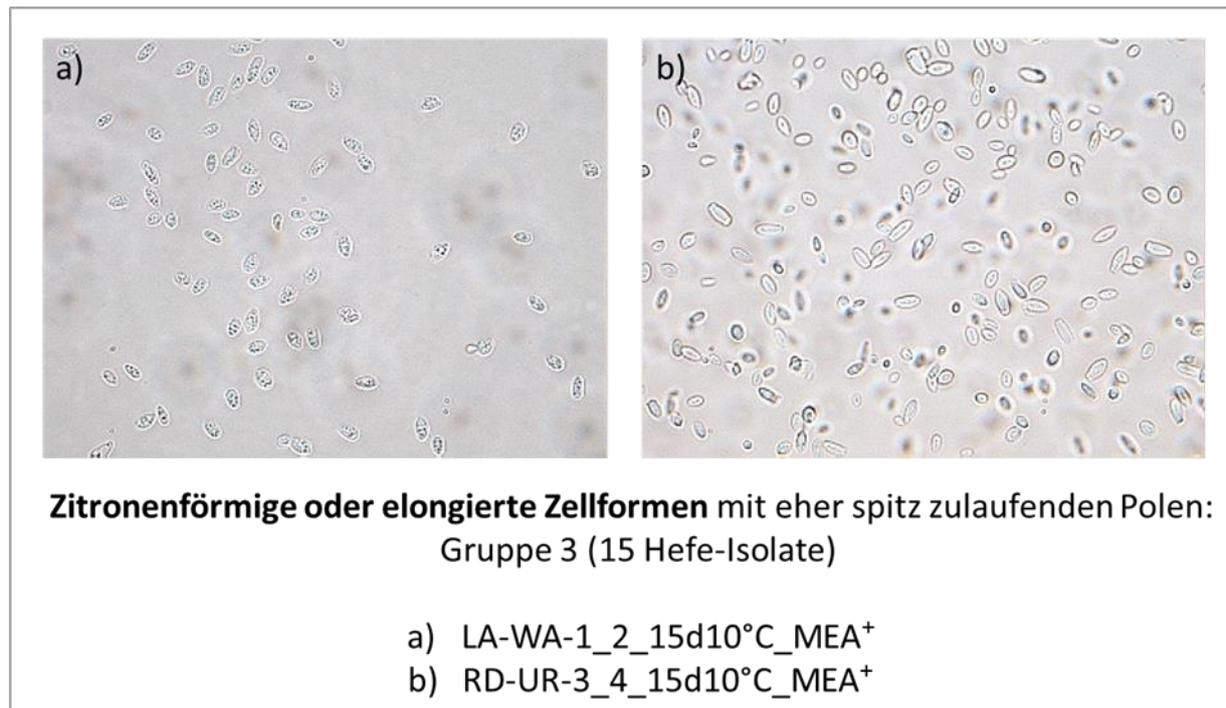


Abbildung 37: Lichtmikroskopische Aufnahmen zweier aus Lamm- bzw. Rindfleisch isolierter Hefen der Gruppe 3; a) Isolat LA-WA-1_2 mit zitronenförmiger Zellform; b) Isolat RD-UR-3_4 mit elongierter Zellform (Nativ-Präparate, 1000-fache Vergrößerung); LA=Lammfleisch, RD=Rindfleisch, WA=Wales, UR=Uruguay, d=Tage, MEA⁺=Malzextraktagar mit Novobiocin

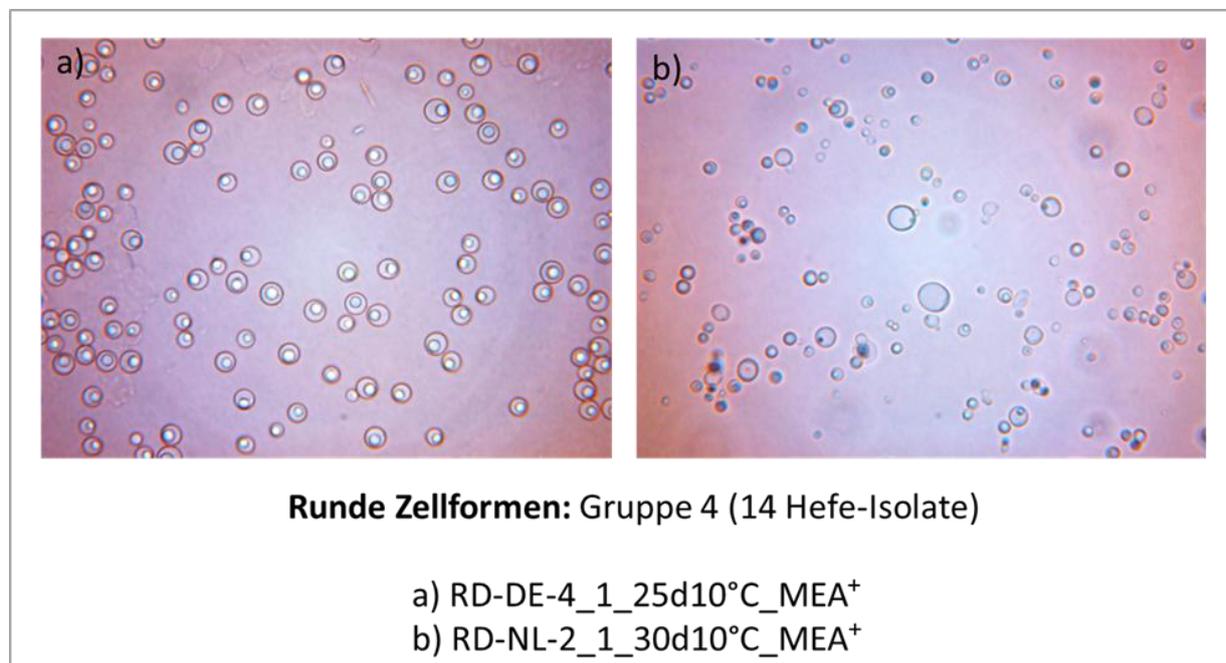


Abbildung 38: Lichtmikroskopische Aufnahmen zweier aus Rindfleisch isolierter Hefen mit runder Zellform (Gruppe 4); a) Isolat RD-DE-4_1 b) Isolat RD-NL-2_1 (Nativ-Präparate, 1000-fache Vergrößerung); RD=Rindfleisch, DE=Deutschland, NL=Niederlande, d=Tage, MEA⁺=Malzextraktagar mit Novobiocin

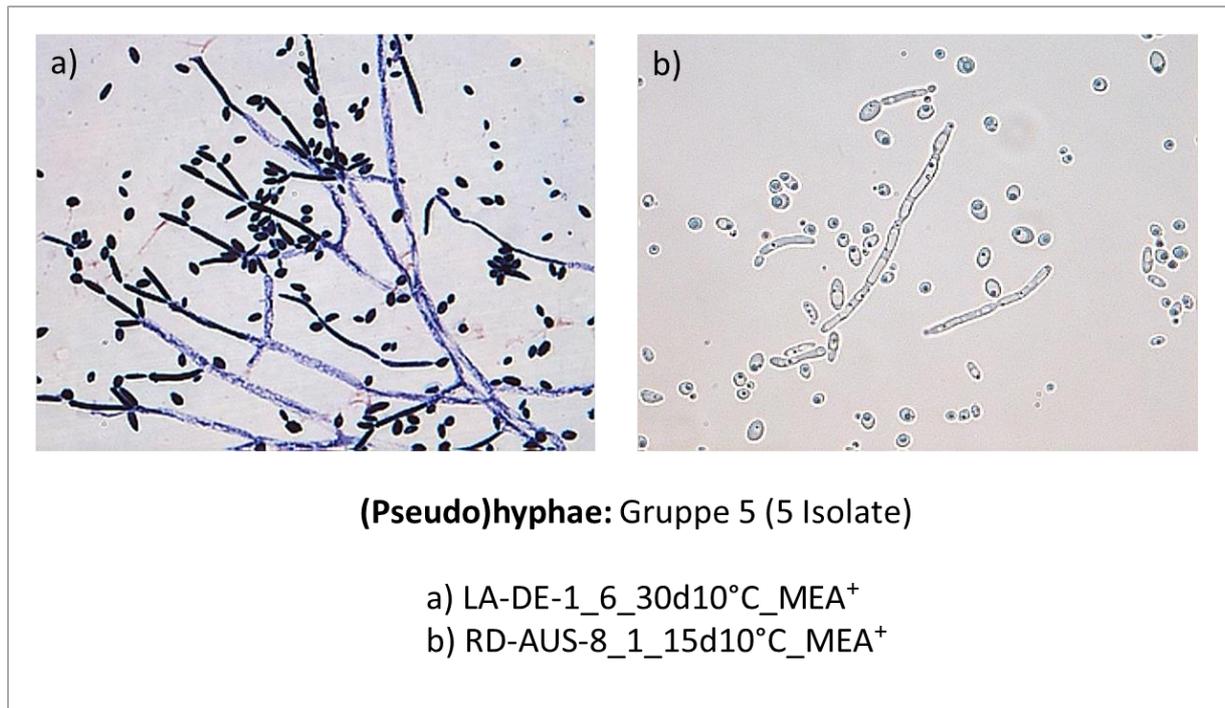


Abbildung 39: Lichtmikroskopische Aufnahmen zweier aus Lamm- bzw. Rindfleisch isolierter Hefen mit (Pseudo)hyphen; a) Isolat LA-DE-1_6 (Gram-Präparat, 1000-fache Vergrößerung); b) Isolat RD-AUS-8_1 (Nativ-Präparat, 1000-fache Vergrößerung); LA=Lammfleisch, RD=Rindfleisch, AUS=Australien, DE=Deutschland, d=Tage, MEA⁺=Malzextraktagar mit Novobiocin

Zusammenfassung der morphologischen Charakteristika der Hefe-Isolate

Um ein verständlicheres Bild der morphologischen Charakteristika der Hefe-Isolate zu geben, werden an dieser Stelle die Ergebnisse der makro- und lichtmikroskopischen Untersuchung mit den Ergebnissen der Sequenzierung verknüpft.

Insgesamt zeigten sich auf Spezies-Ebene überwiegend morphologische Gemeinsamkeiten der Hefe-Isolate. Allerdings wurden auch deutliche makro- und lichtmikroskopische Unterschiede innerhalb der Spezies *C. sake*, *C. zeylanoides* und *K. psychrophila* festgestellt.

Die *C. sake* Isolate waren makroskopisch von einer weißen Farbe, einem dicken Wachstum, einem erhabenem Profil und einer buttrigen oder cremigen Textur gekennzeichnet. Bei neun der zwölf *C. sake* Isolate war die Oberfläche matt, bei zwei Isolaten glänzend und bei einem Hefe-Isolat (RD-AUS-8_1) wurden sowohl matte als auch glänzende Teile der Oberfläche beobachtet. Lichtmikroskopisch wurden bei sechs Isolaten ausschließlich runde Zellformen bemerkt, während bei den restlichen sechs Isolaten die Anwesenheit mehrerer Zellformen (rund und oval, rund und elongiert, zitronenförmig und oval, rund, oval und elongiert)

beobachtet wurde. Bei allen *C. sake* Isolate wurde eine laterale oder multilaterale Sprossung beobachtet. Drei Isolate zeigten zusätzlich Sprossen an den Polen ihrer Zellen (polare Sprossung).

Als gemeinsame makroskopische Charakteristika der 31 *C. zeylanoides* Isolate wurden eine weiße oder hellbeige Farbe und eine cremige oder buttrige Textur festgestellt. Allerdings wurde bei zehn Isolaten eine schleimige oder dickflüssige Konsistenz beobachtet. Hinsichtlich des Wachstums wurden Unterschiede festgestellt (dünn, mäßig dick oder dick). Neun *C. zeylanoides* Isolate wiesen eine matte Oberfläche auf, während die Oberfläche der restlichen 22 Isolate glänzte. Bei zwölf Isolaten wurde ein, mehr oder weniger stark ausgeprägtes, erhabenes Profil bemerkt. Im Gegensatz dazu zeigten die Kolonien von 18 der 31 Isolate ein eher flaches Profil. Bei einem Isolat (RD-US-1_1) wurden eine stark gefaltete Oberfläche sowie eine „wollknoll-artige“, deutliche Erhebung festgestellt. Lichtmikroskopisch wurden starke Unterschiede der Zellformen innerhalb der *C. zeylanoides* Isolate festgestellt. Bei sechzehn Isolaten wurde die gleichzeitige Anwesenheit mehrerer Zellformen (unterschiedliche Kombinationen von runden, ovalen, zitronenförmigen, elongierten und bananenförmigen Zellen) beobachtet. Bei elf Isolaten wurden lichtmikroskopisch ausschließlich ovale Zellformen festgestellt, während bei drei Isolaten zitronenförmige Zellen und bei einem Isolat runde Zellen beobachtet wurden. Die Art der Sprossung war bei allen *C. zeylanoides* Isolaten polar, jedoch wurde bei drei Isolaten zusätzlich eine laterale oder multilaterale, und bei einem Isolat zusätzlich eine bipolare Sprossung festgestellt.

Innerhalb der Spezies *K. psychrophila* wurden bei den zehn Isolaten hauptsächlich makroskopische Unterschiede der Farbe, Textur und Oberfläche ermittelt. Die Kolonien der Hefe-Isolate zeigten ein meist dickes Wachstum. Während die Farbe von fünf Isolaten einen beigen oder dunkelbeigen Ton aufwies, zeigte sie bei den restlichen fünf Isolaten hellere Nuancen von Weiß oder Hellbeige. Die Textur wurde bei fünf Isolaten als buttrig, bei drei Isolaten als cremig und leicht schleimig und bei je einem Isolat als cremig-buttrig bzw. cremig beschrieben. Die Oberfläche von sechs der zehn Isolate war matt, während sie bei den restlichen vier Isolaten glänzte. Es ließ sich bei acht der zehn *K. psychrophila* Isolate ein erhabenes Profil feststellen. Lichtmikroskopisch wurden bei neun Isolaten dieser Spezies ovale Zellformen beobachtet. Die gleichzeitige Anwesenheit von elongierten Zellen wurde bei zwei Isolaten bemerkt. Bei diesen neun Isolaten wurde eine polare Sprossung festgestellt

(bei einem dieser Isolate zusätzlich eine bipolare Sprossung). Das Isolat RD-NL-2_1 zeigte lichtmikroskopisch runde Zellen und eine laterale Sprossung.

4.2.2 Biochemische Charakterisierung

Bei der biochemischen Untersuchung mittels der Testkits API 20 C AUX® und API Candida® zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Isolaten. Siebenundvierzig der 74 Isolate konnten mithilfe des API 20 C AUX® biochemisch differenziert werden. Bei 27 Isolaten war trotz Wiederholung des Tests keine Auswertung möglich, da keine der 25 Reaktionen stattgefunden hatte. Mittels API Candida® konnten alle Isolate charakterisiert werden. Die Ergebnisse der APIs werden mit den Ergebnissen der Sequenzierung verknüpft, um ein verständlicheres und übersichtliches Bild über die biochemischen Eigenschaften der Hefe-Isolate zu geben.

Fermentation

Bezüglich der ersten fünf Zuckerreaktionen mit den aktiven Bestandteilen D-Glukose, D-Galaktose, D-Saccharose, D-Trehalose und D-Raffinose, die anaerob durchgeführt wurden, konnten die 74 Isolate zwölf verschiedenen Gruppen zugeordnet werden (Abbildung 40), wobei die Isolate *B. albus*, *C. glabrosa* und *Sp. roseus* bei allen fünf Zuckerreaktionen negative Ergebnisse zeigten. Beim Zucker Glukose zeigte das Isolat *B. albus* ein fragliches Ergebnis. Die vier Hefe-Isolate der ersten Gruppe konnten die fünf Zucker fermentieren und wurden mithilfe der Sequenzierung als *K. psychrophila* (3) und *Wickerhamomyces anomalus* (1) identifiziert. Gruppe 2 bestand aus drei Isolaten, die alle Zucker bis auf Raffinose fermentieren konnten. Diese Isolate wurden mittels Sequenzierung als *C. sake* (2) und *Rh. mucilaginosa* (1) identifiziert. Sechs Isolate konnten Glukose, Saccharose, Trehalose und Raffinose anaerob abbauen, aber nicht Galaktose und wurden als *C. sake* (1) und *K. psychrophila* (5) identifiziert (Gruppe 3). Die erfolgreiche Fermentation von allen Zuckern ausgenommen Trehalose zeigten zwei *W. anomalus* Isolate (Gruppe 4). Die Fermentation von Glukose, Galaktose und Saccharose war positiv bei zwei *Cr. curvatus* Isolaten (Gruppe 5). Die Fähigkeit Glukose, Saccharose und Raffinose fermentieren zu können zeigte das Isolat *Rh. glutinis* (Gruppe 6). Gruppe 7 bestand aus 22 Isolaten, die Glukose, Galaktose und Trehalose fermentieren konnten. Davon wurden 19 Isolate als *C. zeylanoides* und zwei als *C. sake* identifiziert. Ein Isolat dieser Gruppe konnte mittels Sequenzierung nicht identifiziert

werden („*Fungal* sp.“). Gruppe 8 bestand aus drei Isolaten der Spezies *C. sake*, die Glukose, Saccharose und Trehalose anaerob abbauen konnten. Zwei *Cr. curvatus* Isolate und ein *K. psychrophila* Isolat wurden in Gruppe 9 zusammengefasst, da sie sowohl Glukose als auch Saccharose fermentieren konnten. Positive Fermentationsreaktionen bei den zwei Zuckern Glukose und Trehalose zeigten 16 Isolate, wovon elf Isolate als *C. zeylanoides*, vier als *C. sake* und eins als *K. psychrophila* identifiziert werden konnten (Gruppe 10). Gruppe 11 bestand aus einem *Candida* sp. Isolat, das Glukose und Galaktose anaerob abbauen konnte. In Gruppe 12 wurden jene Isolate eingeteilt, die lediglich bei dem Zucker Glukose eine positive Fermentationsreaktion zeigten. Davon wurden zwei Isolate als *C. zeylanoides* (1) und *Cr. curvatus* (1) identifiziert. Vier dieser acht Isolate gehören zur Gattung *Candida*, und zwei Isolate waren mittels Sequenzierung lediglich ins Reich der Pilze einzuteilen („*Fungal* sp.“).

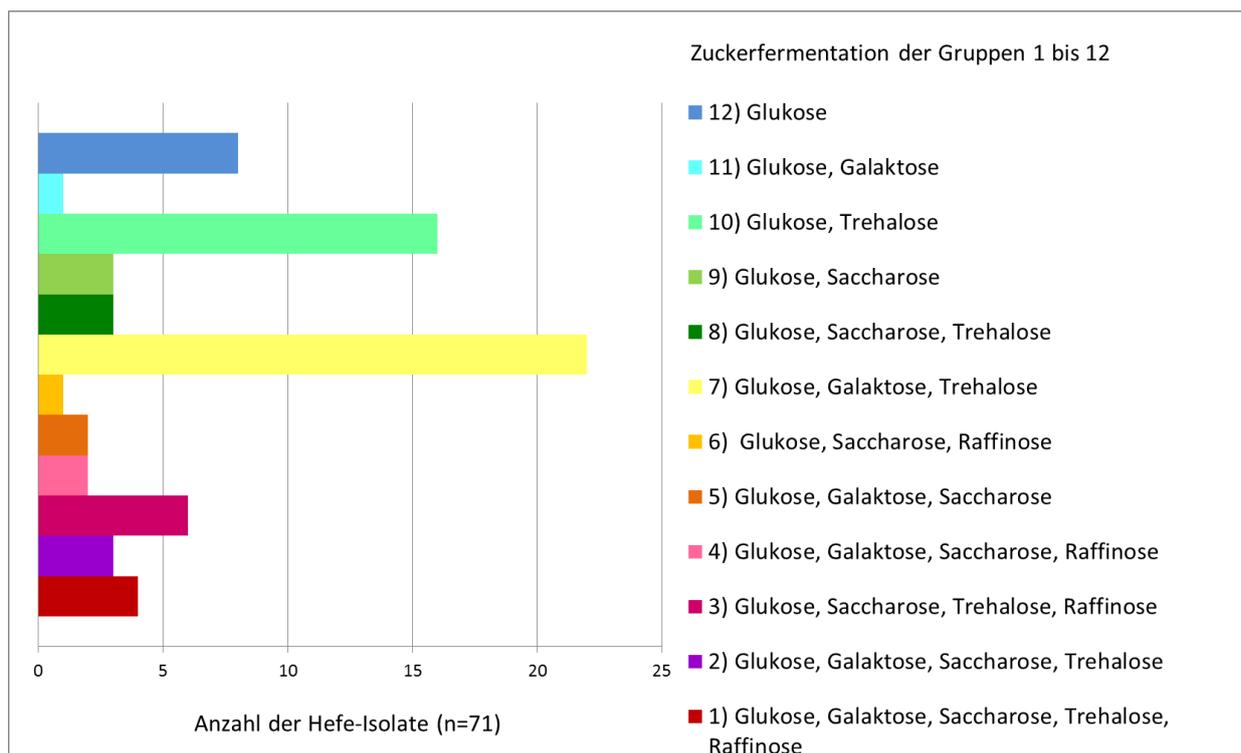


Abbildung 40: Verteilung der Hefe-Isolate in Gruppe 1 bis 12 bezüglich ihrer Fähigkeit fünf verschiedene Zucker zu fermentieren

Candida glabrosa

Das Isolat *C. glabrosa* trat unter den insgesamt 74 Hefe-Isolaten nur einmal auf. Das Isolat zeigte bei allen Fermentationsergebnissen hinsichtlich der fünf untersuchten Zucker negative Reaktionen.

Candida zeylanoides

Von den 31 Isolaten, die als *C. zeylanoides* identifiziert wurden (31 von 74), konnte die Mehrheit (19 von 31) D-Glukose, D-Galaktose und D-Trehalose fermentieren. Elf Isolate zeigten die Fähigkeit D-Glukose und D-Trehalose zu fermentieren. Ein Isolat konnte lediglich D-Glukose fermentieren. Es ergaben sich somit drei verschiedene Fermentations-Kombinationen (Abbildung 41).

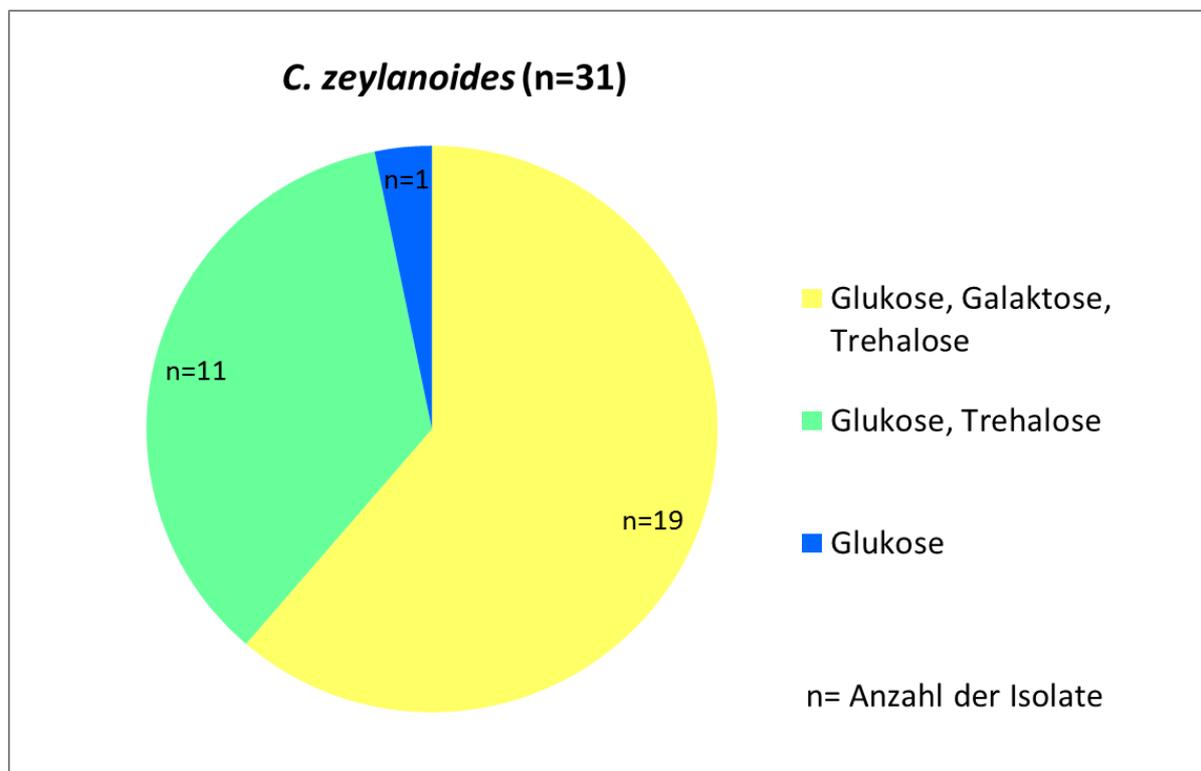


Abbildung 41: Überblick über die verschiedenen positiven Fermentationsverhalten innerhalb der Spezies *C. zeylanoides*; C.= *Candida*

Candida sake

Die Ergebnisse der zwölf als *C. sake* identifizierten Isolate zeigten Unterschiede bezüglich der Fähigkeit D-Saccharose, D-Galaktose und D-Raffinose zu fermentieren. Alle zwölf Isolate waren dazu in der Lage D-Glukose und D-Trehalose zu fermentieren (Abbildung 42). Zusätzlich positive Reaktionen zeigten drei Isolate bei dem Zucker D-Saccharose, zwei bei

dem Zucker D-Galaktose. Außerdem waren zwei Isolate dazu in der Lage, zusätzlich Galaktose und Saccharose anaerob abzubauen. Ein Isolat zeigte positive Fermentationsreaktionen bei den Zuckern D-Glukose, D-Saccharose, D-Trehalose und D-Raffinose. Es ergaben sich insgesamt fünf verschiedene Fermentations-Kombinationen innerhalb dieser *Candida*-Spezies (Abbildung 42).

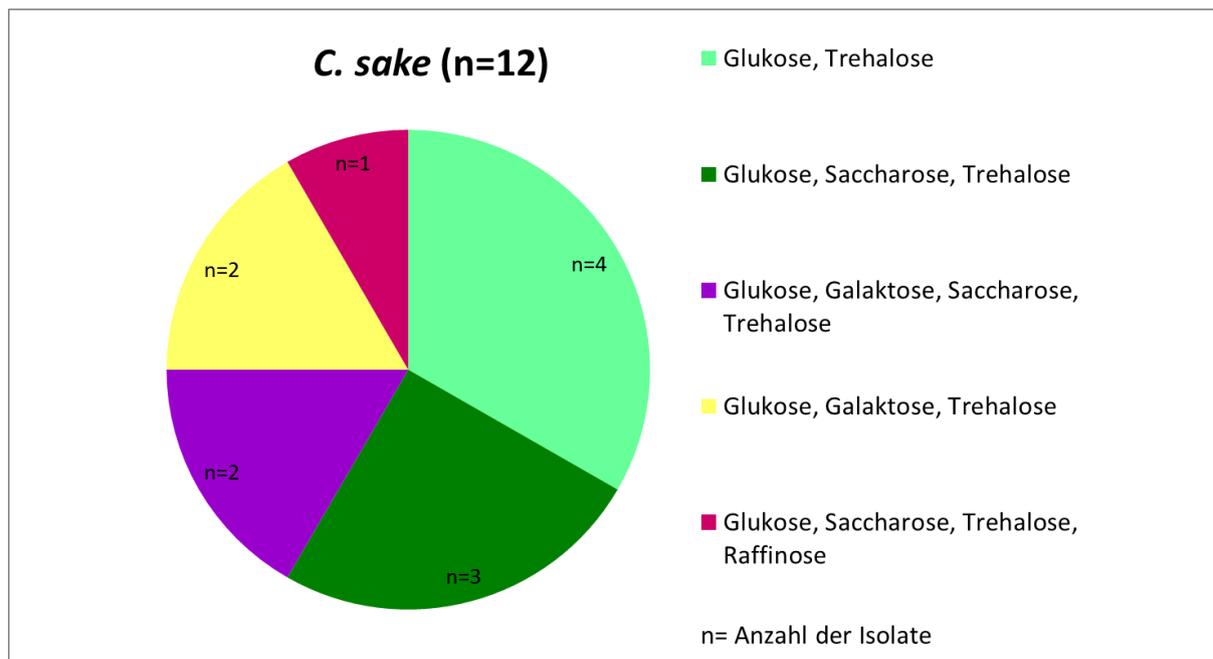


Abbildung 42: Überblick über die verschiedenen positiven Fermentationsverhalten innerhalb der Spezies *C. sake*; C.= *Candida*

Cryptococcus curvatus

Unterschiede des Fermentations-Verhalten fanden sich auch innerhalb der fünf *Cr. curvatus* Isolate.

Alle fünf Isolate konnten D-Glukose fermentieren. Zusätzlich positive Reaktionen zeigten zwei Isolate bei D-Saccharose. Zwei weitere Isolate konnten sowohl D-Saccharose als auch D-Galaktose zusätzlich fermentieren (Abbildung 43).

Kazachstania psychrophila

Das Fermentationsverhalten der zehn *K. psychrophila* Isolate zeigte deutliche Unterschiede. Alle Isolate waren dazu in der Lage D-Glukose zu fermentieren. Neun Isolate zeigten zusätzlich die Fähigkeit Saccharose und D-Trehalose zu fermentieren. Die Fähigkeit D-Glukose, D-Saccharose, D-Trehalose und D-Raffinose zu fermentieren zeigten fünf Isolate.

Drei Isolate zeigten positive Fermentationsreaktion bei allen fünf Zuckern. Ein Isolat zeigte lediglich bei D-Glukose und D-Trehalose eine positive Reaktion (Abbildung 44).

Wickerhamomyces anomalus

Von den insgesamt 74 Hefe-Isolaten wurden drei Isolate als *W. anomalus* identifiziert. Diese konnten D-Glukose, D-Galaktose, D-Saccharose und D-Raffinose fermentieren. Ein Isolat zeigte zusätzlich die Fähigkeit D-Trehalose anaerob abzubauen.

Bulleromyces albus

Die Spezies *B. albus* trat unter den 74 Hefe-Isolaten nur einmal auf. Dieses Isolat zeigte bei allen fünf Zuckern negative Ergebnisse. Dabei war das Ergebnis der Fermentationsreaktion beim Zucker D-Glukose unklar bzw. nicht eindeutig.

Rhodotorula sp.

Sowohl das Isolat *Rh. glutinis*- als auch das *Rh. mucilaginosa* Isolat zeigten positive Fermentationsreaktionen bei D-Glukose und D-Saccharose. Das *Rh. glutinis* Isolat konnte zusätzlich D-Raffinose anaerob verwerten, während das *Rh. mucilaginosa* Isolat zusätzlich D-Galaktose und D-Trehalose fermentieren konnte.

Sporobolomyces roseus

Aus den untersuchten Proben konnte ein *Sp. roseus* Isolat gewonnen werden, das keinen der fünf Zucker fermentieren konnte.

Candida sp.

Bei der Sequenzierung konnten fünf Isolate lediglich der Gattung *Candida* zugeordnet werden, da eine Identifikation auf Speziesebene nicht gelang. Vier dieser Isolate zeigten lediglich bei dem Zucker D-Glukose eine positive Fermentationsreaktion. Ein weiteres Isolat war außerdem dazu in der Lage D-Galaktose fermentieren zu können.

Fungal sp.

Bei der Sequenzierung konnten insgesamt drei Isolate lediglich ins Reich der Pilze eingeteilt werden (*Fungal sp.*), da eine Identifikation auf Gattungsebene nicht gelang. Zwei dieser Isolate zeigten lediglich bei dem Zucker D-Glukose eine positive Fermentationsreaktion. Das dritte Isolat konnte D-Glukose, D-Galaktose und D-Trehalose fermentieren.

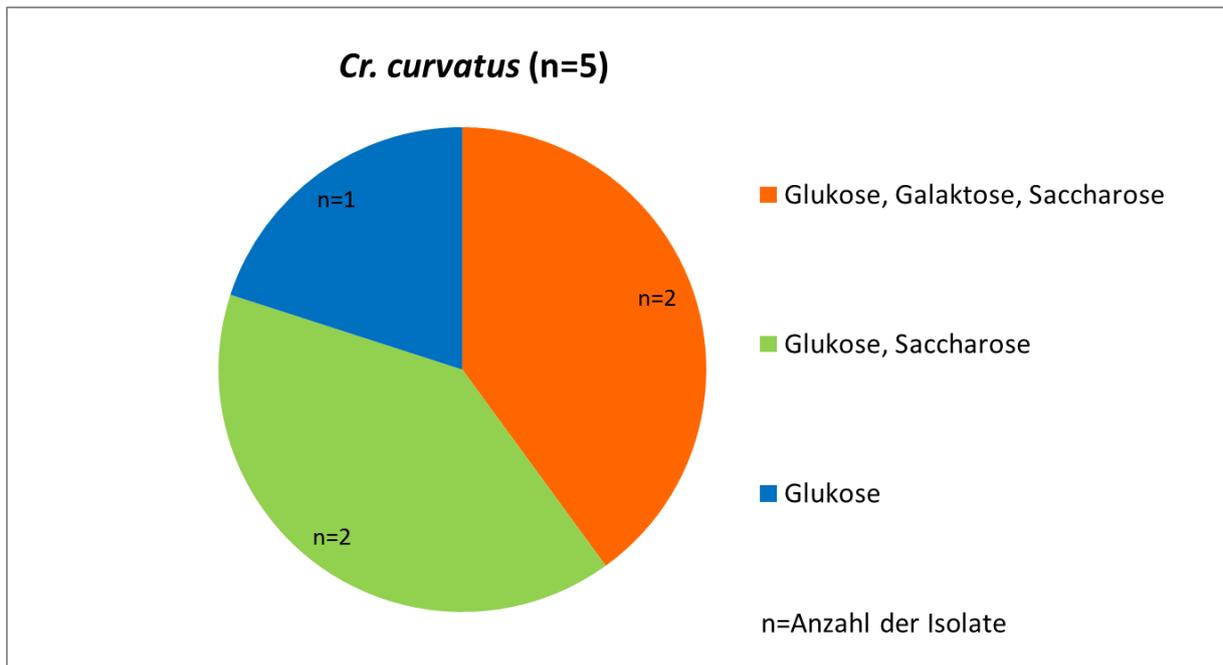


Abbildung 43: Überblick über die verschiedenen positiven Fermentationsverhalten innerhalb der Spezies *Cr. curvatus*; *Cr.*= *Cryptococcus*

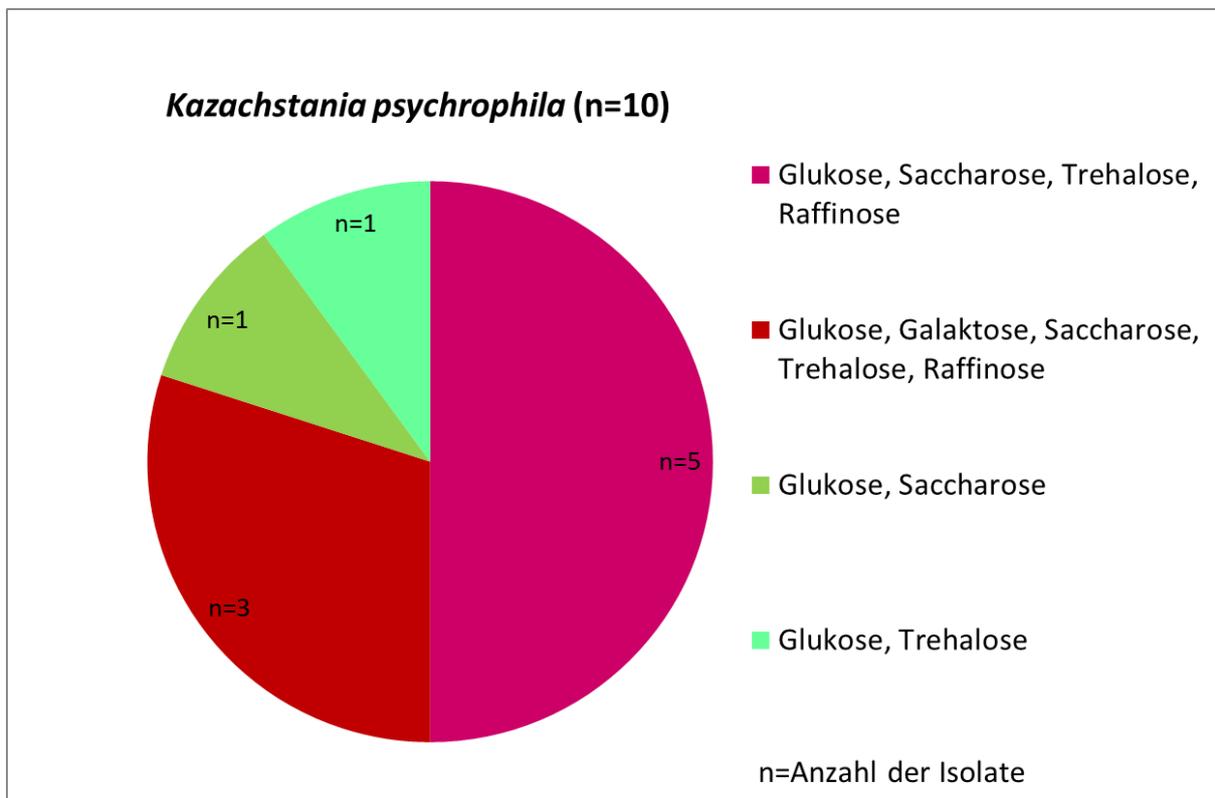


Abbildung 44: Überblick über die verschiedenen positiven Fermentationsverhalten innerhalb der Spezies *Kazachstania psychrophila*

Assimilationsreaktionen

Bei 47 der 74 Isolate hat der API 20 C AUX® hinsichtlich der Assimilationsreaktionen auswertbare Ergebnisse geliefert. Bei 27 der 74 Hefe-Isolate fanden keine Reaktionen statt, und wurden somit als negativ gewertet. Auch nach wiederholter Testdurchführung zeigten sich dieselben Ergebnisse. Unterschiede hinsichtlich des Assimilationsverhaltens zeigten sich sowohl auf Gattungs- als auch auf Speziesebene.

C. zeylanoides

Achtundzwanzig von insgesamt 31 *C. zeylanoides* Isolaten zeigten zahlreiche Unterschiede in ihrem Assimilationsverhalten (Abbildung 45). Alle Isolate konnten Glukose und Glycerin verwerten. Sechszwanzig Isolate konnten zusätzlich D-Sorbit assimilieren. Das Substrat Calcium 2-Keto-Glukonat konnte von 23 Isolaten assimiliert werden.

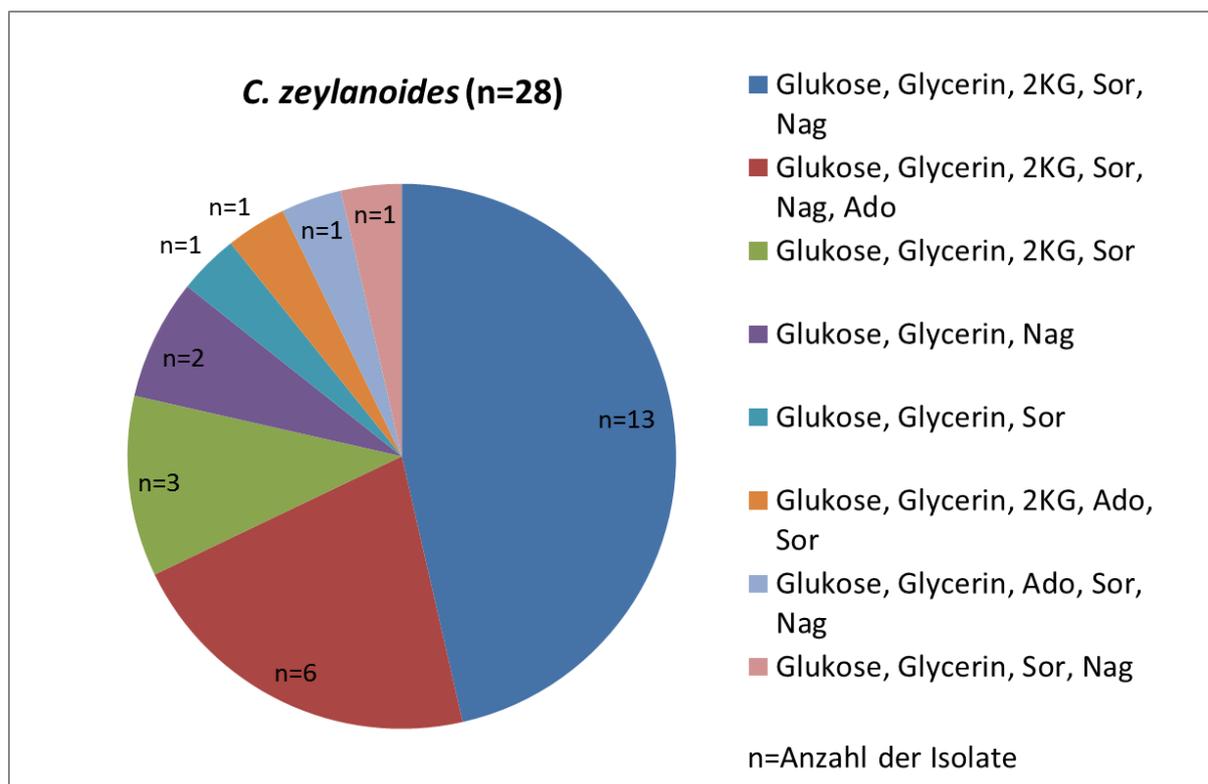


Abbildung 45: Unterschiedliche Assimilationskombinationen verschiedener Zucker von 28 *Candida zeylanoides*-Isolaten; (C.=*Candida*, Ado=Adonit, Nag=N-Acetyl-Glukosamin, Sor=D-Sorbit, 2KG=Calcium 2-Keto-Glukonat)

Ein Isolat konnte als einziges dieser Spezies Galaktose assimilieren. Unter nicht Berücksichtigung des Zuckers D-Galaktose ergaben sich acht unterschiedliche Assimilationskombinationen, die in Abbildung 45 dargestellt sind.

Candida sake

Der API 20 C AUX® hat bei vier der insgesamt zwölf Isolaten dieser Spezies funktioniert. Jedes dieser vier Isolate zeigte unterschiedliche Ergebnisse. Alle Isolate konnten D-Glukose, Calcium 2-Keto-Glukonat, D-Sorbit und N-Acetyl-Glukosamin (Nag) verwerten und drei konnten zusätzlich Glycerin verwerten. Eines dieser drei Isolate zeigte zusätzlich positive Reaktionen bei den Substraten Xylit, D-Galaktose, D-Maltose, D-Saccharose und D-Trehalose, während ein Isolat zusätzlich Adonit assimilierte. Das Isolat, das Glycerin nicht verwerten konnte, zeigte aber bei D-Galaktose eine positive Reaktion.

Hydrolyse von Urea

Bei der im API Candida® enthaltenen Reaktion „URE“, mit der die Spaltung von Urea mithilfe des Enzyms Urease getestet wurde, zeigten sechs der 74 Isolate eine positive Reaktion. Die sechs Isolate sind Spezies vier verschiedener Hefe-Gattungen und sind namentlich: *B. albus* (1 von 6), *Cr. curvatus* (2 von 6), *Rh. glutinis* (1 von 6), *Rh. mucilaginosa* (1 von 6) und *Sp. roseus* (1 von 6).

Zusammenfassung der biochemischen Eigenschaften

Beim Vergleich der aeroben und anaeroben Verwertung der Zucker D-Glukose, D-Saccharose, D-Trehalose und D-Raffinose fand sich ein auffälliger Unterschied bei den *C. zeylanoides* Isolaten. Während alle Isolate den Zucker D-Glukose sowohl aerob als auch anaerob verwerten konnten, konnten die meisten Isolate D-Trehalose lediglich anaerob fermentieren. Ein Isolat (LA-NZ-9_1) konnte als einziges D-Trehalose sowohl anaerob als auch aerob verwerten. Auch bei den als *C. sake* identifizierten Isolaten konnten ähnliche Abweichungen festgestellt werden. Alle Isolate konnten D-Glukose aerob und anaerob verwerten. Drei Isolate (LA-IE-5_9, RD-AUS-8_1, RD-NL-1_1) konnten D-Trehalose nur anaerob fermentieren, und ein Isolat (RD-AUS-8_1) zeigte zusätzlich positive Ergebnisse bei den Fermentationsreaktionen von D-Saccharose und D-Raffinose und negative bei den entsprechenden aeroben Reaktionen.

4.2.3 Molekularbiologische Untersuchungsergebnisse

4.2.3.1 PCR

Im Anschluss an die Amplifikation der Hefe-DNA mittels PCR wurden die Amplifikate mittels UV-Licht als Banden auf dem Agarose-Gel sichtbar gemacht. Positive Ergebnisse in Form von sichtbaren Banden entstanden bei allen 74 Templaten sowohl bei der PCR der D1/D2-Domäne als auch bei der ITS-PCR.

4.2.3.2 Sequenzierung

Bei den insgesamt 74 mittels Sequenzierung untersuchten Hefe-Isolaten ergaben sich je Isolat vier Ergebnis-Sequenzen, die alle mit der Vergleichsdatenbank NCBI (2013) abgeglichen wurden. Bei der Interpretation der Ergebnisse wurden alle vier Ergebnis-Sequenzen je Isolat berücksichtigt. Die Isolate konnten den Gattungen *Candida* sp. (49), *Kazachstania* sp. (10), *Cryptococcus* sp. (5), *Wickerhamomyces* sp. (3), *Rhodotorula* sp. (2), *Bulleromyces* sp. (1) und *Sporobolomyces* sp. (1) zugeordnet werden (Abbildung 31). Drei Isolate konnten keiner Hefe-Gattung zugeordnet werden. Bei diesen Isolaten war lediglich die Einordnung ins Reich der Pilze („*Fungal* sp.“) möglich.

Candida spp.

Einunddreißig der insgesamt 49 *Candida* sp. Isolate wurden als *C. zeylanoides* identifiziert, während zwölf Isolate der Spezies *C. sake* zugeordnet wurden. Ein Isolat wurde als *C. glabosa* identifiziert. Fünf konnten nicht über die Gattungsebene hinaus identifiziert werden. Vier dieser fünf Isolate wurden aus zwei irländischen Lammfleisch- und das fünfte wurde aus einer irländischen Rindfleischprobe isoliert (Abbildung 31) (Tabelle 28).

Kazachstania spp.

Unter den 74 Isolaten befanden sich zehn Isolate der Spezies *K. psychrophila*. Diese Isolate stammten aus einer deutschen Lammfleischprobe und vier australischen, zwei argentinischen, einer deutschen, einer niederländischen und einer uruguayischen Rindfleischprobe (Abbildung 31) (Tabelle 28).

Cryptococcus spp.

Unter den 74 Isolaten befanden sich fünf Isolate der Spezies *Cr. curvatus*, die aus einer irländischen und walisischen Lammfleisch- und einer deutschen Rindfleischprobe isoliert wurden (Abbildung 31) (Tabelle 28).

Tabelle 28: Übersicht über den Zusammenhang der isolierten Hefespezies mit den Probenherkunftsländern

Kontinent	Land	Hefespezies
Amerika (Nord- und Südamerika)	Argentinien	<i>Candida zeylanoides</i>
		<i>Kazachstania psychrophila</i>
		<i>Bulleromyces albus</i>
		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
	Uruguay	<i>Candida zeylanoides</i>
		<i>Kazachstania psychrophila</i>
	USA	<i>Candida zeylanoides</i>
<i>Candida sake</i>		
Europa	Deutschland	<i>Candida zeylanoides</i>
		<i>Candida sake</i>
		<i>Kazachstania psychrophila</i>
		<i>Cryptococcus curvatus</i>
		<i>Sporobolomyces roseus</i>
	Frankreich	<i>Candida zeylanoides</i>
		<i>Candida sake</i>
	Irland	<i>Candida zeylanoides</i>
		<i>Candida sake</i>
		<i>Cryptococcus curvatus</i>
		<i>Candida</i> sp.
		<i>Rhodotorula glutinis</i>
	Niederlande	<i>Candida sake</i>
		<i>Kazachstania psychrophila</i>
		<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
Wales	<i>Cryptococcus curvatus</i>	
	<i>Fungal</i> sp.	
	<i>Candida glabrosa</i>	
Ozeanien	Australien	<i>Candida zeylanoides</i>
		<i>Candida sake</i>
		<i>Kazachstania psychrophila</i>
	Neuseeland	<i>Candida zeylanoides</i>
		<i>Fungal</i> sp.

Wickerhamomyces spp.

Insgesamt konnten anhand der Sequenzierung drei Isolate als *W. anomalus* identifiziert werden (ehemals *Pichia anomala*). Sie wurden aus einer niederländischen Rindfleischprobe isoliert (Abbildung 31) (Tabelle 28).

Rhodotorula spp.

Diese Gattung wurde von den zwei Spezies repräsentiert: *Rh. glutinis* und *Rh. mucilaginosa*. Sie wurden aus einer irländischen Rindfleisch- bzw. einer irländischen Lammfleischprobe isoliert (Abbildung 31) (Tabelle 28).

Bulleromyces spp.

Ein Hefe-Isolat konnte als *B. albus* identifiziert werden, und stammte aus einer argentinischen Rindfleischprobe (Abbildung 31) (Tabelle 28).

Sporobolomyces spp.

Bei einem der 74 Isolate handelte es sich um die Spezies *Sp. roseus*, die aus einer deutschen Rindfleischprobe isoliert wurde (Abbildung 31) (Tabelle 28).

Die meisten Hefe-Isolate stammten aus originalverpackten Fleischproben (Tabelle 29). Irland und Deutschland waren die zwei Länder, die die größte Vielfalt an Hefespezies lieferten. Aus den irländischen und deutschen Fleischproben wurden jeweils fünf unterschiedliche Hefespezies isoliert. Es folgte Argentinien mit vier Hefespezies (*B. albus*, *C. zeylanoides*, *K. psychrophila* und *Rh. mucilaginosa*).

Tabelle 29: Übersicht über die Verpackungsart und die Herkunftsländer der Proben, von denen die Hefe-Isolate stammen

Hefespezies bzw. -gattung (Anzahl der Isolate)	Fleischart	Probenherkunftsland (Anzahl der Isolate)	Verpackungsart	
			OV	WV
<i>Candida glabrosa</i> (1)	Lamm	Wales (1)	x	
		Niederlande (3)	x	
<i>Candida sake</i> (12)	Rind	Australien (2)		x
		Deutschland (3)	x	
		Frankreich (1)	x	
		USA (2)	x	
	Lamm	Irland (1)		x
<i>Candida zeylanoides</i> (31)	Rind	Neuseeland (6)	x	
		Australien (3)		x
		Argentinien (5)	x	
		Uruguay (4)	x	
		Irland (3)	x	
		Frankreich (1)	x	
	USA (1)		x	
	Lamm	Deutschland (5)	x	
		Irland (2)		x
		Neuseeland (1)	x	
<i>Candida</i> spp. (5)	Rind	Irland (1)	x	
	Lamm	Irland (4)	x ¹	x ²
<i>Kazachstania psychrophila</i> (10)	Rind	Australien (4)		x
		Argentinien (2)		x
		Deutschland (1)	x	
		Niederlande (1)	x	
	Uruguay (1)	x		
Lamm	Deutschland (1)	x		
<i>Cryptococcus curvatus</i> (5)	Rind	Deutschland (1)	x	
	Lamm	Irland (2)		x
		Wales (2)	x	
<i>Wickerhamomyces anomalous</i> (3)	Rind	Niederlande (3)	x	
<i>Fungal</i> sp. (3)	Rind	Neuseeland (2)	x	
	Lamm	Wales (1)	x	
<i>Bulleromyces albus</i> (1)	Rind	Argentinien (1)	x	
<i>Rhodotorula glutinis</i> (1)	Rind	Irland (1)	x	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (1)	Lamm	Irland (1)		x
<i>Sporobolomyces roseus</i> (1)	Rind	Deutschland (1)	x	

C.=*Candida*, OV=originalverpackt, WV=in Deutschland wiederverpackt, x¹=eine Probe; x²=eine Probe

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden 60 Rind- und 33 Lammfleischproben aus dem globalen Handel gegen Ende ihrer Haltbarkeit auf das Vorkommen von psychrophilen Hefen untersucht. Parallel dazu wurde der allgemeine bakterielle Status aller Fleischproben ermittelt. Die Rindfleischproben stammten aus Amerika (20), Europa (20) und Ozeanien (20). Die Lammfleischproben stammten aus Europa (20) und Ozeanien (13). Da amerikanisches Lammfleisch im deutschen Handel nicht angeboten wurde, konnten keine Lammfleischproben aus diesem Kontinent bezogen werden. Insgesamt wurden zehn unterschiedliche Hefespezies, die den Gattungen *Bulleromyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Kazachstania*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* sowie *Wickerhamomyces* zugeordnet wurden, aus 36 Fleischproben (26 Rind- und zehn Lammfleischproben) isoliert. Dabei traten bei insgesamt 74 Hefe-Isolaten *C. zeylanoides* (n=31), *C. sake* (n=12) und *K. psychrophila* (n=10) am häufigsten auf. In den verbleibenden Proben (n=57) konnten keine psychrophilen Hefen nachgewiesen werden.

Für eine mikrobiologische Beurteilung der bakteriellen Keimbelastung bei vakuumierten Teilschnitten oder – stücken von Rind- und Lammfleisch sind weder in der EU, noch in Deutschland Richt- oder Warnwerte festgelegt. Die DGHM hat eine Empfehlung für die Belastung mit *Enterobacteriaceae* für rohes Rindfleisch herausgegeben. Dabei wurde ein Richtwert von $1,0 \times 10^4$ KbE/g und ein Warnwert von $1,0 \times 10^5$ KbE/g festgelegt (DGHM, 2011). In der EU-Verordnung Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel sind für die aerobe mesophile Keimzahl von Hackfleisch ein unterer Grenzwert (m) von $5,0 \times 10^5$ KbE/g und ein oberer Grenzwert (M) von $5,0 \times 10^6$ KbE/g festgelegt. THATCHER und CLARK (1975) berichteten, dass bei Fleisch Keimzahlen von $>10^7$ KbE/g einen beginnenden Verderb indizieren. Die Ergebnisse der aeroben und anaeroben mesophilen Keimzahl lagen in der vorliegenden Arbeit bei 71,4 % (44 der 60) bzw. bei 58,8 % (36 der 60) der untersuchten Rindfleischproben im Bereich von 10^7 KbE/g ($1,0 \times 10^7$ bis $9,9 \times 10^7$ KbE/g) oder darüber ($1,0 \times 10^8$ bis $>10^8$ KbE/g), und damit deutlich über dem für Hackfleisch vorgeschriebenen höchsten Grenzwert. Ähnlich verhielt es sich mit den Ergebnissen der aeroben und anaeroben mesophilen Keimzahlen der Lammfleischproben. In beiden Fällen lagen 66,7 % (22 der 33) der untersuchten Lammfleischproben mit ihren Werten im Bereich von 10^7 KbE/g oder darüber. Acht Rindfleisch- und sieben Lammfleischproben mit mesophilen Keimzahlen

über 10^7 KbE/g (aerob, anaerob oder beides) zeigten in der sensorischen Untersuchung einen sauren, unangenehmen oder sogar muffigen Geruch bei der sensorischen Untersuchung (Geruchs-Skala 3 oder 4) und somit erste Verderberscheinungen. Die restlichen der 60 Rindfleisch- und der 33 Lammfleischproben, die mesophile Keimzahlen über dem Bereich 10^7 KbE/g zeigten, wiesen keine sensorischen Veränderungen auf. Bei einer (RD-DE-9) der insgesamt neun Rindfleisch- und einer der insgesamt acht Lammfleischproben, die Geruchsabweichungen zeigten, wurden mesophile Keimzahlen im Bereich von 10^6 KbE/g festgestellt. Bezüglich der Belastung der untersuchten Rindfleischproben mit aeroben und anaeroben *Enterobacteriaceae* lässt sich sagen, dass 53,3 % (32 der 60) bzw. 68,5 % (41 der 60) der untersuchten Rindfleischproben mit ihren Ergebnissen im Bereich 10^5 KbE/g oder höher lagen, und somit den von der DGHM empfohlenen Warnwert von $1,0 \times 10^5$ KbE/g überschritten. Sowohl bei aerober als auch bei anaerober Bebrütung lag die Keimzahl der *Enterobacteriaceae* bei sieben neuseeländischen Rindfleischproben sogar im Bereich 10^7 KbE/g oder höher. Die aeroben und anaeroben Keimzahlen der *Enterobacteriaceae* der Lammfleischproben lagen bei 14 (42,4 %) bzw. 19 (57,5 %) der 33 untersuchten Proben im Bereich 10^5 KbE/g oder höher, und somit über dem von der DGHM empfohlenen Grenzwert. Vier Proben aus Europa (2) und Ozeanien (2) erzielten hierbei Werte von 10^7 KbE/g oder höher. Die Feststellung, dass in vielen Fällen die Keimzahlen der *Enterobacteriaceae* unter anaeroben Bedingungen höher waren, als unter aeroben Bedingungen, bestätigt die Aussage von LAMBERT et al. (1991), dass sich auf unter anaeroben Bedingungen gelagertem Fleisch u.a. *Enterobacteriaceae* zur dominierenden Mikrobiota entwickeln können. Von den neun Rindfleisch- und acht Lammfleischproben, die geruchliche Abweichungen zeigten (Geruchs-Skala 3 und 4) wiesen sechs bzw. vier Proben erhöhte anaerobe *Enterobacteriaceae* Keimzahlen auf. Erhöhte *Enterobacteriaceae* Keimzahlen scheinen sich somit nicht zwingend negativ auf den Fleischgeruch auszuwirken. Die Keimzahlen der unter anaeroben Bedingungen gewachsenen Laktobazillen lagen für die Rindfleischproben zwischen $<10^3$ und $>10^8$ KbE/g und für die Lammfleischproben zwischen $<10^4$ und dem Bereich 10^7 KbE/g ($1,0 \times 10^7$ - $9,9 \times 10^7$ KbE/g). Dabei lagen die Werte von 35 Rindfleisch- und zwölf Lammfleischproben im Bereich 10^6 KbE/g oder höher. Die für die Milchsäurebakterien ermittelten Keimzahlen befanden sich für 33 Rindfleisch- und zwölf Lammfleischproben im Bereich 10^6 KbE/g oder höher. Diese relativ hohen Keimzahlen bekräftigen die Aussagen von SHAW und HARDING (1984), BORCH und MOLIN (1988) und

PENNACCHIA et al. (2011), dass sich bei vakuumverpacktem Fleisch Gattungen der Milchsäurebakterien, u.a. *Lactobacillus*, zur dominierenden Mikrobiota entwickeln bzw. stetig steigen. Auch die Ergebnisse von JONES (2004) dokumentieren bei vakuumverpacktem, gekühltem Rindfleisch nach 16 Wochen Lagerung Keimzahlen von 8,4 und 8,5 Log₁₀ cfu ml⁻¹.

Auch für Pilze finden sich keine rechtlich bindenden Richt- und Warnwerte für Fleisch. Bezüglich der Keimzahlen psychrophiler Hefen auf vakuumverpacktem frischem Rindfleisch finden sich in der Literatur Werte von 2,2x10³ bis 1,6x10⁴ KbE/g (KABISCH et al., 2010). Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Hefekeimzahlen lagen für den Großteil der Rindfleischproben (39/60) zwischen den Bereichen 10² bis 10⁴ KbE/g, und für den Großteil der Lammfleischproben (19/33) zwischen den Bereichen 10² bis 10³ KbE/g. Jedoch lagen die Hefekeimzahlen von 19 Rindfleisch- und 14 Lammfleischproben unter der Nachweisgrenze von 1,0x10² KbE/g. Die Ergebnisse decken sich folglich nur teilweise mit denen von KABISCH et al. (2010). Hinsichtlich der Keimzahlen psychrophiler Hefen auf vakuumverpacktem frischem Lammfleisch findet sich in der Literatur keine Angabe. LOWRY und GILL (1984) stellten in ihrem Versuch mit in Sauerstoff-durchlässiger Folie verpacktem Lammfleisch fest, dass sich die Hefepopulation nach 20 Wochen Lagerung bei -5 °C von 10 KbE/g auf 10⁶ KbE/g deutlich erhöhte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können jedoch nicht direkt mit diesen Keimzahlen verglichen werden, da die Lagerungstemperatur deutlich höher (+4 °C) und die genaue Beschaffenheit bzw. Sauerstoffdurchlässigkeit des Folienmaterials der Lammfleischproben nicht genau definiert war. Um eventuell niedrige Keimzahlen psychrophiler Hefen bei der Isolierung zu erfassen, könnte beim Probenansatz eine größere Probenmenge (>20 g) eingesetzt oder der direkte Platten-Ausstrich des unverdünnten Fleischsaftes vollzogen werden.

Ein Zusammenhang zwischen den Keimzahlen der verschiedenen Bakteriengruppen der untersuchten Rind- und Lammfleischproben oder voneinander abhängige Tendenzen konnten nicht festgestellt werden. Proben mit hohen mesophilen Keimzahlen wiesen manchmal, jedoch nicht immer, parallel hohe *Enterobacteriaceae*-, Milchsäure- und Laktobazillen-Keimzahlen auf. Bei den 17 Fleischproben (neun Rind- und acht Lammfleischproben), die einen unangenehmen Geruch und somit einen beginnenden Verderb aufwiesen, wurden mesophile Keimzahlen in einem Bereich von mindestens 10⁶

KbE/g, teilweise bis $>10^8$ kbE/g nachgewiesen. Die *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen dieser Proben variierten von $<10^3$ KbE/g bis hin zu $>10^8$ und ähnlich verhielt es sich mit den Keimzahlen der Milchsäurebakterien und Laktobazillen dieser Proben. Die Werte der ermittelten Hefekeimzahlen der untersuchten Fleischproben variierten ebenfalls unabhängig von allen anderen Keimzahlen. Aus sechs (LA-DE-1, LA-DE-5, LA-WA-5, RD-AR-5, RD-AR-8, RD-DE-9) der 17 geruchlich veränderten Fleischproben konnten zwölf Hefe-Isolate (*B. albus* (n=1), *Fungal* sp. (n=1), *K. psychrophila* (n=3), *C. sake* (n=1) und *C. zeylanoides* (n=6)) gewonnen werden. Die restlichen 23 Rindfleisch- und sieben Lammfleischproben, aus denen Hefen isoliert wurden, wiesen einen einwandfreien sensorischen Zustand auf.

Für die Isolierung psychrophiler Hefen aus den Rind- und Lammfleischproben wurden der MEA⁺- und der GYP-Agar verwendet. Neben anderen Nährmedien, wie Trypton-Glukose-Hefeextrakt-Agar, Dichloran-Rose-Bengal-Chloramphenicol-Agar, werden sowohl der MEA⁺-Agar als auch der GYP-Agar in der Literatur als gängige Nährmedien zur Isolierung von Hefen aus Lebensmitteln erwähnt (FLEET, 2011). In den meisten Fällen der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden die Hefen auf dem MEA⁺-Agar isoliert, allerdings wurde die Beobachtung gemacht, dass 14 Hefe-Isolate nur auf dem GYP-Agar gewachsen sind und daraus isoliert wurden. Als Grund käme eine bessere Verwertung der Glukose und/oder des Peptons, die im GYP-Agar enthalten sind, infrage. Möglicherweise konnten die aus dem GYP-Agar gewonnenen Isolate Glukose und/oder Pepton schneller und besser verwerten als den im MEA⁺ enthaltenen Malzextrakt, sodass sie entsprechend schneller wuchsen.

Alle auf dem MEA⁺-Agar bzw. auf dem GYP-Agar gewachsenen Hefe-verdächtigen Kolonien wurden lichtmikroskopisch untersucht. Dabei stellte sich oftmals heraus, dass es sich bei morphologisch verdächtigen Kolonien nicht um Hefen, sondern um Bakterien handelte. Das Antibiotikum Novobiocin gehört zu den Aminocoumarinen, und ist wirksam gegen grampositive Bakterien. Seine antibakterielle Aktivität gegenüber gramnegativen Bakterien ist gering (ANDERLE, 2007). Außerdem wurde eine rasche Resistenzentwicklung gegen Novobiocin bei Staphylokokken beobachtet (KIRBY et al., 1956; PERRONNE et al., 1987). Das Wachstum gramnegativer Bakterien der Fleischmikrobiota, wie *Enterobacteriaceae* und Pseudomonaden, und möglicherweise mancher grampositiver Bakterien, wird somit nicht vom Novobiocin gehemmt. Dies erklärt, warum in der vorliegenden Arbeit neben psychrophilen Hefen auch einige psychrotrophe Bakterien unter aeroben Bedingungen bei

+10 °C auf MEA⁺-Agar gewachsen sind. Der Einsatz Hefe-selektiver Platten und/oder die Verwendung zusätzlicher oder anderer Antibiotika könnte dieses Problem minimieren. Gute Ergebnisse erzielt laut LOUREIRO und QUEROL (1999) und FLEET (2011) die Zugabe der Antibiotika Gentamycin, Oxytetracyclin, Streptomycin, Chloramphenicol bzw. Penicillin, bei einer Konzentration von ca. 100 mg/l, wobei auch die Kombination zweier Antibiotika vorgeschlagen wird (LOUREIRO und QUEROL, 1999).

In der Brau- und Weinindustrie kommen verschiedene Selektiv-Agar zum Einsatz, um Hefen mit Verderbspotential sowohl von *S. cerevisiae* innerhalb der Gattung *Saccharomyces* als auch von anderen harmlosen Hefen innerhalb anderer Gattungen, zu differenzieren. Ein Beispiel ist der klassische Lysin-Agar, der in der Brauindustrie weitläufig eingesetzt wird, um den Kontaminationsstatus von Bier mit Nicht-*Saccharomyces*-Spezies zu erfassen (LOUREIRO und QUEROL, 1999). Solche speziellere Nährmedien könnten in der Lebensmittelbranche zum effektiven Nachweis und zur Isolierung von Verderbs-assoziierten Hefen eingesetzt werden.

Insgesamt wurden auf Spezies-Ebene überwiegend morphologische Gemeinsamkeiten der Hefe-Isolate festgestellt. Allerdings wurden auch deutliche makro- und lichtmikroskopische Unterschiede innerhalb der Spezies *C. sake*, *C. zeylanoides* und *K. psychrophila* nachgewiesen.

Die makroskopische Differenzierung der Hefe-Isolate erwies sich als schwierig, da die meisten Hefe-Isolate keine speziell auffallenden phänotypischen Charakteristika, sondern starke Ähnlichkeiten zeigten. Bei den zwölf *C. sake*-Isolaten wurden eine weiße Farbe und cremige oder buttrige Textur sowie ein dickes Wachstum und erhabenes Profil als gemeinsame Charakteristika festgestellt. Allerdings wurde die Oberfläche bei neun der zwölf Isolate als matt beschrieben, während sie bei drei Isolaten glänzend erschien.

Als gemeinsames makroskopisches Charakteristikum wurde bei den 31 *C. zeylanoides*-Isolaten eine weiße oder hellbeige Farbe festgestellt. In Bezug auf die Textur bzw. Konsistenz wurden Unterschiede nachgewiesen (feste Textur mit cremiger, buttriger Konsistenz bei 21 Isolaten, zerlaufene Textur mit schleimiger oder dickflüssiger Konsistenz bei zehn Isolaten). Des Weiteren wurden Unterschiede im Hinblick auf die Wachstumsdicke beobachtet (dünn, mäßig dick oder dick). Neun *C. zeylanoides* Isolate wiesen eine matte Oberfläche auf, während die Oberfläche der restlichen 22 Isolate glänzte. Bei zwölf Isolaten wurde ein, mehr oder weniger stark ausgeprägtes, erhabenes Profil bemerkt. Im Gegensatz dazu zeigten die

Kolonien von 18 der 31 Isolate ein eher flaches Profil. Bei einem Isolat (RD-US-1_1) wurden eine stark gefaltete Oberfläche sowie eine „wollknoll-artige“, deutliche Erhebung festgestellt.

Innerhalb der Spezies *K. psychrophila* wurden bei den zehn Isolaten hauptsächlich makroskopische Unterschiede der Farbe, Textur und Oberfläche ermittelt. Die Kolonien der Hefe-Isolate zeigten ein meist dickes Wachstum. Während die Farbe von fünf Isolaten einen beigen oder dunkelbeigen Ton aufwies, zeigte sie bei den restlichen fünf Isolaten hellere Nuancen von Weiß oder Hellbeige. Die Konsistenz wurde bei fünf Isolaten als buttrig, bei drei Isolaten als cremig und leicht schleimig und bei je einem Isolat als cremig-buttrig bzw. cremig beschrieben. Die Oberfläche von sechs der zehn Isolate war matt, während sie bei den restlichen vier Isolaten glänzte. Es ließ sich bei acht der zehn *K. psychrophila* Isolate ein erhabenes Profil feststellen. Die makroskopische Untersuchung ermöglichte keine Identifizierung der Hefen. In der Literatur finden sich keine Angaben über eine mögliche Identifizierung von Hefen aufgrund ihrer makroskopischen Charakteristika auf gängigen Nährmedien.

Das kommerziell erhältliche chromogene Nährmedium CHROMagar™ Candida ermöglicht eine Isolierung von Hefen aus klinischen Proben. Aufgrund von verschiedenen Farbreaktionen auf diesem Agar kann eine erste, vorläufige Identifizierung einiger wichtiger klinischer Hefespezies (z. B. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* und *S. cerevisiae*) erfolgen (ODDS und BERNAERTS, 1994; BOUCHARA et al., 1996; PFALLER et al., 1996). Der Versuch, diesen speziellen Agar zur Isolierung und Identifizierung von lebensmittelassozierten Hefen einzusetzen, ist in der Literatur beschrieben (DEÁK, 2003; TORNAI-LEHOCZKI et al., 2003). TORNAI-LEHOCZKI et al. (2003) folgerten aus den Ergebnissen ihrer Studie, dass mit dem CHROMagar Candida eine Differenzierung und vorläufige Identifizierung für gewisse aus Lebensmitteln gewonnenen Hefe-Isolate möglich ist. DEÁK (2003) lieferte für zwölf lebensmittelassozierte Hefespezies detaillierte Beschreibungen ihrer Koloniemorphologie auf diesem Agar. Allerdings konnten bestimmte Hefespezies nicht voneinander differenziert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass selbst dieser spezielle chromogene Agar nur eingeschränkt zur Identifizierung von lebensmittelassozierten Hefen einsetzbar ist, und teilweise unzuverlässige Ergebnisse liefert.

Die lichtmikroskopische Untersuchung ermöglichte eine Einteilung der Hefe-verdächtigen-Isolate in die zwei Gruppen der tatsächlichen Hefe-Isolate und der Bakterien. Außerdem ließ sich durch diese Methode bei allen Hefe-Isolaten eine allgemeine phänotypische Charakterisierung erzielen, die die Zellform, die Anwesenheit und Art der Sprossung sowie die Bildung von Pseudohyphen umfasste. Eine Einteilung der Hefe-Isolate auf Gattungs- oder Speziesebene war durch die lichtmikroskopische Untersuchung jedoch nicht möglich. Dies stimmt mit der Aussage von VAN DER KLEI et al. (2011) überein, wonach Hefezellen mit der konventionellen lichtmikroskopischen Untersuchung zwar schnell sichtbar gemacht werden können, allerdings ohne hohe Auflösung. Für eine detailliertere Beurteilung der zellulären Strukturen von Hefezellen, wie z.B. Zellmembran, Ascosporen, Nukleus, Organellen, erweisen sich elektronen- und/oder fluoreszenzmikroskopische Methoden als nützliche und effektive Mittel (VAN DER KLEI et al., 2011).

Auf biochemischer Ebene zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Gattungen, aber auch innerhalb einer Spezies. Unterschiedliches Fermentations- und Assimilationsverhalten der zahlreichen Zucker bzw. Kohlenhydrate ließ sich innerhalb der Spezies *C. zeylanoides*, *C. sake*, *Cr. curvatus*, *K. psychrophila* und *W. anomalus* feststellen. Die Ergebnisse des Fermentationsverhaltens der Spezies *C. glabrosa*, *C. sake*, *K. psychrophila*, *Sp. roseus* und *W. anomalus* stimmen mit den Angaben der Literatur überein (BARNETT et al., 2000; HAMAMOTO et al., 2011; KURTZMAN, 2011; LACHANCE et al., 2011; VAUGHAN-MARTINI et al., 2011; KABISCH et al., 2013). Die Ergebnisse des Fermentationsverhaltens der Spezies *C. zeylanoides*, *Cr. curvatus*, *Rh. glutinis*, *Rh. mucilaginosus* und *B. albus* stimmten mit den Angaben in der Literatur nicht überein (BARNETT et al., 2000; BOEKHOUT, 2011; FONSECA et al., 2011; LACHANCE et al., 2011; SAMPAIO, 2011a; SAMPAIO, 2011b). Die in der Literatur beschriebenen Angaben über das Fermentationsverhalten der Spezies *C. zeylanoides* und *W. anomalus* variieren. So erwähnen LACHANCE et al. (2011) dass *C. zeylanoides* keinerlei Fermentation zeigt, BARNETT et al. (2000) jedoch beschreiben, dass eine schwache Fermentation der Trehalose und manchmal eine, wenn auch verspätete, Fermentation von Glukose möglich ist. Die vorliegenden Befunde des Fermentationsverhaltens decken sich nur teilweise mit den in der Literatur beschriebenen Fermentationsreaktionen. Laut Literatur zeigen die Spezies *C. zeylanoides* (LACHANCE et al., 2011) und *Cr. curvatus* (FONSECA et al., 2011, BARNETT et al., 2000) keinerlei Fermentationsreaktion. Dem widersprechend sind die Ergebnisse dieser Arbeit, die

zeigten, dass alle gewonnenen *Cr. curvatus*- (5) und die *C. zeylanoides*-Isolate (31) dazu in der Lage waren Glukose zu fermentieren, und einzelne Isolate darüber hinaus auch Saccharose, Galaktose, Trehalose bzw. Raffinose anaerob verwerten konnten. Laut Literatur sind *Rh. glutinis* und *Rh. mucilaginosa* nicht dazu in der Lage Zucker zu fermentieren (BARNETT et al., 2000; SAMPAIO, 2011b; SAMPAIO, 2011a). Jedoch zeigten die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, dass *Rh. glutinis* Glukose, Saccharose und Raffinose und *Rh. mucilaginosa* Glukose, Galaktose, Saccharose und Trehalose fermentieren konnten. Außerdem zeigte *B. albus* ein unklares bzw. nicht eindeutiges Ergebnis der Fermentationsreaktion beim Zucker D-Glukose. Dieses Ergebnis widerspricht den Angaben in der Literatur, die die Abwesenheit einer Fermentation durch diese Spezies beschreiben (BARNETT et al., 2000; BOEKHOUT, 2011). Dies zeigt, dass eine Re-Evaluierung des Assimilations- und Fermentationsverhaltens bestimmter Hefespezies begründet ist, da dieses offensichtlich noch nicht ausreichend auf biochemischer Ebene untersucht wurde.

Bezüglich der Fähigkeit der Hefe-Isolate Urea zu hydrolisieren zeigte sich, dass die Spezies *B. albus*, *Cr. curvatus*, *Rh. glutinis*, *Rh. mucilaginosa* und *Sp. roseus* dazu in der Lage waren. Diese Beobachtungen decken sich mit den Angaben von BARNETT et al. (2000) und des Zentralenlabors für Schimmelkulturen (CBS-KNAW, 2013). Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass zwei der fünf gewonnenen *Cr. curvatus*-Isolate Urea nicht hydrolisieren konnten. Eine solche Variabilität bezüglich der Fähigkeit von *Cr. curvatus* Urea zu spalten findet sich in der Literatur nicht (BARNETT et al., 2000, CBS-KNAW, 2013). Das Phänomen, dass Hefen dazu in der Lage sind, sich an unterschiedliche Umgebungs- und Substratverhältnisse anzupassen ist beschrieben (ARTHUR und WATSON, 1976; GASCH et al., 2000; PIPER et al., 2001; GASCH und WERNER-WASHBURNE, 2002; QUEROL et al., 2003). Diese Anpassungsfähigkeit könnte Änderungen der biochemischen Eigenschaften von Hefen zur Folge haben und erklären, warum die Angaben in der Literatur und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit teilweise nicht übereinstimmen. Für die Identifizierung von Hefen scheint die biochemische Charakterisierung nur bedingt nutzbar zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche psychrophilen Hefen im Hinblick auf ihre biochemischen Eigenschaften bei einer Temperatur von +30 °C (API 20 C AUX®) bzw. +37 °C (API Candida®) untersucht. Möglicherweise können psychrophile Hefen bei diesen Temperaturen keine Nährstoffe oder nur eingeschränkt verstoffwechseln, weshalb die Aussagekraft der ermittelten biochemischen Eigenschaften relativiert werden muss.

Die Einordnung der Hefe-Isolate auf Gattungs- und Speziesebene erfolgte molekularbiologisch mittels Sequenzierung. Die für die Amplifikation verwendeten PCR-Protokolle erwiesen sich als zuverlässig und stabil. Die PCR der D1/D2-Domäne des 26S LSU rRNA Gens und die ITS-PCR lieferten ausreichend Amplifikate für die Sequenzierung. Die Sequenzierung der D1/D2-Domäne des 26S LSU rRNA Gens lieferte, mit Ausnahme der noch nicht beschriebenen *Candida*-Spezies bzw. der *Fungal* sp. Isolate, ausschließlich eindeutige Identifizierungsergebnisse und bestätigt, dass diese variable Domäne der Hefe-DNA Spezies-spezifisch ist (KURTZMAN und BOEKHOUT, 2011). In zwei Fällen führte die Sequenzierung des ITS-Genabschnittes zu einem nicht eindeutigen Ergebnis bzw. zu einem zum Identifizierungsergebnis der D1/D2-Domäne widersprüchlichem Ergebnis. Insgesamt wurde festgestellt, dass sowohl die Sequenz der variablen D1/D2-Domäne als auch die des ITS-Genabschnittes, zu zuverlässigen Identifizierungsergebnissen auf Spezies-Ebene führen. KURTZMAN und BOEKHOUT (2011) erwähnen, dass die ITS-Sequenz, die oft in Verbindung mit der D1/D2-Domäne zur Spezies-Differenzierung eingesetzt wird, manchmal eine vergleichsweise höhere Auflösung liefert, als die Sequenz der D1/D2-Domäne. Jedoch konnte mit Untersuchungen gezeigt werden, dass auch der umgekehrte Fall möglich ist (KURTZMAN und BOEKHOUT, 2011). Der Vergleich der Identifizierungsergebnisse beider Sequenzen ist empfehlenswert, da die Übereinstimmung der Ergebnisse die Identifizierungssicherheit erhöht. Bei den acht Hefe-Isolaten, die mittels Sequenzierung lediglich ins Reich der Pilze bzw. in die Gattung *Candida* eingeteilt werden konnten, handelt es sich höchstwahrscheinlich um neue Hefespezies, deren Gensequenzen zwar in der Sequenz-Datenbank von GenBank (NCBI) hinterlegt sind, aber eine Spezies-Beschreibung bis dato aussteht.

Mit Ausnahme des *B. albus* Isolates wurden alle in dieser Arbeit gewonnenen und mittels Sequenzierung eindeutig identifizierten Hefe-Isolate bereits aus Fleisch und/oder Fleischprodukten bzw. –Erzeugnissen isoliert. Aus vakuumverpacktem Rindfleisch wurden vier der isolierten Hefespezies, *C. zeylanoides*, *C. sake*, *Cr. curvatus* und *K. psychrophila*, bereits von KABISCH et al. (2010, 2013) und ERL-HÖNING (2014) isoliert. Die Gensequenzen der acht gewonnenen Isolate, die mittels Sequenzierung lediglich in die Gattung *Candida* (5) bzw. ins Reich der Pilze (3) eingeteilt werden konnten, sind in der Datenbank von NCBI hinterlegt. Aus den dort abrufbaren Informationen lässt sich kein Zusammenhang zwischen diesen Isolaten und vakuumverpacktem Fleisch erkennen (NCBI, 2013). Die

Isolierungsquellen dieser Hefespezies, sofern angegeben, waren Meeresfisch und Hühnchenfleisch in MAP-Verpackung (Modified Atmosphere Packaging) (NCBI, 2013). Mit Fleischverderb konnten bisher die Hefespezies *C. zeylanoides* und *Cr. curvatus* assoziiert werden, die aus verdorbenem Rind- bzw. Geflügelfleisch isoliert wurden (HSIEH und JAY, 1984; VILJOEN et al., 1998). Außerdem wurde in Versuchen von ERL-HÖNING (2014) gezeigt, dass die von KABISCH et al. (2013) neu beschriebene Hefespezies *K. psychrophila* Verderb von vakuumverpacktem Rindfleisch verursachen kann. Die Hefespezies *W. anomalus*, die ebenfalls in der vorliegenden Arbeit isoliert wurde, wird einerseits mit dem Verderb von Bier (DUFOUR et al., 2003) und Backwaren (LANCIOTTI et al., 1998; BONJEAN und GUILLAME, 2003) in Zusammenhang gebracht und andererseits in die Gruppe jener Hefen eingeteilt, die für die Fermentation von Kakao- und Kaffeebohnen nötig sind (SCHWAN und WHEALS, 2003; MASOUD und JESPERSEN., 2006). Da sich unter anaeroben Bedingungen psychrophile Hefen auf Fleisch zunehmend vermehren (LOWRY und GILL, 1984), liegt die Annahme nahe, dass jene Hefespezies mit Verderbspotential zum Verderb von vakuumverpacktem Fleisch führen können, vor allem wenn die Lagerzeit des Fleisches über 20 Wochen beträgt. Da Hefezellen in der Regel bei +60 bis +65°C schnell inaktiviert werden (FLEET, 2011), ist davon auszugehen, dass eine gängige Wärmebehandlung von vakuumverpacktem Fleisch vor dem Verzehr ausreicht, um eventuell vorhandene Hefezellen abzutöten. Bereits vorhandene Verderberscheinungen werden dadurch allerdings nicht beeinflusst.

Aus diversen Fleischerzeugnissen, die vor dem Verzehr in der Regel keiner Wärmebehandlung unterzogen werden (z. B. trockengepökelte Wurst, Salami, fermentierte Würste), wurden verschiedene Hefespezies (z. B. *C. zeylanoides*, *C. vinaria*, *Cr. albidus*, *Cr. laurentii*, *D. hansenii*, *Rh. glutinis*) isoliert (Tabelle 6). Die Aufnahme von Hefen durch den Konsum von Lebensmitteln kann für diverse allergische bzw. hypersensitive Reaktionen beim Menschen, wie z.B. gastrointestinale, pulmonale und dermatologische Störungen (CROOK, 1984; FLEET und BALIA, 2006) verantwortlich sein. Im Rahmen einer Prävention dieser Krankheitsstörungen beim Menschen wäre eine Evaluierung des Hefe-Keimzahl-Status bei den genannten Fleischprodukten bzw. -Erzeugnissen hilfreich.

Die klinische Bedeutung und Pathogenität der in dieser Arbeit isolierten Hefespezies variiert. *C. sake* und *Rh. glutinis* scheinen kein Pathogenitätspotential zu besitzen (LACHANCE et al., 2011; SAMPAIO, 2011a). Die Spezies *C. zeylanoides*, *Cr. curvatus*, *Rh. mucilaginosus* und *W. anomalus* dagegen werden in der Literatur als opportunistisch pathogene Erreger

beschrieben (PAULA et al., 2006; PARK et al., 2008; FONSECA et al., 2011; LACHANCE et al., 2011; SAMPAIO, 2011b). *Sp. roseus* wurde aus mykotischen Läsionen auf Schleimhäuten isoliert (BOEKHOUT und GUÉHO, 2003), doch bis vor kurzem als nicht pathogen eingestuft (HAMAMOTO et al., 2011). In der neueren Literatur finden sich jedoch zwei Fallberichte, die diese Hefespezies mit einer granulomatösen Meningoenzephalitis bei einem Deutschen Schäferhund bzw. einer akuten Meningitis bei einem jungen, immunkompetenten männlichen Patienten assoziieren (SAEY et al., 2011; MCNICHOLAS et al., 2012). Die Infektionswege waren dabei vermutlich hämatogen bzw. aerogen. Es stellt sich die Frage, ob diese opportunistisch pathogenen Hefespezies dazu in der Lage sind, gewisse Resistenzen gegen Umwelteinflüsse und/oder gegen immunologische Abwehrmechanismen zu entwickeln, die es ihnen ermöglichen den oralen oder oral-fäkalen Infektionsweg zu nutzen. Die hierfür relevanten aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisse umfassen den DNA-Transfer zwischen weit entfernten Hefe-Gattungen (MENTEL et al., 2006) und die mögliche Induktion einer Thermoresistenz bei *C. sake* und *S. cerevisiae* (TILIGADA et al., 1999; CAÑAMÁS et al., 2008). Die Toxinproduktion zahlreicher Hefe-Gattungen, mitunter *Candida* und *Cryptococcus*, und das damit verbundene „killer-yeast“-Phänomen ist bekannt, und die Pathogenität dieser „killer yeasts“ für marine Krebstiere, wie Schrimps und Krabben beschrieben (MAGLIANI et al., 1997; SCHMITT und BREINIG, 2002).

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnene Isolate *B. albus* und *Sp. roseus* wurden erstmalig aus vakuumverpacktem Fleisch isoliert. *B. albus* wurde bisher lediglich aus diversen Umweltquellen wie Luft, Blättern, Stroh, Gras, aus dem Kot eines Käfers und aus der Luft in einer Molkerei isoliert (BOEKHOUT, 2011). Die Bedeutung dieser Hefespezies im Hinblick auf die Landwirtschaft, die Lebens- und Futtermittel ist, genauso wie seine Pathogenität und sein Verderbspotential, unbekannt (BOEKHOUT, 2011). *Sp. roseus* ist in der Phyllosphäre vieler Pflanzen (TUBAKI, 1953; LAST, 1955; VAN DER BURG, 1974), in der Luft (HIRST, 1953) und in Meerwasser (HERNANDEZ-SAAVEDRA et al., 1990) weit verbreitet. Ebenfalls wurde *Sp. roseus* aus erkrankten Kartoffeln (HAMAMOTO et al., 2011) und Salami (WOLTER et al., 2000) isoliert, jedoch bisher nicht aus vakuumverpacktem Fleisch. Die acht Hefe-Isolate, die mittels Sequenzierung lediglich ins Reich der Pilze bzw. in die Gattung *Candida* eingeteilt werden konnten, sind höchstwahrscheinlich neue Hefespezies, die bisher weder biochemisch noch morphologisch beschrieben worden sind. Auch über deren Verderbs- und Pathogenitätspotential liegen keine Daten vor.

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse über die Hefemikrobiota zeigen, dass bei vakuumverpacktem Fleisch sowohl die Hefekeimzahlen als auch die Vielfalt an Hefespezies stark variieren. Gerade die noch nicht beschriebenen psychrophilen Spezies (*Candida* sp., „*Fungal* sp.“), *B. albus* und *Sp. roseus* sind von großem wissenschaftlichem Interesse, da über ihre Pathogenität und ihr Verderbspotential bis dato nichts bekannt ist. Im Angesicht dieser Tatsachen sollten weitere wissenschaftliche Studien durchgeführt werden, um u.a. die Toxinproduktion sowie die Eigenschaften von lebensmittelrelevanten Hefen genauer zu definieren. Dadurch wäre eine Einschätzung ihres Verderbspotentials und des potentiellen gesundheitlichen Risikos, das von ihnen ausgeht, möglich.

6 Zusammenfassung

Psychrophile Hefen sind ubiquitär in der Umwelt verbreitet und befinden sich auch auf gekühlten Lebensmitteln. Somit werden sie vom Menschen oral aufgenommen. Unter ihnen befinden sich Gattungen, die Verderbspotential besitzen oder opportunistisch pathogene Spezies beinhalten. Außerdem ist bekannt, dass die orale Aufnahme von Hefen bei manchen Menschen zur Entstehung diverser gesundheitlicher Syndrome führen kann. Zu ihnen zählen primär Störungen des Magendarmtraktes, das chronische Müdigkeitssyndrom, Allergien und Migräne.

Über das Vorkommen von Hefen auf vakuumverpacktem, gekühltem Rindfleisch gibt es bisher wenige Untersuchungen. Daten bezüglich gekühltem, vakuumverpacktem Lammfleisch aus dem globalen Handel sind bisher nicht verfügbar. Ziel dieser Arbeit war es, eine Übersicht über die Hefemikrobiota von vakuumverpacktem Rind- und Lammfleisch zu liefern. Dabei wurden verschiedene Kontinente und Länder miteinander verglichen, um eventuelle qualitative und /oder quantitative Unterschiede aufzuzeigen. Insgesamt wurden 74 Hefe-Isolate aus 26 Rind- und zehn Lammfleischproben von insgesamt 93 untersuchten Fleischproben gewonnen. Die gewonnenen Isolate wurden den Gattungen *Bulleromyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Kazachstania*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* und *Wickerhamomyces* zugeordnet, wobei *C. zeylanoides*, *C. sake* und *K. psychrophila* die dominierenden Hefespezies waren. In dieser Arbeit konnten die Isolate *B. albus* und *Sp. roseus* erstmalig aus vakuumverpacktem Fleisch isoliert werden. Bei acht Hefe-Isolaten handelt es sich vermutlich um neue Hefespezies.

Die Mehrheit der Fleischproben, aus denen die Hefe-Isolate stammen, zeigte einen sensorisch einwandtfreien Zustand sowie Pack Blowing Scores von maximal zwei. Von den 26 Rindfleisch- und zehn Lammfleischproben, aus denen die Hefe-Isolate stammen, zeigten sechs Fleischproben erste Verderberscheinungen. Diese Proben hatten einen unangenehmen, sauren oder muffigen Geruch. Ein Zusammenhang zwischen den geruchlichen Abweichungen der sechs Fleischproben und einem möglichen Verderbspotential der aus diesen Proben isolierten Hefespezies (*B. albus*, *C. glabosa*, *C. sake*, *C. zeylanoides*, *K. psychrophila* und „*Fungal sp.*“) kann nicht ausgeschlossen werden. Mit weiteren wissenschaftlichen Arbeiten sollte das biochemische und physikalische Profil sowie die Toxinproduktion der in dieser Arbeit gewonnenen Hefespezies untersucht werden.

Dadurch wäre eine Einschätzung des Verderbs- und möglichen Pathogenitätspotentials dieser lebensmittelrelevanten Hefen möglich.

7 Summary

Psychrophile yeasts are ubiquitously distributed and are also present in chilled food. Therefore they can be digested by humans. Some of these yeasts genus include species with spoilage or pathogenicity potential. It is recognized that the oral uptake of yeasts may lead to several health disturbances in some humans. Among these there are disorders of the gastrointestinal tract, chronic fatigue syndrome, allergies and migraine headaches.

There is little research work which focuses on the occurrence of yeasts in chilled, vacuum-packed beef available up to now. Research data concerning lamb from global trade is not available. The objective of the present study was to provide an overview of the yeast microbiota of chilled vacuum-packed beef and lamb. Meat samples (93) of different continents and countries were compared in order to take into account possible quality or quantity differences. In total, 74 yeast isolates were collected from 26 beef and ten lamb samples. The collected yeast isolates were assigned to the genus *Bulleromyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Kazachstania*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* and *Wickerhamomyces*, whereby *C. zeylanoides*, *C. sake* and *K. psychrophila* were the dominating species. In the present study *B. albus* and *Sp. roseus* were firstly isolated from vacuum-packed meat. Eight yeast isolates belonging to *Candida* spp. and „*Fungal* sp.“ are not yet described at species level. They are probably new yeast species.

The majority of the meat samples from which the yeasts isolates were collected showed unobjectionable sensory characteristics and low Pack Blowing Scores (maximum 2). Six of the 36 meat samples (26 beef, ten lamb) which provided the 74 yeasts isolates showed initial alterations associated with spoilage. Concerning these meat samples there were noted unpleasant, sour or musty odours. A relationship between the sensory changes of these six altered meat samples and the yeast species isolated from them (*B. albus*, *C. glabrosa*, *C. sake*, *C. zeylanoides*, *K. psychrophila* and „*Fungal* sp.“) cannot be ruled out.

The properties as well as the toxin production of the yeast species isolated in this work should be further examined by future scientific studies. This knowledge would allow a better assessment of the spoilage and possible pathogenicity potential of these food-associated yeasts.

8 Literaturverzeichnis

ADAM, K.H., FLINT, S.H., BRIGHTWELL, G., 2010. Psychrophilic and psychrotrophic clostridia: sporulation and germination processes and their role in the spoilage of chilled, vacuum-packaged beef, lamb and venison. *International Journal of Food Science & Technology* 45, 1539-1544.

AHN, C., STILES, M.E., 1990. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. *Journal of Applied Microbiology* 69, 302-310.

AINSWORTH, G.C., 1986. *History of medical and veterinary mycology*. Cambridge University Press, Cambridge, 1-13.

ANDERLE, C., 2007. *Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Biosynthese der Aminocoumarin-Antibiotika Novobiocin und Clorobiocin*. Dissertation. Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

ANDRADE, M.J., RODRÍGUEZ, M., SÁNCHEZ, B., ARANDA, E., CÓRDOBA, J.J., 2006. DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology* 107, 48-58.

ARGYRI, A.A., DOULGERAKI, A.I., BLANA, V.A., PANAGOUE, E.Z., NYCHAS, G.J., 2011. Potential of a simple HPLC-based approach for the identification of the spoilage status of minced beef stored at various temperatures and packaging systems. *International Journal of Food Microbiology* 150, 25-33.

ARTHUR, H., WATSON, K., 1976. Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. *Journal of Bacteriology* 128, 56-68.

ASEFA, D.T., MØRETRØ, T., GJERDE, R.O., LANGSRUD, S., KURE, C.F., SIDHU, M.S., NESBAKKEN, T., SKAAR, I., 2009. Yeast diversity and dynamics in the production processes of Norwegian dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology* 133, 135-140.

AUGUSTINI, C., FISCHER, K., 1999. Fleischreifung und sensorische Qualität. *Fleischwirtschaft* 79, 96-98.

AYRES, J.C., 1960. Temperature relationships and some other characteristics of the microbial flora developing on refrigerated beef. *Journal of Food Science* 25, 1-18.

BAB'EVA, I.P., LISICHKINA, G.A., RESHETOVA, I.S., DANILEVICH, V.N., 2002. *Mrakia curviuscula* sp. nov.: A New Psychrophilic Yeast from Forest Substrates. *Microbiology* 71, 449-454.

BANKS, J.G., BOARD, R.G., 1987. Some factors influencing the recovery of yeasts and moulds from chilled foods. *International Journal of Food Microbiology* 4, 197-206.

BARNETT, J.A., PAYNE, R.W., YARROW, D., 2000. *Yeasts: characteristics and identification*, Third Edition. Cambridge University Press, New York, USA, 1-1139.

BEH, A.L., FLEET, G.H., PRAKITCHAIWATTANA, C., HEARD, G.M., 2006. Evaluation of molecular methods for the analysis of yeasts in foods and beverages. In: Hocking, A.D., Pitt, J.I., Samson, R.A., Thrane, U. (Eds.), *Advances in Food Mycology*. Springer Science, New York, 69–106.

BELL, R.G., 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* 36, 381-396.

BELTRAME, A., SARMATI, L., CUDILLO, L., CERRETTI, R., PICARDI, A., ANEMONA, L., FONTANA, C., ANDREONI, M., ARCESE, W., 2009. A fatal case of invasive fungal sinusitis by *Scopulariopsis acremonium* in a bone marrow transplant recipient. *International Journal of Infectious Diseases* 13, e488-e492.

BERRY, D.R., WATSON, D.C., 1987. Production of organoleptic compounds. In: Berry, D.R., Russell, I., Stewart, G.G. (Eds.), *Yeast Biotechnology*. Springer Netherlands, 345-368.

BINKE, R., 2004. Vom Muskel zum Fleisch. *Fleischwirtschaft* 5, 224-227.

BLICKSTAD, E., ENFORS, S.O., MOLIN, G., 1981. Effect of Hyperbaric Carbon Dioxide Pressure on the Microbial Flora of Pork Stored at 4 or 14°C. *Journal of Applied Microbiology* 50, 493-504.

BLICKSTAD, E., MOLIN, G., 1983. The microbial flora of smoked pork loin and frankfurter sausage stored in different gas atmospheres at 4 °C. *Journal of Applied Microbiology* 54, 45-56.

BLIXT, Y., BORCH, E., 2002. Comparison of shelf life of vacuum-packed pork and beef. *Meat Science* 60, 371-378.

BMELV, 2013. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. Statistiken und Berichte. Begriffsdefinitionen. Zugriffsdatum 18.11.2013, <http://www.bmelv-statistik.de>.

BODDY, L., WIMPENNY, J.W.T., 1992. Ecological concepts in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology* 73, 23-38.

BOEKHOUT, T., GUÉHO, E., 2003. Basidiomycetous yeasts. In: Howard, D.-H. (Ed.) *Pathogenic Fungi in Humans and Animals*. Marcel Dekker, New York, 535-564.

BOEKHOUT, T., 2011. *Bulleromyces* Boekhout & A´. Fonseca (1991). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, 1391-1394.

BOEREMA, J.A., BRODA, D.M., BELL, R.G., 2003. Abattoir sources of psychrophilic clostridia causing blown pack spoilage of vacuum-packed chilled meats determined by culture-based and molecular detection procedures. *Letters in Applied Microbiology* 36, 406-411.

BOEREMA, J.A., BRODA, D.M., PENNEY, N., BRIGHTWELL, G., 2007. Influence of peroxyacetic acid based carcass rinse on the onset of 'blown pack' spoilage in artificially inoculated vacuum-packed chilled beef. *Journal of Food Protection* 70, 1434-1439.

BÖHME, C.F., 1981. Die Reifung und Lagerung von Fleisch in Verbundfolienbeuteln. *Die Fleischerei* 32, 786-788.

BONJEAN, B., GUILLAME, L.-D., 2003. Yeasts in bread and baking products. In: Boekhout, T., Robert, V. (Eds.), *Yeasts in Food. Beneficial and Detrimental Aspects*. Behr's Verlag, Hamburg, 289-307.

BORCH, E., MOLIN, G., 1988. Numerical taxonomy of psychrotrophic lactic acid bacteria from prepacked meat and meat products. *Antonie van Leeuwenhoek* 54, 301-323.

BORCH, E., BERG, H., HOLST, O., 1991. Heterolactic fermentation by a homofermentative *Lactobacillus* sp. during glucose limitation in anaerobic continuous culture with complete cell recycle. *Journal of Applied Bacteriology* 71, 265-269.

BORCH, E., KANT-MUERMANS, M.-L., BLIXT, Y., 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 103-120.

BOUCHARA, J.-P., DECLERCK, P., CIMON, B., PLANCHENAULT, C., DE GENTILE, L., CHABASSE, D., 1996. Routine use of CHROMagar Candida medium for presumptive identification of *Candida* yeast species and detection of mixed fungal populations. *Clinical Microbiology and Infection* 2, 202-208.

BOUZA, E., MUÑOZ, P., 2004. Invasive infections caused by *Blastoschizomyces capitatus* and *Scedosporium* spp. *Clinical Microbiology and Infection* 10, 76-85.

BRODA, D.M., DELACY, K.M., BELL, R.G., PENNEY, N., 1996a. Association of psychrotrophic *Clostridium* spp. with deep tissue spoilage of chilled vacuum-packed lamb. *International Journal of Food Microbiology* 29, 371-378.

BRODA, D.M., DELACY, K.M., BELL, R.G., BRAGGINS, T.J., COOK, R.L., 1996b. Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with 'blown pack' spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. *International Journal of Food Microbiology* 29, 335-352.

BRODA, D.M., SAUL, D.J., LAWSON, P.A., BELL, R.G., MUSGRAVE, D.R., 2000. *Clostridium gasigenes* sp. nov., a psychrophile causing spoilage of vacuum-packed meat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 107-118.

BRODA, D.M., BOEREMA, J.A., BELL, R.G., 2003. PCR detection of psychrophilic *Clostridium* spp. causing 'blown pack' spoilage of vacuum-packed chilled meats. *Journal of Applied Microbiology* 94, 515-522.

CAÑAMÁS, T.P., VIÑAS, I., USALL, J., MAGAN, N., SOLSONA, C., TEIXIDÓ, N., 2008. Impact of mild heat treatments on induction of thermotolerance in the biocontrol yeast *Candida sake* CPA-1 and viability after spray-drying. *Journal of Applied Microbiology* 104, 767-775.

CANTONI, C., BREGOLI, M., BERNARDINI, M., 2000. *Brochothrix thermosphacta* in meat and some meat products. *Industrie Alimentari* 39, 976-979.

CASTELLANO, P.H., HOLZAPFEL, W.H., VIGNOLO, G.M., 2004. The control of *Listeria innocua* and *Lactobacillus sakei* in broth and meat slurry with the bacteriocinogenic strain *Lactobacillus casei* CRL705. *Food Microbiology* 21, 291-298.

CAVILL, L., RENTERIA-MONTERRUBIO, A.L., HELPS, C.R., CORRY, J.E.L., 2011. Detection of cold-tolerant clostridia other than *Clostridium estertheticum* in raw vacuum-packed chill-stored meat. *Food Microbiology* 28, 957-963.

CBS-KNAW, 2013. The Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) Fungal Biodiversity Centre. Zugriff am 10.06.2013, <http://www.cbs.knaw.nl/>.

CHANG, C.L., PARK, T.H., LEE, E.Y., LIM, Y.T., SON, H.C., 2001. Recurrent self-limited fungemia caused by *Yarrowia lipolytica* in a patient with acute myelogenous leukemia. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 1200-1201.

CHAYAKULKEEREE, M., PERFECT, J.R., 2006. Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America* 20, 507-544.

CHEN, Y.-C., CHANG, S.-C., SUN, C.-C., YANG, L.-S., HSIEH, W.-C., LUH, K.-T., 1997. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections at a teaching hospital in Taiwan, 1981 to 1993. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 18, 369-375.

CHURCH, I.J., PARSONS, A.L., 1995. Modified atmosphere packaging technology: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 67, 143-152.

COCOLIN, L., URSO, R., RANTSIOU, K., CANTONI, C., COMI, G., 2006. Dynamics and characterization of yeasts during natural fermentation of Italian sausages. *FEMS Yeast Res* 6, 692-701.

COOPER, C.R., 2011. Yeasts pathogenic to humans. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, 9-19.

CROOK, W.G., 1984. The yeast connection: A medical breakthrough, 2 Edition. Professional Books (Jackson, Tenn.), 1-336,

DAINTY, R., SHAW, B., ROBERTS, T., 1983. Microbial and chemical changes in chill-stored red meats. In: Society for Applied Bacteriology symposium series 11, 151.

DAINTY, R.H., EDWARDS, R.A., HIBBARD, C.M., 1989. Spoilage of vacuum-packed beef by a clostridium sp. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 49, 473-486.

DAINTY, R.H., MACKEY, B.M., 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Microbiology* 73, 103-114.

DE GARCÍA, V., BRIZZIO, S., LIBKIND, D., BUZZINI, P., VAN BROECK, M., 2007. Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiology Ecology* 59, 331-341.

DE LORENZO, V., 2011. Genes that move the window of viability of life: Lessons from bacteria thriving at the cold extreme. *BioEssays* 33, 38-42.

DEÁK, T., 2001. Identification of yeasts isolated from poultry meat. *Acta Biologica Hungarica* 52, 195-200.

DEÁK, T., 2003. Detection, enumeration and isolation of yeasts. In: Boekhout, T., Robert, V. (Eds.), *Yeasts in Food: Beneficial and Detrimental Aspects*. Behr's Verlag, Hamburg, 39-68.

DEÁK, T., 2008. *Handbook of food spoilage yeasts*, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1-325.

DGHM, 2011. Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e. V. Veröffentlichte mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln http://www.dghm.org/m_275. Zugriffsdatum 01.08.2013.

DIAS, L., DIAS, S., SANCHO, T., STENDER, H., QUEROL, A., MALFEITO-FERREIRA, M., LOUREIRO, V., 2003. Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiology* 20, 567-574.

DIRIYE, F.U., SCORZETTI, G., MARTINI, A., 1993. Methods for the separation of yeast cells from the surfaces of processed, frozen foods. *International Journal of Food Microbiology* 19, 27-37.

DOULGERAKI, A.I., PARAMITHIOTIS, S., KAGKLI, D.M., NYCHAS, G.-J.E., 2010. Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Food Microbiology* 27, 1028-1034.

DOULGERAKI, A.I., ERCOLINI, D., VILLANI, F., NYCHAS, G.-J.E., 2012. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology* 157, 130-141.

DUBOIS, G., BEAUMIER, H., CHARBONNEAU, R., 1979. Inhibition of bacteria isolated from ground meat by *Streptococcaceae* and *Lactobacillaceae*. *Journal of Food Science* 44, 1649-1652.

DUFOUR, J.-P., VERSTREPEN, K., DERDELINCKX, G., 2003. Brewing yeasts. In: Boekhout, T., Robert, V. (Eds.), *Yeasts in Food. Beneficial and Detrimental Aspects*. Behr's Verlag, Hamburg, 347-388.

EATON, K.K., HOWARD, M.A., 1998. Fungal-type dysbiosis of the gut: The occurrence of fungal diseases and the response to challenge with yeasty and mould-containing Foods. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine* 8, 247-255.

EDWARDS, R.A., DAINITY, R.H., 1987. Volatile compounds associated with the spoilage of normal and high pH vacuum-packed pork. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 38, 57-66.

EGAN, A., EUSTACE, I., SHAY, B., 1988. Meat packaging—maintaining the quality and prolonging the storage life of chilled beef, pork and lamb. *Meat 88: Proceedings of Industry Day*, 68-75.

EGAN, A.F., SHAY, B.J., ROGERS, P.J., 1989. Factors affecting the production of hydrogen sulphide by *Lactobacillus sake* L13 growing on vacuum-packaged beef. *Journal of Applied Bacteriology* 67, 255-262.

EKLUND, M.W., SPINELLI, J., MIYAUCHI, D., GRONINGER, H., 1965. Characteristics of yeasts isolated from Pacific crab meat. *Applied Microbiology* 13, 985-990.

EL-SHAROUD, W.M., BELLOCH, C., PERIS, D., QUEROL, A., 2009. Molecular identification of yeasts associated with traditional Egyptian dairy products. *Journal of Food Science* 74, 341-346.

ENCINAS, J.-P., LÓPEZ-DÍAZ, T.-M.A., GARCÍA-LÓPEZ, M.A.-L., OTERO, A., MORENO, B., 2000. Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Science* 54, 203-208.

ERCOLINI, D., RUSSO, F., TORRIERI, E., MASI, P., VILLANI, F., 2006. Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Applied Environmental Microbiology* 72, 4663-4671.

ERCOLINI, D., RUSSO, F., BLAIOTTA, G., PEPE, O., MAURIELLO, G., VILLANI, F., 2007. Simultaneous detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, and *P. putida* from meat by use of a Multiplex PCR Assay targeting the *carA* Gene. *Applied Environmental Microbiology* 73, 2354-2359.

ERCOLINI, D., RUSSO, F., NASI, A., FERRANTI, P., VILLANI, F., 2009. Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. *Appl Environ Microbiol* 75, 1990-2001.

ERCOLINI, D., FERROCINO, I., LA STORIA, A., MAURIELLO, G., GIGLI, S., MASI, P., VILLANI, F., 2010a. Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. *Food Microbiology* 27, 137-143.

ERCOLINI, D., CASABURI, A., NASI, A., FERROCINO, I., DI MONACO, R., FERRANTI, P., MAURIELLO, G., VILLANI, F., 2010b. Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall behaviour as meat spoilers. *International Journal of Food Microbiology* 142, 120-131.

ERCOLINI, D., FERROCINO, I., NASI, A., NDAGIJIMANA, M., VERNOCCHI, P., LA STORIA, A., LAGHI, L., MAURIELLO, G., GUERZONI, M.E., VILLANI, F., 2011. Monitoring of microbial metabolites and bacterial diversity in beef stored under different packaging conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 7372-7381.

ERER, B., GALIMBERTI, M., LUCARELLI, G., GIARDINI, C., POLCHI, P., BARONCIANI, D., GAZIEV, D., ANGELUCCI, E., IZZI, G., 2000. *Trichosporon beigeli*: a life-threatening pathogen in immunocompromised hosts. *Bone marrow transplantation* 25, 745-749.

ERL-HÖNING, C., 2014. Psychrotolerante Hefen in vakuumverpacktem Fleisch. Dissertation. Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilian-Universität, München.

FAO, 2006. Food Outlook Global Market Analysis June 2006. Trade and Market Division of FAO under Global Information and Early Warning System (GIEWS) <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/J7927e/J7927e00.pdf>, Zugriffsdatum 04.02.2014.

FAO, 2007. Food Outlook Global Market Analysis November 2007. Trade and Market Division of FAO under Global Information and Early Warning System (GIEWS) <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/ah876e/ah876e00.pdf>, Zugriffsdatum 04.02.2014.

FAO, 2008. Food Outlook Global Market Analysis November 2008. Trade and Market Division of FAO under Global Information and Early Warning System (GIEWS) <http://www.fao.org/docrep/013/a1969e/a1969e00.pdf>, Zugriffsdatum 04.02.2014.

FAO, 2010. Food Outlook Global Market Analysis November 2010. Trade and Market Division of FAO under Global Information and Early Warning System (GIEWS) <http://www.fao.org/docrep/013/a1969e/a1969e00.pdf>, Zugriffsdatum 04.02.2014.

FAO, 2011. Food Outlook Global Market Analysis November 2011. Trade and Market Division of FAO under Global Information and Early Warning System (GIEWS) <http://www.fao.org/docrep/014/a1981e/a1981e00.pdf>, Zugriffsdatum 04.02.2014

FAO, 2012. Food Outlook Global Market analysis. Trade and Market Division of FAO under Global Information and Early Warning System (GIEWS) <http://www.fao.org/giews/english/fo/index.htm#2012>, Zugriffsdatum 23.09.2013.

FAOSTAT, 2013. Food Supply, Livestock and Fish Primary Equivalent. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/C/CL/E>, Zugriffsdatum 23.09.2013.

FEHLHABER, K., 2004. Verderb. In: Sinell, H.-J. (Ed.) Einführung in die Lebensmittelhygiene. Parey Verlag, Stuttgart, 107-133.

FELL, J.W., BOEKHOUT, T., FONSECA, A., SCORZETTI, G., 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* 50, 1351-1371.

FERNANDEZ-ESPINAR, M.T., MARTORELL, P., DE LLANOS, R., QUEROL, A., 2006. Molecular methods to identify and characterize yeasts in food and beverages. In: Querol, A., Fleet, G.H. (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages*. Springer, Berlin, 55-82.

FLEET, G.H., 1992. Spoilage yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology* 12, 1-44.

FLEET, G.H., MIAN, M.A., 1998. Induction and repair of sublethal injury in food spoilage yeasts. *Journal of Food Mycology* 1, 85-93.

FLEET, G.H., 2006. *Saccharomyces* and related genera. In: Blackburn, C.d.W. (Ed.) *Food Spoilage Microorganisms*. Woodhead Publishing, Cambridge, 306-335.

FLEET, G.H., BALIA, R., 2006. The Public Health and probiotic significance of yeasts in foods and beverages. In: Querol, A., Fleet, G.H. (Eds.), *The Yeast Handbook. Yeasts in Food and Beverages*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 381-397.

FLEET, G.H., 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research* 8, 979-995.

FLEET, G.H., 2011. Yeast Spoilage of Food and Beverages. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., BOEKHOUT, T. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, 53-63.

FLEISCHATLAS, 2013. Daten und Fakten über Tiere als Nahrungsmittel. Heinrich-Böll-Stiftung, Bund für Umwelt- und Naturschutz und Le Monde diplomatique. Druck AZ Druck, Berlin, 18-19.

FLEISCHATLAS, 2014. Daten und Fakten über Tiere als Nahrungsmittel. Heinrich-Böll-Stiftung, Bund für Umwelt- und Naturschutz Deutschland und Le Monde diplomatique. Möller Druck, Ahrensfelde, 10-11, 36-37.

FONSECA, A., BOEKHOUT, T., FELL, J.W., 2011. *Cryptococcus* Vuillemin (1901). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, 1661-1737.

FONTANA, C., COCCONCELLI, P.S., VIGNOLO, G., 2006. Direct molecular approach to monitoring bacterial colonization on vacuum-packaged beef. *Appl Environ Microbiol* 72, 5618-5622.

FUNG, D.Y., 2010. Microbial hazards in foods: foodborne infections and intoxications. In: Toldra, F. (Ed.) *Handbook of Meat Processing*. Blackwell Publishing, USA, 481-500.

GARDINI, F., SUZZI, G., LOMBARDI, A., GALGANO, F., CRUDELE, M.A., ANDRIGHETTO, C., SCHIRONE, M., TOFALO, R., 2001. A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. *FEMS Yeast Res* 1, 161-167.

GASCH, A.P., SPELLMAN, P.T., KAO, C.M., CARMEL-HAREL, O., EISEN, M.B., STORZ, G., BOTSTEIN, D., BROWN, P.O., 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell* 11, 4241-4257.

GASCH, A.P., WERNER-WASHBURNE, M., 2002. The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Functional and Integrative Genomics* 2, 181-192.

GILL, C.O., NEWTON, K.G., 1977. The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology* 43, 189-195.

GILL, C.O., NEWTON, K.G., 1978. The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. *Meat Science* 2, 207-217.

GILL, C.O., 1983. Meat spoilage and evaluation of the potential storage life of fresh meat. *Journal of Food Protection* 46, 444-452.

GILL, C.O., PENNEY, N., 1985. Modification of in-pack conditions to extend the storage life of vacuum packaged lamb. *Meat Science* 14, 43-60.

GILL, C.O., MOLIN, G., 1991. Modified atmospheres and vacuum packaging. In: Russell, N.J., Gould, G.W. (Eds.), *Food Preservatives*. Blackie, London, 172-199.

GILL, C.O., 1996. Extending the storage life of raw chilled meats. *Meat Science* 43, Supplement 1, 99-109.

GIRMENIA, C., PAGANO, L., MARTINO, B., D'ANTONIO, D., FANCI, R., SPECCHIA, G., MELILLO, L., BUELLI, M., PIZZARELLI, G., VENDITTI, M., MARTINO, P., 2005. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 1818-1828.

GOUNOT, A.-M., 1991. Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications. *Journal of Applied Microbiology* 71, 386-397.

GRAM, L., RAVN, L., RASCH, M., BRUHN, J.B., CHRISTENSEN, A.B., GIVSKOV, M., 2002. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 78, 79-97.

GRANCHI, L., GANUCCI, D., MESSINI, A., VINCENZINI, M., 2002. Oenological properties of *Hanseniaspora osmophila* and *Kloeckera corticis* from wines produced by spontaneous fermentations of normal and dried grapes. *FEMS Yeast Research* 2, 403-407.

GRANT, E., 1979. Food allergies and migraine. *The Lancet* 313, 966-969.

GREER, G.G., GILL, C.O., DILTS, B.D., 1994. Evaluation of the bacteriological consequences of the temperature regimes experienced by fresh chilled meat during retail display. *Food Research International* 27, 371-377.

GRINBAUM, A., ASHKENAZI, I., TREISTER, G., GOLDSCHMIED-REQUVEN, A., BLOCK, C.S., 1994. Exploding bottles: eye injury due to yeast fermentation of an uncarbonated soft drink. *Br J Ophthalmol* 78, 883.

GUERZONI, M.E., LANCIOTTI, R., MARCHETTI, R., 1993. Survey of the physiological properties of the most frequent yeasts associated with commercial chilled foods. *International Journal of Food Microbiology* 17, 329-341.

HAMAMOTO, M., BOEKHOUT, T., NAKASE, T., 2011. *Sporobolomyces* Kluver & van Niel (1924). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, 1929-1990.

HAZEN, K.C., 1995. New and emerging yeast pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* 8, 462-478.

HEINZ, G., 1974. Gekühlte vakuumverpackte Teilstücke vom Rind unter den Bedingungen einer verlängerten Lagerzeit. *Die Fleischwirtschaft* 10, 1635-1638.

HERNANDEZ-SAAVEDRA, N.Y., HERNANDEZ, S.D., VAZQUESM, J.R., OCHOA, J.L., 1990. Distribution of *Sporobolomyces* (Kluver et van Niel) genera in the western coast of Baja California Sur, Mexico. *Yeast Taxonomy: Theoretical and Practical Aspects*, Proc. 14th International Symposium on Yeasts, Smolenice, Slovak Republic, 74.

HIRST, J.M., 1953. Changes in atmospheric spore content: diurnal periodicity and the effects of water. *Transactions of the British Mycological Society* 36, 375-393.

HOFMANN, K., 1973. Was ist Fleischqualität? *Fleischwirtschaft* 53, 485.

HOLDS, G., EDDIE, S., COLBY, P., KIERMAIER, A., 2010. Extended shelf-life evaluation of sliced lamb shoulders. MLA Final Report. Meat and Livestock Australia Limited, 1-68.

HONIKEL, K.-O., 2004. Vom Fleisch zum Produkt. Fleischwirtschaft 5, 228-234.

HONIKEL, K.-O., SCHWÄGELE, F., 2006. Fleischhygiene: Mikrobiologische Risiken. In: Branscheid, W., Honikel, K.-O., von Lengerken, G., Troeger, K. (Eds.), Qualität von Fleisch und Fleischwaren. Deutscher Fachverlag, Frankfurt am Main, 727-751.

HOY, J., HSU, K.-C., ROLSTON, K., HOPFER, R.L., LUNA, M., BODEY, G.P., 1986. *Trichosporon beigelii* Infection: A Review. Reviews of Infectious Diseases 8, 959-967.

HSIEH, D.Y., JAY, J.M., 1984. Characterization and identification of yeasts from fresh and spoiled ground beef. International Journal of Food Microbiology 1, 141-147.

HUBER, I., 2012. Persönliche Mitteilung.

JACQUES, N., CASAREGOLA, S., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. International Journal of Food Microbiology 126, 321-326.

JAY, J.M., MARGITIC, S., 1981. Incidence of yeasts in fresh ground beef and their ratios to bacteria. Journal of Food Science 46, 648-649.

JIANG, Y., GAO, F., XU, X.L., SU, Y., YE, K.P., ZHOU, G.H., 2010. Changes in the bacterial communities of vacuum-packaged pork during chilled storage analyzed by PCR-DGGE. Meat Science 86, 889-895.

JOHANNSEN, E., NIEMAND, J.G., EAGLE, L., BREDENHANN, G., 1984. Yeast flora of non-radurised and radurised minced beef — a taxonomic study. International Journal of Food Microbiology 1, 217-227.

JOHNSON, E.A., ECHAVARRI-ERASUN, C., 2011. Yeast Biotechnology. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), The Yeasts, a Taxonomic Study. Elsevier, 21-44.

JONES, R.J., 1999. Immunisation against lactic-acid bacteria as a technique to extend the chilled storage life of vacuum-packed lamb. Food & Agricultural Immunology 11, 75-81.

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 90, 273-282.

KABISCH, J., ZIEGLER, E., STAUFENBIEL, A., HECHELMANN, H.-G., PICHNER, R., GAREIS, M., 2010. Isolierung und Identifizierung von psychrophilen Hefen aus vakuumverpacktem Rindfleisch. Mitteilungsblatt Fleischforschung Kulmbach 49, 196-206.

KABISCH, J., HÖNING, C., BÖHNLEIN, C., PICHNER, R., GAREIS, M., WENNING, M., 2013. *Kazachstania psychrophila* sp. nov., a novel psychrophilic yeast isolated from vacuum-packed beef. *Antonie van Leeuwenhoek* 104 (6), 925-931.

KATO, Y., SAKALA, R.M., HAYASHIDANI, H., KIUCHI, A., KANEUCHI, C., OGAWA, M., 2000. *Lactobacillus algidus* sp. nov., a psychrophilic lactic acid bacterium isolated from vacuum-packaged refrigerated beef. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 50, 1143-1149.

KAUFFMAN, C.A., 2006. Fungal infections. *Proceedings of the American Thoracic Society* 3, 35-40.

KIRBY, W.M., HUDSON, D.G., NOYES, W.D., 1956. Clinical and laboratory studies of Novobiocin, a new antibiotic. *A.M.A. Archives of Internal Medicine* 98, 1-7.

KLOTZ, S.A., 1989. *Malassezia furfur*. *Infectious disease clinics of North America* 3, 53-64.

KOOHMARAIE, M., DOUMIT, M.E., WHEELER, T.L., 1996. Meat toughening does not occur when rigor shortening is prevented. *Journal of Animal Science* 74, 2935-2942.

KOOHMARAIE, M., 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* 74, 34-43.

KRCMERY JR, V., MATEIČKA, F., KUNOVÁ, A., ŠPÁNIK, S., GYARFÁŠ, J., SYČOVÁ, Z., TRUPL, J., 1999. Hematogenous trichosporonosis in cancer patients: report of 12 cases including 5 during prophylaxis with itraconazol. *Supportive Care in Cancer* 7, 39-43.

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

KURTZMAN, C.P., FELL, J.W., 2006. Yeast systematics and phylogeny – implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: Rosa, C.A., Peter, G. (Eds.), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer Verlag, 11-30.

KURTZMAN, C.P., 2011. *Wickerhamomyces* Kurtzman, Robnett & Basehoar-Powers (2008). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, 899-917.

KURTZMAN, C.P., BOEKHOUT, T., 2011. Gene sequence analyses and other DNA-based methods for yeast species recognition. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, 137-144.

KURTZMAN, C.P., FELL, J.W., BOEKHOUT, T., ROBERT, V., 2011. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, 87-110.

LABADIE, J., 1999. Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Science* 52, 299-305.

LABUZA, T.P., FU, B., 1993. Growth kinetics for shelf-life prediction: Theory and practice. *Journal of Industrial Microbiology* 12, 309-323.

LACHANCE, M.A., BOEKHOUT, T., SCORZETTI, G., FELL, J.W., KURTZMAN, C.P., 2011. *Candida Berkhout* (1923). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, 987-1278.

LAMBERT, A.D., SMITH, J.P., DODDS, K.L., 1991. Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat — a review. *Food Microbiology* 8, 267-297.

LANCIOTTI, R., SINIGAGLIA, M., GARDINI, F., GUERZONI, M.E., 1998. *Hansenula anomala* as spoilage agent of cream-filled cakes. *Microbiological Research* 153, 145-148.

LAST, F.T., 1955. Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. *Transactions of the British Mycological Society* 38, 221-239.

LAURSEN, B.G., BAY, L., CLEENWERCK, I., VANCANNEYT, M., SWINGS, J., DALGAARD, P., LEISNER, J.J., 2005. *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 151-164.

LEE, K.-T., YOON, C.-S., 2001. Quality changes and shelf life of imported vacuum-packaged beef chuck during storage at 0°C. *Meat Science* 59, 71-77.

LEISNER, J.J., LAURSEN, B.G., PREVOST, H., DRIDER, D., DALGAARD, P., 2007. *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS Microbiology Reviews* 31, 592-613.

LI, M.Y., ZHOU, G.H., XU, X.L., LI, C.B., ZHU, W.Y., 2006. Changes of bacterial diversity and main flora in chilled pork during storage using PCR-DGGE. *Food Microbiology* 23, 607-611.

LIAO, C.H., 2006. *Pseudomonas* and related genera. In: Blackburn, C.d.W. (Ed.) *Food Spoilage Microorganisms*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 213-286.

LIBKIND, D., BRIZZIO, S., RUFFINI, A., GADANHO, M., VAN BROECK, M., PAULO SAMPAIO, J., 2003. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek* 84, 313-322.

LMKV, 1999. Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung. Bundesgesetzblatt Jahrgang 1999, Teil I Nr. 56, ausgegeben zu Bonn am 22. Dezember 1999. Zugriff am 10.08.2013, 2466-2473.

LOPANDIC, K., ZELGER, S., BÁNSZKY, L.K., ELISKASES-LECHNER, F., PRILLINGER, H., 2006. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology* 23, 341-350.

LOUREIRO, V., QUEROL, A., 1999. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends in Food Science & Technology* 10, 356-365.

LOWRY, P., GILL, C., 1984. Development of a yeast microflora on frozen lamb stored at -5° C. *Journal of Food Protection* 47, 309.

LÜCKE, F.-K., TROEGER, K., 2006. Mikrobiologische Risiken. In: Branscheid, W., Honikel, K.-O., von Lengerken, G., Troeger, K. (Eds.), *Qualität von Fleisch und Fleischwaren*. Deutscher Fachverlag, Frankfurt am Main, 553-624.

MAGLIANI, W., CONTI, S., GERLONI, M., BERTOLOTTI, D., POLONELLI, L., 1997. Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews* 10, 369-400.

MARCON, M.J., POWELL, D.A., 1992. Human infections due to *Malassezia* spp. *Clinical Microbiology Reviews* 5, 101-119.

MARTINO, P., VENDITTI, M., MICOZZI, A., MORACE, G., POLONELLI, L., MANTOVANI, M.P., PETTI, M.C., BURGIO, V.L., SANTINI, C., SERRA, P., MANDELLI, F., 1990. *Blastoschizomyces capitatus*: An emerging cause of invasive fungal disease in leukemia patients. *Review of Infectious Diseases* 12, 570-582.

MARTORELL, P., BARATA, A., MALFEITO-FERREIRA, M., FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T., LOUREIRO, V., QUEROL, A., 2006. Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *International Journal of Food Microbiology* 106, 79-84.

MASOUD, W., JESPERSEN, L., 2006. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. *International Journal of Food Microbiology* 110, 291-296.

MATARAGAS, M., DROSINOS, E.H., VAIDANIS, A., METAXOPOULOS, I., 2006. Development of a predictive model for spoilage of cooked cured meat products and its validation under constant and dynamic temperature storage conditions. *Journal of Food Science* 71, 157-167.

MCNICHOLAS, S., MCDERMOTT, H., POWER, L., JOHNSON, E.M., MORONEY, J., HUMPHREYS, H., SMYTH, E.G., 2012. *Sporobolomyces roseus* in the cerebrospinal fluid of an immunocompetent patient – to treat or not to treat? *Journal of Medical Microbiology* 61, 295-296.

MENDES-FERREIRA, A., MENDES-FAIA, A., LEÃO, C., 2002. Survey of hydrogen sulphide production by wine yeasts. *Journal of Food Protection* 65, 1033-1037.

MENTEL, M., ŠPÍREK, M., JØRCK-RAMBERG, D., PIŠKUR, J., 2006. Transfer of genetic material between pathogenic and food-borne yeasts. *Applied and environmental microbiology* 72, 5122-5125.

MOLIN, G., TERNSTROM, A., 1982. Numerical taxonomy of psychrotrophic pseudomonads. *J Gen Microbiol* 128, 1249-1264.

MOORE, M.M., STROM, M.S., 2003. Infection and mortality by the yeast *Metschnikowia bicuspidata* var. *bicuspidata* in chinook salmon fed live adult brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Aquaculture* 220, 43-57.

MORITA, R.Y., 1975. Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews* 39, 144-167.

NCBI, 2013. National Center of Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Zugriff am 02.09.2013.

NIELSEN, D.S., JACOBSEN, T., JESPERSEN, L., KOCH, A.G., ARNEBORG, N., 2008. Occurrence and growth of yeasts in processed meat products - Implications for potential spoilage. *Meat Science* 80, 919-926.

NIEMINEN, T.T., VIHAVAINEN, E., PALORANTA, A., LEHTO, J., PAULIN, L., AUVINEN, P., SOLISMAA, M., BJÖRKROTH, K.J., 2011. Characterization of psychrotrophic bacterial communities in modified atmosphere-packed meat with terminal restriction fragment length polymorphism. *International Journal of Food Microbiology* 144, 360-366.

NYCHAS, G.J.E., DROSINOS, E.H., BOARD, R.G., 1998. Chemical changes in stored meat. In: Davies, A., Board, R.G. (Eds.), *The Microbiology of Meat and Poultry*. Academic & Professional, London, 288-326.

NYCHAS, G.J.E., SKANDAMIS, P.N., 2005. Fresh meat spoilage and modified atmosphere packaging (MAP). In: Sofos, J.N. (Ed.) *Improving the safety of fresh meat*. CRC/Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 461-502.

NYCHAS, G.J.E., SKANDAMIS, P.N., TASSOU, C.C., KOUTSOUMANIS, K.P., 2008. Meat spoilage during distribution. *Meat Science* 78, 77-89.

ODDS, F.C., BERNAERTS, R., 1994. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 1923-1929.

- OLSSON, C., AHRNÉ, S., PETTERSSON, B., MOLIN, G., 2003. The bacterial flora of fresh and chill-stored pork: analysis by cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *International Journal of Food Microbiology* 83, 245-252.
- OSEI ABUNYEWA, A.A., LAING, E., HUGO, A., VILJOEN, B.C., 2000. The population change of yeasts in commercial salami. *Food Microbiology* 17, 429-438.
- PANIKOV, N.S., SIZOVA, M.V., 2007. Growth kinetics of microorganisms isolated from Alaskan soil and permafrost in solid media frozen down to -35°C . *FEMS Microbiology Ecology* 59, 500-512.
- PAPPAGIANIS, D., COLLINS, M., HECTOR, R., REMINGTON, J., 1979. Development of resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae* infecting a human. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 16, 123-126.
- PARK, K.-A., AHN, K., CHUNG, E.-S., CHUNG, T.-Y., 2008. *Pichia anomala* fungal keratitis. [Report]. *Cornea* June 27, 619-620.
- PAULA, C.R., KREBS, V.L.J., AULER, M.E., RUIZ, L.S., MATSUMOTO, F.E., SILVA, E.H., DINIZ, E.M.A., VAZ, F.A.C., 2006. Nosocomial infection in newborns by *Pichia anomala* in a brazilian intensive care unit. *Medical Mycology* 44, 479-484.
- PEDERSON, C.S., ALBURY, M.N., WILSON, D.C., LAWRENCE, N.L., 1959. The growth of yeasts in grape juice stored at low temperatures. I. Control of yeast growth in commercial operation. *Applied Microbiology* 7, 1-6.
- PENNACCHIA, C., ERCOLINI, D., VILLANI, F., 2011. Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack. *Food Microbiology* 28, 84-93.
- PERRONNE, C.M., MALINVERNI, R., GLAUSER, M.P., 1987. Treatment of *Staphylococcus aureus* endocarditis in rats with coumermycin A1 and ciprofloxacin, alone or in combination. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 31, 539-543.
- PFALLER, M.A., HOUSTON, A., COFFMANN, S., 1996. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 58-61.
- PICHNER, R., ZIEGLER, E., ECKARDT, S., KABISCH, J., HECHELMANN, H., GAREIS, M., 2012. Nachweis von Blown Pack verursachenden Bakterien in gekühltem Rindfleisch: Optimierter Nachweis und Isolierung von *Cl. estertheticum* und *Cl. estertheticum*-like Organismen in vakuumverpacktem Rindfleisch. *Fleischwirtschaft* 92, 117-124.
- PIN, C., GARCÍA DE FERNANDO, G.D., ORDÓÑEZ, J.A., 2002. Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4441-4447.

PIPER, P., CALDERON, C.O., HATZIXANTHIS, K., MOLLAPOUR, M., 2001. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology* 147, 2635-2642.

POLACHECK, I., SALKIN, I.F., KITZES-COHEN, R., RAZ, R., 1992. Endocarditis caused by *Blastoschizomyces capitatus* and taxonomic review of the genus. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 2318-2322.

PURRINOS, L., GARCIA FONTAN, M.C., CARBALLO, J., LORENZO, J.M., 2013. Study of the counts, species and characteristics of the yeast population during the manufacture of dry-cured "lacon". Effect of salt level. *Food Microbiology* 34, 12-18.

QUEROL, A., FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T., DEL OLMO, M.L., BARRIO, E., 2003. Adaptive evolution of wine yeast. *International Journal of Food Microbiology* 86, 3-10.

QUINDÓS, G., CABRERA, F., ARILLA, M.D.C., BURGOS, A., ORTIZ-VIGÓN, R., CAÑÓN, J.L., PONTÓN, J., 1994. Fatal *Candida famata* peritonitis in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis who was treated with Fluconazole. *Clinical Infectious Diseases* 18, 658-660.

QUIRÓS, M., MARTORELL, P., QUEROL, A., BARRIO, E., PEINADO, J.M., DE SILÓNIZ, M.-I., 2008. RESEARCH ARTICLE: Four new *Candida cretensis* strains isolated from Spanish fermented sausages (chorizo): Taxonomic and phylogenetic implications. *FEMS Yeast Research* 8, 485-491.

RACCACH, M., BAKER, R.C., 1978. Lactic acid bacteria as an antispoilage and safety factor in cooked, mechanically deboned poultry meat. *Journal of Food Protection* 41 (9), 703-705.

RATTANASOMBOON, N., BELLARA, S.R., HARDING, C.L., FRYER, P.J., THOMAS, C.R., AL-RUBEAI, M., MCFARLANE, C.M., 1999. Growth and enumeration of the meat spoilage bacterium *Brochothrix thermosphacta*. *International Journal of Food Microbiology* 51, 145-158.

REDLINE, R.W., REDLINE, S.S., BOXERBAUM, B., DAHMS, B.B., 1985. Systemic *Malassezia furfur* infections in patients receiving intralipid therapy. *Human Pathology* 16, 815-822.

REUTER, G., 2003. Mikrobiologie des Fleisches. In: Weber, H. (Ed.) *Mikrobiologie der Lebensmittel. Fleisch-Fisch-Feinkost*. Behr's Verlag, Hamburg, 1-111.

RKI, 2012. Epidemiologie der Kryptokokkose in Deutschland von 2004 bis 2010. *Epidemiologisches Bulletin* 29. Robert Koch Institut, 275-278.

RODAS-GONZÁLEZ, A., NARVÁEZ-BRAVO, C., BRASHEARS, M.M., ROGERS, H.B., TEDFORD, J.L., CLARK, G.O., BROOKS, J.C., JOHNSON, B.J., RATHMANN, R.J., MILLER, M.F., 2011. Evaluation of the storage life of vacuum packaged Australian beef. *Meat Science* 88, 128-138.

RUSSO, F., ERCOLINI, D., MAURIELLO, G., VILLANI, F., 2006. Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups. *Food Microbiology* 23, 797-802.

SAEY, V., VANHAESEBROUCK, A., MAES, S., VAN SIMAEY, L., VAN HAM, L., DESCHAGHT, P., DUCATELLE, R., 2011. Granulomatous meningoencephalitis associated with *Sporobolomyces roseus* in a dog. *Veterinary Pathology* 48, 1158-1160.

SAKALA, R.M., KATO, Y., HAYASHIDANI, H., MURAKAMI, M., KANEUCHI, C., OGAWA, M., 2002a. *Lactobacillus fuchuensis* sp. nov., isolated from vacuum-packaged refrigerated beef. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1151-1154.

SAKALA, R.M., HAYASHIDANI, H., KATO, Y., HIRATA, T., MAKINO, Y., FUKUSHIMA, A., YAMADA, T., KANEUCHI, C., OGAWA, M., 2002b. Change in the composition of the microflora on vacuum-packaged beef during chiller storage. *International Journal of Food Microbiology* 74, 87-99.

SAMELIS, J., STAVROPOULOS, S., KAKOURI, A., METAXOPOULOS, J., 1994. Quantification and characterization of microbial populations associated with naturally fermented Greek dry salami. *Food Microbiology* 11, 447-460.

SAMELIS, J., SOFOS, J.N., 2003. Yeasts in meat and meat products. In: Boekhout, T., Robert, V. (Eds.), *Yeasts in Food. Beneficial and detrimental aspects*. Behr's Verlag, Hamburg, 239-265.

SAMELIS, J., 2006. Managing microbial spoilage in meat industry. In: Blackburn, C.W. (Ed.) *Food Spoilage Microorganisms*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 213-286.

SAMPAIO, J.P., 2011a. *Rhodospiridium* Banno (1967). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, 1523-1539.

SAMPAIO, J.P., 2011b. *Rhodotorula* Harrison (1928). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, 1873-1927.

SAVELL, J.W., 2008. Dry-aging of beef. Executive summary. Texas A&M University. Center for Research and Knowledge Management, National cattlemen's beef association, 1-12.

SCHMITT, M.J., BREINIG, F., 2002. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 257-276.

SCHWAN, R.F., WHEALS, A.E., 2003. Mixed microbial fermentations of chocolate and coffee. In: Boekhout, T., Robert, V. (Eds.), *Yeasts in Food. Beneficial and Detrimental Aspects*. Behr's Verlag, Hamburg, 429-449.

SCORZETTI, G., FELL, J.W., FONSECA, A., STATZELL-TALLMAN, A., 2002. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Res* 2, 495-517.

SEUß-BAUM, I., 2006. Ernährungsphysiologische Bedeutung von Fleisch und Fleischerzeugnissen. In: Branscheid, W., Honikel, K.-O., von Lengerken, G., Troeger, K. (Eds.), *Qualität von Fleisch und Fleischwaren*. Deutscher Fachverlag Frankfurt am Main, 755-776.

SHAW, B.G., HARDING, C.D., TAYLOR, A.A., 1980. The microbiology and storage stability of vacuum packed lamb. *International Journal of Food Science & Technology* 15, 397-405.

SHAW, B.G., HARDING, C.D., 1984. A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon. *Journal of Applied Microbiology* 56, 25-40.

SHAW, B.G., PUCKEY, D.J., MACFIE, H.J.H., BOLT, S.J., 1985. Classification of some lactic acid bacteria from vacuum-packed meats by direct probe mass spectrometry. *Journal of Applied Microbiology* 59, 157-165.

SILVA, A.R., PAULO, É.N., SANT'ANA, A.S., CHAVES, R.D., MASSAGUER, P.R., 2011. Involvement of *Clostridium gasigenes* and *C. algidicarnis* in 'blown pack' spoilage of Brazilian vacuum-packed beef. *International Journal of Food Microbiology* 148, 156-163.

STANBRIDGE, L.H., DAVIES, A.R., 1998. The microbiology of chill-stored meat. In: Davies, A., Board, R. (Eds.), *Microbiology of Meat and Poultry*. Blackie Academic and Professional London, 174.

STATISTA, 2014. Das Statistik-Portal. Zugriff am 01.03.2014. <http://de.statista.com/statistik/daten/studie/1723/umfrage/weltbevoelkerung-nach-kontinenten/>

STEINBACH, W.J., SCHELL, W.A., MILLER, J.L., PERFECT, J.R., MARTIN, P.L., 2004. Fatal *Scopulariopsis brevicaulis* infection in a paediatric stem-cell transplant patient treated with voriconazole and caspofungin and a review of *Scopulariopsis* infections in immunocompromised patients. *Journal of Infection* 48, 112-116.

STEINFELD, H., MOONEY, H.A., SCHNEIDER, F., NEVILLE, L.E., 2010. *Livestock in a changing landscape: divers, consequences and responses*, Vol 1. Island Press, 1-416,

STRATFORD, M., 2006. Food and beverage spoilage yeasts. In: Querol, A., Fleet, G. (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages*. Springer-Verlag, Berlin, 335-380.

SUKROONGREUNG, S., KITINIYOM, K., NILAKUL, C., TANTIMAVANICH, S., 1998. Pathogenicity of basidiospores of *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans*. *Medical Mycology* 36, 419-424.

- SUN, Y., SUN, Q., 1998. Studies on pathogenic organism and prevention and cure for explosive epidemic disease of parent prawn of *Macrobrachium rosenbergh*. Journal of Fisheries of China 22, 56-60.
- TÄNDLER, K., HEINZ, G., 1970. Fleischreifung im Vakuumbbeutel. Fleischwirtschaft 9, 1185-1190.
- TEGLIA, O., SCHOCH, P.E., CUNHA, B.A., 1991. *Malassezia furfur* Infections. Infection Control and Hospital Epidemiology 12, 676-681.
- THANH, V.N., HAI, D.A., HIEN, D.D., TAKASHIMA, M., LACHANCE, M.A., 2012. *Moniliella carnis* sp. nov. and *Moniliella dehoogii* sp. nov., two novel species of black yeasts isolated from meat processing environments. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 62, 3088-3094.
- THATCHER, F.S., CLARK, D.S., 1975. Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration, Vol 2. University of Toronto Press, Toronto and Buffalo, Canada, 1-224.
- TILIGADA, E., MILIGKOS, V., YPSILANTIS, E., PAPAMICHAEL, K., DELITHEOS, A., 1999. Molybdate induces thermotolerance in yeast. Letters in Applied Microbiology 29, 77-80.
- TORNAI-LEHOCZKI, J., PÉTER, G., DLAUCHY, D., 2003. CHROMagar *Candida* medium as a practical tool for the differentiation and presumptive identification of yeast species isolated from salads. International Journal of Food Microbiology 86, 189-200.
- TSIGARIDA, E., SKANDAMIS, P., NYCHAS, G.J.E., 2000. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. Journal of Applied Microbiology 89, 901-909.
- TUBAKI, K., 1953. Studies on the *Sporobolomycetaceae* in Japan: III. On *Sporobolomyces* and *Bullera*. Nagaoa 3, 12-21.
- TUDOR, E.A., BOARD, R.G., 1993. Food spoilage yeasts. In: Rose, A.H., Harrison, J.S. (Eds.), The Yeasts. Academic Press, London, 435-516.
- TURCHETTI, B., BUZZINI, P., GORETTI, M., BRANDA, E., DIOLAIUTI, G., D'AGATA, C., SMIRAGLIA, C., VAUGHAN-MARTINI, A., 2008. Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. FEMS Microbiology Ecology 63, 73-83.
- VAN DER BURG, A.C., 1974. The occurrence of *Sporobolomyces roseus*, a red yeast, on leaves of *Phragmites australis*. Free University Amsterdam, Graduate Press, 1-79.
- VAN DER KLEI, I., VEENHUIS, M., BRUL, S., KLIS, F.M., DE GROOT, P.W.J., MÜLLER, W.H., VAN DRIEL, K.G.A., BOEKHOUT, T., 2011. Cytology, cell walls and septa: A summary of yeast cell

biology from a phylogenetic perspective. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, 111-128.

VAN DER WALT, J.P., 1970. Criteria and methods used in classification. In: Lodder, J. (Ed.) *The Yeasts, a Taxonomic Study*. North-Holland Publishing, Amsterdam, 34-113.

VANDERZANT, C., SAVELL, L.K., GARDNER, F.A., SMITH, G.C., 1983. Effect of addition of glucose, citrate and citrate-lactic acid on microbiological and sensory characteristics of steaks from normal and dark, firm and dry beef carcasses displayed in polyvinyl-chloride film and in vacuum packages. *Journal of Food Protection* 46, 775-780.

VAUGHAN-MARTINI, A., LACHANCE, M.A., KURTZMAN, C.P., 2011. *Kazachstania* Zubkova (1971). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, 439-470.

VILJOEN, B.C., GEORNARAS, I., LAMPRECHT, A., VON HOLY, A., 1998. Yeast populations associated with processed poultry. *Food Microbiology* 15, 113-117.

VISSER, I., KOOLMEES, P., BIJKER, P., 1988. Microbiological conditions and keeping quality of veal tongues as affected by lactic acid decontamination and vacuum packaging. *Journal of food protection* 51, 208-213.

WAGNER, D., SANDER, A., BERTZ, H., FINKE, J., KERN, W., 2005. Breakthrough invasive infection due to *Debaryomyces hansenii* (teleomorph *Candida famata*) and *Scopulariopsis brevicaulis* in a stem cell transplant patient receiving liposomal amphotericin B and caspofungin for suspected aspergillosis. *Infection* 33, 397-400.

WALKER, G., M., 1998. *Yeast. Physiology and Biotechnology*. John Wiley and Sons, Chichester, 1-362.

WALSH, T.J., NEWMAN, K.R., MOODY, M., WHARTON, R.C., WADE, J.C., 1986. Trichosporonosis in patients with neoplastic disease. *Medicine* 65(4), 268-279.

WALSH, T.J., MELCHER, G.P., LEE, J.W., PIZZO, P.A., 1993. Infections due to *Trichosporon* species: new concepts in mycology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Curr Top Med Mycol* 5, 79-113.

WANG, X., CHI, Z., YUE, L., LI, J., LI, M., WU, L., 2007. A marine killer yeast against the pathogenic yeast strain in crab (*Portunus trituberculatus*) and an optimization of the toxin production. *Microbiological Research* 162, 77-85.

WARNOCK, D.W., JOHNSON, E.M., 1991. Clinical manifestations and management of hyalohyphomycosis, phaeohyphomycosis and other uncommon forms of fungal infection in the compromised patient. In: Warnock, D.W., Richardson, M.D. (Eds.), *Fungal infection in the compromised patient*. John Wiley & Sons Ltd, 247-310.

- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M., Gelfand, D., Shinsky, J., White, T. (Eds.), PCR protocols: a guide for methods and applications. Academic Press, New York, 315-322.
- WICKERHAM, L.J., 1951. Taxonomy of yeasts. Technical Bulletin 1029. US Department of Agriculture, Washington, D.C., 1-51.
- WINDHORST, H.-W., 2012. Die Zukunft der globalen Tierproduktion. Unter besonderer Berücksichtigung der Rolle Deutschlands. In: Burger, H.-G. (Ed.) Welternährung: Welche Verantwortung hat Europa? DLG-Verlag, Frankfurt, M., 127-147.
- WOLTER, H., LAING, E., VILJOEN, B.C., 2000. Isolation and Identification of Yeasts Associated with Intermediate Moisture Meats. Food Technology and Biotechnology 38, 69-75.
- WONG, B., KIEHN, T.E., EDWARDS, F., BERNARD, E.M., MARCOVE, R.C., DE HARVEN, E., ARMSTRONG, D., 1982. Bone infection caused by *Debaryomyces hansenii* in a normal host: a case report. Journal of Clinical Microbiology 16, 545-548.
- WUTHRICH, B., HOFER, T., 1986. Food allergies III. Therapy: elimination diet, symptomatic drug prophylaxis and specific hyposensitization. Schweizerische medizinische Wochenschrift 116, 1401-1410.
- WUYTS, W.A., MOLZAHN, H., MAERTENS, J., VERBEKEN, E.K., LAGROU, K., DUPONT, L.J., VERLEDEN, G.M., 2005. Fatal *Scopulariopsis* infection in a lung transplant recipient: a case report. The Journal of Heart and Lung Transplantation 24, 2301-2304.
- XU, W., XU, H., JIN, H., 2003. Studies on milky disease of *Portunus trituberculatus*. Journal of Oceanology Zhejiang Province 3, 209-213.
- XU, W., 2005. Studies on milky disease in crab. Master Thesis, Ocean University of China, 1-42.
- YANG, Q., WEI, J., CHEN, Z., 2012. Fatal bronchial invasion of *Scopulariopsis brevicaulis* in an acute monocytic leukemia patient. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 73, 369-371.
- YOST, C.K., NATTRESS, F.M., 2002. Molecular typing techniques to characterize the development of a lactic acid bacteria community on vacuum-packaged beef. International Journal of Food Microbiology 72, 97-105.
- ZIEGLER, E., PICHNER, R., HECHELMANN, H., GAREIS, M., 2008. Keime, die aus der Kälte kommen: *Clostridium estertheticum* in vakuumverpacktem Rindfleisch. Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach 47, 171-176.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Überblick über den globalen Fleischhandel im Jahr 2012 in Bezug auf die... 6
Abbildung 2:	Rindfleischproduktion der verschiedenen Kontinente im Jahr 2012 in..... 7
Abbildung 3:	Import und Exportanteile der verschiedenen Kontinente am globalen Rindfleischhandel im Jahr 2012 (nach FAO, 2012)..... 8
Abbildung 4:	Lamm- und Schaffleischproduktion der verschiedenen Kontinente im 9
Abbildung 5:	Import und Exportanteile der Kontinente am globalen Lamm- und Schaffleischhandel im Jahr 2012 (nach FAO, 2012) 10
Abbildung 6:	Klassifizierung von Mikroorganismen in Psychrophile, Mesophile und Thermophile nach DE LORENZO (2011) 24
Abbildung 7:	Herkunft der untersuchten Lamm- und Rindfleischproben..... 64
Abbildung 8:	Beurteilung des Pack Blowing Scores nach BOEREMA et al. (2007) der Rindfleischproben, aus denen Hefen isoliert wurden..... 66
Abbildung 9:	Beurteilung des Pack Blowing Scores nach BOEREMA et al. (2007) der Lammfleischproben, aus denen Hefen isoliert wurden..... 66
Abbildung 10:	Australische Rindfleischprobe mit einem Pack Blowing Score 0 (A); vergrößerter Ausschnitt (B)..... 67
Abbildung 11:	Französische Rindfleischprobe mit einem Pack Blowing Score 1 (A); vergrößerter Ausschnitt; wenige Gasblasen im Fleischtropfsaft sichtbar (B) 67
Abbildung 12:	Argentinische Rindfleischprobe mit Pack Blowing Score 2 (A); Nahaufnahme des großflächigen Hohlraumes zwischen Folie und Fleisch (B) 67
Abbildung 13:	Walisische Lammfleischprobe mit Pack Blowing Score 3 (A); Nahaufnahme des Hohlraumes zwischen Folie und Fleisch sowie der großen Fleischtropfsaftmenge (B) 68
Abbildung 14:	Walisische Lammfleischprobe mit Pack Blowing Score 4 (A); Seitliche Nahaufnahme der nahezu vollständig aufgeblähten Verpackung sowie der großen Fleischtropfsaftmenge (B)..... 68
Abbildung 15:	Neuseeländische Rindfleischprobe mit Pack Blowing Score 5 (A); 68

Abbildung 16:	(A) Hefezellen (Pfeil) im Fleischtropfsaft einer uruguayischen (Gram-Präparat, 1000fache Vergrößerung) und (B) einer niederländischen Rindfleischprobe (Nativ-Präparat, 1000fache Vergrößerung).....	74
Abbildung 17:	Übersicht über die Verteilung der Hefekeimzahlen bei den verschiedenen Rindfleischproben, *=alle Hefepplatten mit Rasenwachstum bzw. schleimigen, nicht zählbaren Hefen	76
Abbildung 18:	Übersicht über die Verteilung der Hefekeimzahlen bei den verschiedenen Lammfleischproben.....	77
Abbildung 19:	Übersicht über die aeroben mesophilen Keimzahlen bei den verschiedenen Rindfleischproben	79
Abbildung 20:	Übersicht über die anaeroben mesophilen Keimzahlen bei den verschiedenen Rindfleischproben.....	79
Abbildung 21:	Übersicht über die aeroben mesophilen Keimzahlen bei den verschiedenen Lammfleischproben.....	80
Abbildung 22:	Übersicht über die anaeroben mesophilen Keimzahlen bei den verschiedenen Lammfleischproben	81
Abbildung 23:	Übersicht über die aeroben <i>Enterobacteriaceae</i> Keimzahlen bei den verschiedenen Rindfleischproben.....	82
Abbildung 24:	Übersicht über die anaeroben <i>Enterobacteriaceae</i> Keimzahlen bei den verschiedenen Rindfleischproben	82
Abbildung 25:	Übersicht über die aeroben <i>Enterobacteriaceae</i> Keimzahlen bei den verschiedenen Lammfleischproben	83
Abbildung 26:	Übersicht über die anaeroben <i>Enterobacteriaceae</i> Keimzahlen bei den verschiedenen Lammfleischproben	84
Abbildung 27:	Übersicht über die Milchsäurebakterien Keimzahlen bei den verschiedenen Rindfleischproben	85
Abbildung 28:	Übersicht über die Milchsäurebakterien Keimzahlen bei den verschiedenen Lammfleischproben.....	85
Abbildung 29:	Übersicht über die Laktobazillen Keimzahlen bei den verschiedenen Rindfleischproben	87
Abbildung 30:	Übersicht über die Laktobazillen Keimzahlen bei den verschiedenen	87

- Abbildung 31:** Übersicht über die Verteilung der isolierten Hefespezies auf die verschiedenen Probenherkunftsänder; *C.*=*Candida*, *Cr.*=*Cryptococcus*, *K.*=*Kazachstania*, *W.*=*Wickerhamomyces*, *B.*=*Bulleromyces*, *Rh.*=*Rhodotorula*, *Sp.*=*Sporobolomyces* 89
- Abbildung 32:** Phänotypische Differenzierung der Hefe-Isolate anhand der Konsistenz und der Textur: (A) Gruppe A, cremig-buttrig, fest; (B) Gruppe B, zerlaufen, schleimig; (C) Gruppe C, fest, geschnörkelt, gefaltet; LA=Lammfleisch, IE=Irland, WA=Wales;..... 91
- Abbildung 33:** Phänotypische Differenzierung der Hefe-Isolate anhand der Farbe: (W) Gruppe W, nicht pigmentierte Isolate mit 92
- Abbildung 34:** Phänotypische Differenzierung der Hefe-Isolate anhand der Farbe: (P) Gruppe P, pigmentierte Isolate mit Farbtönen von rot bis orange; AR=Argentinien, DE=Deutschland, IE=Irland, LA=Lammfleisch, RD=Rindfleisch..... 93
- Abbildung 35:** Lichtmikroskopische Aufnahmen verschiedener aus Rind- und Lammfleisch isolierter Hefen mit ovaler Zellform (Gruppe 1); a) Isolat LA-IE-5_11; b) Isolat LA-DE-5_10; c) Isolat RD-AUS-6_1 (Nativ-Präparate, 1000fache Vergrößerung); LA=Lammfleisch, RD=Rindfleisch, AUS=Australien, DE=Deutschland, IE=Irland, d=Tage, MEA⁺=Malzextraktagar mit Novobiocin 95
- Abbildung 36:** Lichtmikroskopische Aufnahmen verschiedener aus Rind- und Lammfleisch isolierter Hefen mit polymorpher Zellform (Gruppe 2) 96
- Abbildung 37:** Lichtmikroskopische Aufnahmen zweier aus Lamm- bzw. Rindfleisch isolierter Hefen..... 97
- Abbildung 38:** Lichtmikroskopische Aufnahmen zweier aus Rindfleisch isolierter..... 97
- Abbildung 39:** Lichtmikroskopische Aufnahmen zweier aus Lamm- bzw. Rindfleisch isolierter Hefen mit (Pseudo)hyphen; a) Isolat LA-DE-1_6 (Gram-Präparat, 1000-fache Vergrößerung); b) Isolat RD-AUS-8_1 (Nativ-Präparat, 1000-fache Vergrößerung); LA=Lammfleisch, RD=Rindfleisch, AUS=Australien, DE=Deutschland, d=Tage, MEA⁺=Malzextraktagar mit Novobiocin 98
- Abbildung 40:** Verteilung der Hefe-Isolate in Gruppe 1 bis 12 bezüglich ihrer Fähigkeit fünf 101

- Abbildung 41:** Überblick über die verschiedenen positiven Fermentationsverhalten innerhalb der Spezies *C. zeylanoides*; *C.= Candida* 102
- Abbildung 42:** Überblick über die verschiedenen positiven Fermentationsverhalten innerhalb der Spezies *C. sake*; *C.= Candida*..... 103
- Abbildung 43:** Überblick über die verschiedenen positiven Fermentationsverhalten innerhalb der Spezies *Cr. curvatus*; *Cr.= Cryptococcus* 105
- Abbildung 44:** Überblick über die verschiedenen positiven Fermentationsverhalten innerhalb der Spezies *Kazachstania^opsychrophila* 105
- Abbildung 45:** Unterschiedliche Assimilationskombinationen verschiedener Zucker von 28 *Candida zeylanoides*-Isolaten; (*C.=Candida*, Ado=Adonit, Nag=N-Acetyl-Glukosamin, Sor=D-Sorbit, 2KG=Calcium 2-Keto-Glukonat)..... 106

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Pro-Kopf-Fleischversorgung* in den verschiedenen Kontinenten in den Jahren 1980 bis 2009, in kg/Kopf/Jahr (nach FAOSTAT, 2013)	4
Tabelle 2:	Weltweite Fleischversorgung (kg/Kopf) im Jahr 2009 in Bezug auf Rind-,	5
Tabelle 3:	Weltweite Fleischproduktion in den Jahren 2005 bis 2012 (Mio. t) (nach FAO 2006, 2007, 2008, 2010, 2011, 2012)	5
Tabelle 4:	Übersicht über verderbsassoziierte Bakterien bei frischem, vakuumverpacktem Fleisch	18
Tabelle 5:	Haltbarkeiten von vakuumverpacktem Rind- und Lammfleisch bei unterschiedlichen Temperaturen und O ₂ -Permeabilitäten des Folienmaterials	21
Tabelle 6:	Überblick über isolierte Hefen aus Fleisch und Fleischerzeugnissen	30
Tabelle 7:	Verderbsverursachende Stoffwechselprozesse von Hefen und dadurch entstehende Verderbskomponenten (DEÁK, 2008)	39
Tabelle 8:	Übersicht über das Vorkommen und die Eigenschaften verderbsverursachender Hefen bei Lebensmitteln und Getränken (FLEET, 2011)	40
Tabelle 9:	Übersicht über die Krankheitsbilder, Infektionswege und Risikogruppen der wichtigsten opportunistisch pathogenen Hefespezies	43
Tabelle 10:	Herkunft und Anzahl der untersuchten Rindfleischproben	51
Tabelle 11:	Herkunft und Anzahl der untersuchten Lammfleischproben	51
Tabelle 12:	Übersicht der verwendeten Nährmedien mit Herstellerangaben	52
Tabelle 13:	Einteilung des „Pack Blowing Score“ nach BOEREMA et al. (2007)	56
Tabelle 14:	Punkteverteilung und Bewertung des Geruchs	57
Tabelle 15:	Übersicht über Nährmedien, Bebrütungstemperaturen und –zeiten sowie Milieubedingungen zur Bestimmung des mikrobiellen Status der Fleischproben	58
Tabelle 16:	Reaktionsansatz für die PCR der D1/D2 Domäne des 26S rRNA Gens (nach LIBKIND et al., 2003)	61
Tabelle 17:	PCR-Protokoll zum Nachweis der D1/D2 Domäne des 26S rRNA Gens (nach LIBKIND et al., 2003)	62
Tabelle 18:	Reaktionsansatz für die PCR des ITS-Genabschnittes (HUBER, 2012)	62

Tabelle 19:	PCR-Protokoll zum Nachweis des ITS-Genabschnittes (HUBER, 2012)	63
Tabelle 20:	Beurteilungsergebnisse für die Rindfleischproben nach dem Pack Blowing Score von BOEREMA et al. (2007)	69
Tabelle 21:	Beurteilungsergebnisse für die Lammfleischproben nach dem Pack Blowing Score von BOEREMA et al. (2007)	69
Tabelle 22:	Beurteilung des Geruchs der Rindfleischproben anhand einer Punkteskala ...	70
Tabelle 23:	Beurteilung des Geruchs der Lammfleischproben anhand einer Punkteskala	71
Tabelle 24:	Beurteilung der Konsistenz des Rindfleisches unter Berücksichtigung der subjektiven Elastizität und der Saftigkeit	72
Tabelle 25:	Beurteilung der Konsistenz des Lammfleisches unter Berücksichtigung der sub-jektiven Elastizität und der Saftigkeit	72
Tabelle 26:	Anzahl der in der lichtmikroskopischen Untersuchung Hefe-positiver Rindfleisch- tropfsaftproben (n)	73
Tabelle 27:	Anzahl der in der lichtmikroskopischen Untersuchung Hefe-positiver Lamm- fleischtropfsaftproben (n)	73
Tabelle 28:	Übersicht über den Zusammenhang der isolierten Hefespezies mit den Probenherkunftsländern	109
Tabelle 29:	Übersicht über die Verpackungsart und die Herkunftsländer der Proben, von denen die Hefe-Isolate stammen	111
Tabelle 30:	Übersicht über die Herkunft, Verpackungsart, das Teilstück und Gewicht der 60 Rindfleischproben	155
Tabelle 31:	Übersicht über die Herkunft, Verpackungsart, das Teilstück und Gewicht der 33 Lammfleischproben	158
Tabelle 32:	Übersicht über die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der Rindfleischproben	160
Tabelle 33:	Übersicht über die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der Lammfleischproben	163
Tabelle 34:	Anzahl und Herkunft der Rindfleischproben, aus denen Hefen isoliert wurden sowie Anzahl der gewonnen Hefe-Isolate je Probenherkunftsland.....	165
Tabelle 35:	Anzahl und Herkunft der Lammfleischproben, aus denen Hefen isoliert wurden sowie Anzahl der gewonnen Hefe-Isolate je Probenherkunftsland .	165

11 Anhang

Tabelle 30: Übersicht über die Herkunft, Verpackungsart, das Teilstück und Gewicht der 60 Rindfleischproben

Proben-herkunftsland	Proben-bezeichnung	Hersteller	Verpackungsart		Teilstück	Gewicht (kg)
			OV	WV		
Argentinien	RD-AR-1	Das Argentinische Steak		x	Hüftsteak	0,2
Argentinien	RD-AR-2	Das Argentinische Steak		x	Filetsteaks	0,2
Argentinien	RD-AR-3	Birkenhof GmbH & Co.		x	Rumpsteak	0,2
Argentinien	RD-AR-4	Das Argentinische Steak		x	Hüftsteak	0,2
Argentinien	RD-AR-5	Das Argentinische Steak		x	Filetsteaks	0,2
Argentinien	RD-AR-6	Das Argentinische Steak		x	Hüftsteak	0,2
Argentinien	RD-AR-7	Das Argentinische Steak		x	Hüftsteak	0,2
Argentinien	RD-AR-8	Argentina Beef, BAI, Kruse Fleischimport	x		Herz der Hüfte	1,1
Argentinien	RD-AR-9	Argentina Beef, Maredo Handels GmbH	x		Rinderfilet	1,5
Argentinien	RD-AR-10	Aliarg S.A., Argentine Beef	x		Rinderhüfte	1,8
Argentinien	RD-AR-11	La anonima, Argentine beef	x		Roastbeef	2,3
Brasilien	RD-BR-1	Friboi	x		Rinderfilet	1,9
Uruguay	RD-UR-1	Maredo	x		Steakhüfte	2,2
Uruguay	RD-UR-2	Sarubbi, Sirsil, S.A.	x		Rinderfilet ohne Kette	1,4
Uruguay	RD-UR-3	VILA, Premium Beef, Frigorifico PANDO	x		Unterschale Rind	3,5
Uruguay	RD-UR-4	Solis	x		Rinderkugel	3,3
Uruguay	RD-UR-5	Steak Selection		x	Rumpsteak	0,2
Uruguay	RD-UR-6	Solis Meat Uruguay	x		Seemerrolle Rind	1,5
USA	RD-US-1	Fine Food, Finestro	x		Nacken Steak	0,6

AR=Argentinien, AUS=Australien, BR=Brasilien, RD=Rindfleisch, UR=Uruguay, US=USA, OV=Originalverpackt, WV=In Deutschland wiederverpackt

Fortsetzung Tabelle 30: Übersicht über die Herkunft, Verpackungsart, das Teilstück und Gewicht der 60 Rindfleischproben

Probenherkunftsland	Probenbezeichnung	Hersteller	Verpackungsart		Teilstück	Gewicht (kg)
			OV	WV		
USA	RD-US-2	Kruse Fleisch Import, Creekstone Farms, Black Angus	x		Oberschale	4,5
Deutschland	RD-DE-1	Pureland	x		Rindersteak vom Jungbullen	0,2
Deutschland	RD-DE-2	Pureland	x		Rindersteak vom Jungbullen	0,2
Deutschland	RD-DE-3	Pureland	x		Roastbeef/Rindersteak vom Jungbullen	0,2
Deutschland	RD-DE-4	Pureland	x		Rinderfilet vom Jungbullen	0,2
Deutschland	RD-DE-5	Pureland	x		Rindersteak vom Jungbullen	0,2
Deutschland	RD-DE-6	Pureland	x		Rindersteak vom Jungbullen	0,2
Deutschland	RD-DE-7	Pureland	x		Rindersteak vom Jungbullen	0,2
Deutschland	RD-DE-8	Pureland	x		Rindersteak vom Jungbullen	0,2
Deutschland	RD-DE-9	Pureland	x		Rindersteak vom Jungbullen	0,2
Deutschland	RD-DE-10	Pureland	x		Entrecote vom Rind	0,3
Deutschland	RD-DE-11	Pureland	x		Rindersteak vom Jungbullen	0,2
Deutschland	RD-DE-12	Pureland	x		Entrecote vom Rind	0,3
Frankreich	RD-FR-1	Fine Food, Finestro		x	Charolais Hüft-Steak	0,6
Frankreich	RD-FR-2	Gourmet naturel	x		Jungbulle, Bürgermeister Steak	1,3
Irland	RD-IE-1	Pureland	x		Irish T-Bone Steak	0,4
Irland	RD-IE-2	Purland	x		Irish T-Bone Steak	0,5
Irland	RD-IE-3	Purland	x		Irish T-Bone Steak	0,4

DE=Deutschland, IE=Irland, FR=Frankreich, RD=Rindfleisch, OV=Originalverpackt, WV=In Deutschland wiederverpackt

Fortsetzung Tabelle 30: Übersicht über die Herkunft, Verpackungsart, das Teilstück und Gewicht der 60 Rindfleischproben

Probenherkunftsland	Probenbezeichnung	Hersteller	Verpackungsart		Teilstück	Gewicht (kg)
			OV	WV		
Irland	RD-IE-4	Purland	x		Irish T-Bone Steak	0,4
Niederlande	RD-NL-1	EKRO	x		Kalbfleisch, Tafelspitz	0,6
Niederlande	RD-NL-2	Brulmun, Ekro	x		Kalbshüfte, Tafelspitz	1,3
Australien	RD-AUS-1	Gourmet Star		x	Roastbeef	1,2
Australien	RD-AUS-2	Gourmet Star		x	Ribeyesteaks	0,6
Australien	RD-AUS-3	Gourmet Star		x	Entrecote	1,2
Australien	RD-AUS-4	Gourmet Star		x	Rumpsteaks	0,6
Australien	RD-AUS-5	Frischeparadies, MUC		x	Flankensteak	2,15
Australien	RD-AUS-6	Gourmet Star		x	Rumpsteaks	0,5
Australien	RD-AUS-7	Gourmet Star		x	Wagyu Rolle	0,5
Australien	RD-AUS-8	Gourmet Star		x	Wagyu Steaks	0,5
Australien	RD-AUS-9	Gourmet Star		x	Filetsteaks	0,5
Australien	RD-AUS-10	Gourmet Star		x	Ribeyesteaks	0,5
Neuseeland	RD-NZ-1	Silver fern farms, Klughardt	x		Steakhüfte	2,8
Neuseeland	RD-NZ-2	Silver fern farms, Klughardt	x		Entrecote	2,5
Neuseeland	RD-NZ-3	Silver fern farms, Klughardt	x		Steakhüfte	2,9
Neuseeland	RD-NZ-4	Silver fern farms, Klughardt	x		Steakhüfte, Hereford	2,4
Neuseeland	RD-NZ-5	Silver fern farms, Klughardt	x		Steakhüfte, Hereford	2,6
Neuseeland	RD-NZ-6	Silver fern farms	x		Rinderfilet, 4/5	2,2
Neuseeland	RD-NZ-7	Silver fern farms, Klughardt	x		Steakhüfte, Hereford, New Zealand Beef	2,8
Neuseeland	RD-NZ-8	Silver fern farms, Klughardt	x		Rinderfilet, Premier Hereford Selection	2,0
Neuseeland	RD-NZ-9	Silver fern farms, Klughardt	x		Entrecote	2,6
Neuseeland	RD-NZ-10	Hereford	x		Entrecote	2,6

AUS=Australien, IE=Irland, NL=Niederlande, NZ=Neuseeland, RD=Rindfleisch, OV=Originalverpackt, WV=In Deutschland wiederverpackt

Tabelle 31: Übersicht über die Herkunft, Verpackungsart, das Teilstück und Gewicht der 33 Lammfleischproben

Probenherkunftsland	Probenbezeichnung	Hersteller	Verpackungsart		Teilstück	Gewicht (kg)
			OV	WV		
Deutschland	LA-DE-1	Purland, Baumann GmbH	x		Lammkotelett	0,3
Deutschland	LA-DE-2	Purland, Baumann GmbH	x		Lammkotelett	0,2
Deutschland	LA-DE-3	Purland, Baumann GmbH	x		Lammkotelett	0,3
Deutschland	LA-DE-4	Purland, Baumann GmbH	x		Lammkotelett	0,2
Deutschland	LA-DE-5	QSFP Eifeler Ur-Lamm	x		Ur-Lammkeule ohne Knochen	0,9
Deutschland	LA-DE-6	Purland, Baumann GmbH	x		Lammkotelett	0,2
Deutschland	LA-DE-7	Landfrau	x		Öko-Lammsteak	0,2
Deutschland	LA-DE-8	Landfrau	x		Öko-Lammsteak	0,2
Deutschland	LA-DE-9	QSFP Eifeler Ur-Lamm	x		Ur-Lammkeule ohne Knochen	0,8
Irland	LA-IE-1	Irish Country meats	x		Irischer Lammrücken Filetstück	1,3
Irland	LA-IE-2	Irish Country meats	x		Irische Lammfilets	0,6
Irland	LA-IE-3	Irish Country meats	x		Irisches lammkarree	0,8
Irland	LA-IE-4	Donald Russell		x	Lammfilet	0,5
Irland	LA-IE-5	Donald Russell		x	Lammkrone	0,9
Irland	LA-IE-6	Natural Irish Lamb Slaney Valley	x		Lammkarre	1,2
Wales	LA-WA-1	Frischeparadies, Niederreuther	x		Lammgulasch aus der Keule	1,0
Wales	LA-WA-2	Hamberger, SB	x		Lammachse ohne Silberhaut	0,7
Wales	LA-WA-3	Hamberger, SB	x		Lammachse ohne Silberhaut	0,6
Wales	LA-WA-4	Welsh Lamb	x		Lammfilet	0,4
Wales	LA-WA-5	Welsh Lamb	x		Lammcarree	0,5
Australien	LA-AUS-1	Tatiana TMC	x		Lammfilet	0,5
Australien	LA-AUS-2	Tatiana TMC	x		Lammfilet	0,5
Australien	LA-AUS-3	Tatiana TMC	x		Lammfilet	0,5
Neuseeland	LA-NZ-1	Taylor Preston, Kruse Fleisch-Import	x		Lammrüchen ohne Knochen	0,5

AUS=Australien, DE=Deutschland, IE=Irland, LA=Lammfleisch, NZ=Neuseeland, WA=Wales; OV=originalverpackt, WV=In Deutschland wiederverpackt

Fortsetzung Tabelle 31: Übersicht über die Herkunft, Verpackungsart, das Teilstück und Gewicht der 33 Lammfleischproben

Probenherkunftsland	Probenbezeichnung	Hersteller	Verpackungsart		Teilstück	Gewicht (kg)
			OV	WV		
Neuseeland	LA-NZ-2	Taylor Preston, Kruse Fleisch-Import	x		Lammrücken ohne Knochen	0,7
Neuseeland	LA-NZ-3	Lanz Supreme	x		Lammkeule mit Röhrenknochen	1,3
Neuseeland	LA-NZ-4	Silver fern Farms	x		Lammkeule mit Röhrenknochen	1,9
Neuseeland	LA-NZ-5	Lanz Supreme	x		Lammachse	0,7
Neuseeland	LA-NZ-6	Silver fern Farms	x		Lammachse	0,9
Neuseeland	LA-NZ-7	Ovation free Range	x		Lammfilet	0,9
Neuseeland	LA-NZ-8	Silver fern Farms	x		Lammkarree	0,8
Neuseeland	LA-NZ-9	Silver fern Farms	x		Lamb boneless loins	0,7
Neuseeland	LA-NZ-10	Silver fern Farms	x		Lammfilet	0,4

LA=Lammfleisch, NZ=Neuseeland; OV=originalverpackt, WV=In Deutschland wiederverpackt

Tabelle 32: Übersicht über die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der Rindfleischproben

Probe	MKZ aerob KbE/g	MKZ anaerob KbE/g	Enterobacteriaceae aerob KbE/g	Enterobacteriaceae anaerob KbE/g	MRS 5.7 KbE/g	MRS 5.0 KbE/g	MEA* KbE/g	GYP KbE/g	pH	Score- Stufe (0-5) ^{*1}	Geruch- Skala (1-4)	Hefe- Isolat(e)
RD-AR-1	1,9x10 ⁶	6,5x10 ⁵	3,4x10 ²	1,0x10 ³	< 10 ³	>10 ⁸	2,0x10 ³	>10 ³	4,98	1	2	nein
RD-AR-2	9,3x10 ⁵	6,7x10 ⁵	1,7x10 ²	2,0x10 ²	2,6x10 ⁵	>10 ⁸	3,6x10 ³	>10 ³	5,2	1	1	ja
RD-AR-3	>10 ⁸	>10 ⁸	5,4x10 ⁴	3,0x10 ³	2,5x10 ⁵	2,8x10 ⁵	<10 ²	<10 ²	4,97	1	1	nein
RD-AR-4	>10 ⁸	>10 ⁸	3,8x10 ⁵	1,9x10 ⁵	1,4x10 ⁷	3,1x10 ⁷	<10 ²	>10 ³	5,32	1	1	nein
RD-AR-5	1,4x10 ⁷	9,6x10 ⁶	1,0x10 ³	2,0x10 ³	2,0x10 ⁷	1,4x10 ⁸	7,0x10 ²	>10 ³	5,14	1	3	ja
RD-AR-6	>10 ⁸	1,3x10 ⁷	2x10 ⁴	1,4x10 ⁶	6,8x10 ⁶	1,3x10 ⁸	<10 ²	3,2x10 ³	5,35	2	1	nein
RD-AR-7	4,7x10 ⁶	4,8x10 ⁶	8,6x10 ⁴	3,0x10 ⁵	1,4x10 ⁶	1,3x10 ⁶	1,4x10 ⁶	>10 ³	5,50	2	2	nein
RD-AR-8	7,1x10 ⁷	7,5x10 ⁷	<10 ³	5,4x10 ⁵	1,1x10 ⁷	7,1x10 ⁷	1,2x10 ³	9,0x10 ²	5,38	2	3	ja
RD-AR-9	1,1x10 ⁶	1,6x10 ⁶	<10 ³	2,8x10 ⁶	2,6x10 ⁵	1,1x10 ⁶	<10 ²	>10 ³	5,24	2	2	nein
RD-AR-10	4,0x10 ⁷	3,7x10 ⁷	2,6x10 ⁵	6,3x10 ⁴	5,7x10 ⁵	2,4x10 ⁸	5,0x10 ²	2,8x10 ⁵	5,00	2	1	ja
RD-AR-11	1,0x10 ⁸	9,2x10 ⁷	3,2x10 ⁵	2,7x10 ⁶	1,8x10 ⁸	2,0x10 ⁸	<10 ²	>10 ³	5,37	2	4	nein
RD-BR-1	3,5x10 ⁷	4,2x10 ⁷	9,3x10 ⁶	7,2x10 ⁶	1,9x10 ⁷	1,3x10 ⁸	<10 ²	>10 ³	5,73	2	3	nein
RD-UR-1	1,3x10 ⁸	1,4x10 ⁸	4,0x10 ⁴	6,6x10 ⁴	1,3x10 ⁸	2,0x10 ⁸	3,0x10 ²	>10 ³	5,2	1	1	ja
RD-UR-2	2,9x10 ⁸	4,1x10 ⁸	8,5x10 ³	6,3x10 ⁴	1,14x10 ⁸	<10 ³	<10 ²	2,2x10 ⁴	5,31	2	4	nein
RD-UR-3	4,2x10 ⁷	5,6x10 ⁷	2,8x10 ⁴	7,2x10 ⁶	5,6x10 ⁸	7,2x10 ⁸	3,0x10 ³	>10 ³	5,17	2	2	ja
RD-UR-4	1,5x10 ⁸	2,0x10 ⁸	7,2x10 ⁶	4,9x10 ⁶	10,0x10 ⁷	9,4x10 ⁷	1,7x10 ³	>10 ³	6,15	2	4	nein
RD-UR-5	1,0x10 ⁶	7,0x10 ⁵	2,6x10 ⁴	<10 ³	1,8x10 ⁵	2,1x10 ⁵	1,0x10 ²	>10 ³	5,39	0	1	nein
RD-UR-6	4,7x10 ⁶	6,1x10 ⁶	2,0x10 ⁵	9,3x10 ⁵	1,4x10 ⁴	2,4x10 ⁶	<10 ²	>10 ³	5,25	2	2	ja
RD-US-1	>10 ⁸	9,6x10 ⁵	1,4x10 ⁶	1,1x10 ⁶	4,3x10 ⁴	8,3x10 ⁵	>10 ³	>10 ³	5,3	1	2	ja
RD-US-2	1,9x10 ⁷	1,0x10 ⁷	8,1x10 ⁵	1,5x10 ⁶	4,8x10 ⁶	entfällt*	3,3x10 ³	>10 ³	5,99	1	1	ja
RD-DE-1	2,6x10 ⁶	3,2x10 ⁶	7,6x10 ³	4,2x10 ³	2,0x10 ⁴	1,1x10 ⁴	2,3x10 ³	<10 ³	5,50	2	1	nein
RD-DE-2	1,4x10 ⁶	1,4x10 ⁶	4,8x10 ³	8,0x10 ³	1,3x10 ⁵	3,1x10 ⁴	<10 ²	<10 ³	5,82	0	1	nein

AR=Argentinien; DE=Deutschland, entfällt*=nicht durchgeführt/nicht auswertbar GYP=Glukose-Hefe-Extrakt-Pepton-Agar, KbE/g=Koloniebildende Einheiten pro Gramm, MEA*=Maizextraktagar mit Novobiocin, MKZ=Mesophile Keimzahl, MRS 5.7=Agar nach de Man, Rogosa und Sharpe mit pH 5,7; MRS 5.0=Agar nach de Man, Rogosa und Sharpe mit pH 5,0; RD=Rindfleisch, UR=Uruguay, US=USA; Score-Stufen*: 0=keine sichtbaren Gasblasen; 1=wenige Gasblasen im Fleischtopf sichtbar, 2=Aussehen wie bei Vakuumverlust, 3=offensichtlich aufgebläht, puffig; 4=auf volle Größe aufgebläht, noch nicht prall gespannt; 5=auf volle Größe aufgebläht; Folie straff gespannt; Geruch-Skala: 1= frisch, fleischig, produktspezifisch, mit leicht säuerlicher Note; 2= säuerlich, jedoch nicht unappetitlich; 3= sauer, leicht unangenehm, nicht mehr frisch; 4= muffig, stark unappetitlich, verdorben; *¹=Pack Blowing Score nach BOEREMA et al, 2007

Fortsetzung Tabelle 32: Übersicht über die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der Rindfleischproben

Probe	MKZ aerob KbE/g	MKZ anaerob KbE/g	<i>Enterobacteriaceae</i> aerob KbE/g	<i>Enterobacteriaceae</i> anaerob KbE/g	MRS 5.7 KbE/g	MRS 5.0 KbE/g	MEA ⁺ KbE/g	GYP KbE/g	pH	Score- Stufe (0-5) ^{*1}	Geruch- Skala (1-4)	Hefe- Isolat(e)
RD-AUS-5	7,0x10 ⁷	1,3x10 ⁸	1,4x10 ⁷	2,0x10 ⁷	1,4x10 ⁸	1,1x10 ⁸	>10 ³	>10 ³	5,86	2	1	nein
RD-AUS-6	3,8x10 ⁷	3,8x10 ⁷	1,3x10 ⁵	2,1x10 ⁵	2,3x10 ⁷	2,4x10 ⁷	1,5x10 ³	>10 ³	5,32	0	1	ja
RD-AUS-7	7,2x10 ⁷	5,8x10 ⁷	2,9x10 ⁵	2,4x10 ⁵	9,0x10 ⁷	6,0x10 ⁷	<10 ²	>10 ³	5,25	1	1	nein
RD-AUS-8	1,4x10 ⁷	1,1x10 ⁷	4,6x10 ⁵	4,2x10 ⁵	8,0x10 ⁶	7,6x10 ⁶	8,1x10 ³	>10 ³	5,17	0	1	ja
RD-AUS-9	4,6x10 ⁷	4,0x10 ⁷	2,1x10 ⁵	1,9x10 ⁵	1,7x10 ⁷	2,3x10 ⁶	5,0x10 ³	>10 ³	5,05	0	1	ja
RD-AUS-10	4,1x10 ⁶	6,0x10 ⁶	8,0x10 ⁴	1,0x10 ⁵	5,7x10 ⁶	6,3x10 ⁶	1,0x10 ²	>10 ³	5,32	0	1	ja
RD-NZ-1	7,3x10 ⁷	8,0x10 ⁷	1,4x10 ⁷	4,8x10 ⁶	4,8x10 ⁶	9,4x10 ⁷	2,9x10 ⁴	>10 ³	5,79	0	1	nein
RD-NZ-2	1,2x10 ⁸	2,6x10 ⁸	1,2x10 ⁷	6,6x10 ⁶	6,6x10 ⁶	1,0x10 ³	2,0x10 ²	>10 ³	5,94	3	1	nein
RD-NZ-3	2,6x10 ⁷	2,2x10 ⁷	1,3x10 ⁷	1,4x10 ⁷	1,4x10 ⁷	<10 ³	8,9x10 ⁴	>10 ³	5,48	1	1	ja
RD-NZ-4	1,5x10 ⁷	2,0x10 ⁷	6,1x10 ⁶	6,4x10 ⁶	6,4x10 ⁶	1,1x10 ⁴	6,8x10 ⁴	>10 ³	5,54	2	1	nein
RD-NZ-5	3,5x10 ⁷	5,8x10 ⁷	2,5x10 ⁶	3,1x10 ⁶	3,1x10 ⁶	<10 ³	1,0x10 ²	>10 ³	5,57	2	1	nein
RD-NZ-6	>10 ⁸	>10 ⁸	7,2x10 ⁶	1,1x10 ⁸	1,1x10 ⁸	1,7x10 ⁸	2,0x10 ²	>10 ³	5,38	2	1	ja
RD-NZ-7	4,4x10 ⁶	1,7x10 ⁶	2,1x10 ⁶	1,2x10 ⁷	1,2x10 ⁷	<10 ³	<10 ²	>10 ³	5,52	1	1	nein
RD-NZ-8	8,4x10 ⁷	1,8x10 ⁸	1,9x10 ⁷	2,4x10 ⁷	2,4x10 ⁷	3,0x10 ³	4,5x10 ⁴	>10 ³	5,54	3	1	ja
RD-NZ-9	5,4x10 ⁷	4,3x10 ⁷	1,8x10 ⁷	2,7x10 ⁷	2,7x10 ⁷	9,0x10 ⁷	<10 ²	>10 ³	5,57	5	3	nein
RD-NZ-10	8,7x10 ⁷	1,0x10 ⁸	1,7x10 ⁷	>10 ⁷	> 10 ⁷	5,5x10 ⁷	<10 ²	>10 ³	5,59	3	1	nein

AUS=Australien; GYP=Glukose-Hefe-Extrakt-Pepton-Agar, KbE/g=Koloniebildende Einheiten pro Gramm, MEA⁺=Malzextraktagar mit Novobiocin,

MKZ=Mesophile Keimzahl, MRS 5.7=Agar nach de Man, Rogosa und Sharpe mit pH 5,7; MRS 5.0=Agar nach de Man, Rogosa und Sharpe mit pH 5,0; NZ=Neuseeland, RD=Rindfleisch,

Score-Stufen^{*1}: 0=keine sichtbaren Gasblasen; 1=wenige Gasblasen im Fleischtröpfchen sichtbar, 2=Aussehen wie bei Vakuumverlust, 3=offensichtlich aufgebläht, puffig; 4=auf

volle Größe aufgebläht, noch nicht prall gespannt; 5=auf volle Größe aufgebläht, Folie straff gespannt; Geruch-Skala: 1= frisch, fleischig, produktspezifisch, mit leicht säuerlicher Note;

2= säuerlich, jedoch nicht unappetitlich; 3= sauer, leicht unangenehm, nicht mehr frisch; 4= muffig, stark unappetitlich, verdorben; ^{*1}=Pack Blowing Score nach BOEREMA et. al, 2007

Tabelle 33: Übersicht über die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der Lammfleischproben

Probe	MKZ aerob KbE/g	MKZ anaerob KbE/g	Enterobacteriaceae aerob KbE/g	Enterobacteriaceae bacteriaceae anaerob KbE/g	MRS 5.7 KbE/g	MRS 5.0 KbE/g	MEA ⁺ KbE/g	GYP KbE/g	pH	Score- Stufe (0-5) ^{*1}	Geruch- Skala (1-4)	Hefe- Isolat(e)
LA-DE-1	9,8x10 ⁷	entfällt*	2x10 ³	entfällt*	8,0x10 ³	entfällt*	1,0x10 ²	>10 ³	5,68	1	4	ja
LA-DE-2	1,0x10 ⁸	>10 ⁸	>10 ⁸	1,2x10 ⁷	1,5x10 ⁵	entfällt*	4,7x10 ³	>10 ³	5,93	0	4	nein
LA-DE-3	6,2x10 ⁷	1,1x10 ⁸	2,3x10 ⁵	1,7x10 ⁵	1,1x10 ⁵	6x10 ⁵	1,0x10 ²	1,3x10 ⁵	5,6	1	1	nein
LA-DE-4	2,1x10 ⁷	7,0x10 ⁷	1,4x10 ⁷	1,2x10 ⁶	2,9x10 ⁷	2,6x10 ⁷	<10 ²	>10 ³	5,52	1	1	nein
LA-DE-5	2,6x10 ⁶	3,7x10 ⁶	6,0x10 ³	1,0x10 ⁴	1,0x10 ⁵	3,8x10 ⁵	3,0x10 ³	>10 ³	5,60	0	3	ja
LA-DE-6	1,1x10 ⁸	1,5x10 ⁸	5,4x10 ⁶	4,1x10 ⁶	1,0x10 ⁶	1,0x10 ⁶	2,0x10 ³	>10 ³	5,54	1	2	nein
LA-DE-7	8,2x10 ⁵	7,0x10 ⁵	2,0x10 ³	1,0x10 ³	4,4x10 ⁵	4,2x10 ⁵	<10 ²	>10 ³	5,41	1	1	nein
LA-DE-8	2,4x10 ⁶	1,4x10 ⁷	4,0x10 ³	2,0x10 ³	1,3x10 ⁶	4,8x10 ⁵	1,0x10 ²	>10 ³	5,60	1	1	ja
LA-DE-9	8,4x10 ⁵	6,0x10 ⁵	1,5x10 ⁴	1,2x10 ⁷	2,2x10 ⁵	2,8x10 ⁵	1,4x10 ³	6,0x10 ⁴	5,83	1	1	ja
LA-IE-1	2,8x10 ⁷	2,0x10 ⁷	1,4x10 ⁵	3,8x10 ⁵	4,0x10 ⁴	3,0x10 ⁴	1,0x10 ²	>10 ³	5,87	0	1	ja
LA-IE-2	1,3x10 ⁷	1,7x10 ⁷	5,0x10 ⁵	2,3x10 ⁵	7,9x10 ⁵	1,5x10 ⁶	<10 ²	>10 ³	5,47	1	1	nein
LA-IE-3	4,8x10 ⁶	5,5x10 ⁶	1,6x10 ⁵	6,9x10 ⁶	6,5x10 ⁶	4,0x10 ⁶	<10 ²	>10 ³	6,35	2	2	nein
LA-IE-4	2,6x10 ⁶	3,7x10 ⁶	1,3x10 ⁴	8,0x10 ³	2,5x10 ⁶	1,1x10 ⁶	2,0x10 ²	>10 ³	5,67	0	1	ja
LA-IE-5	1,0x10 ⁶	3,6x10 ⁶	1,7x10 ⁴	7,0x10 ³	8,0x10 ⁵	8,0x10 ⁴	7,4x10 ³	>10 ³	5,99	1	1	ja
LA-IE-6	1,5x10 ⁷	7,7x10 ⁶	1,3x10 ⁴	2,0x10 ⁴	1,5x10 ⁵	3,0x10 ⁵	6,0x10 ²	>10 ³	5,68	1	2	nein
LA-WA-1	1,0x10 ⁶	9,9x10 ⁵	<10 ³	3,1x10 ⁴	<103	1,0x10 ⁴	<10 ²	>10 ³	5,52	0	1	ja
LA-WA-2	1,3x10 ⁶	<10 ⁴	<10 ³	1,4x10 ⁶	<103	<10 ⁴	<10 ²	1,0x10 ⁶	5,67	3	2	nein
LA-WA-3	6,8x10 ⁷	5,5x10 ⁷	3,7x10 ⁵	4,4x10 ⁵	7,0x10 ⁶	1,4x10 ⁷	1,0x10 ²	>10 ³	5,75	4	3	nein
LA-WA-4	1,7x10 ⁷	2,0x10 ⁷	2,3x10 ⁵	2,0x10 ⁶	1,4x10 ⁷	9,4x10 ⁶	1,0x10 ³	>10 ³	5,37	2	1	nein
LA-WA-5	1,4x10 ⁸	2,8x10 ⁸	1,2x10 ⁷	7,3x10 ⁶	2,2x10 ⁶	2,5x10 ⁶	3,4x10 ³	>10 ³	6,04	1	3	ja
LA-AUS-1	8,8x10 ⁷	8,4x10 ⁷	<10 ³	<10 ³	4,7x10 ⁷	4,0x10 ⁷	<10 ²	>10 ³	5,30	1	3	nein

AUS=Australien; GYP=Glukose-Hefe-Extrakt-Pepton-Agar, KbE/g=Koloniebildende Einheiten pro Gramm, MEA⁺=Malzextraktagar mit Novobiocin, MKZ=Mesophile Keimzahl, MRS 5.7=Agar nach de Man, Rogosa und Sharpe mit pH 5,7; MRS 5.0=Agar nach de Man, Rogosa und Sharpe mit pH 5,0; NZ=Neuseeland, RD=Rindfleisch, Score-Stufen^{*1}: 0=keine sichtbaren Gasblasen; 1=wenige Gasblasen im Fleischtröpfsaft sichtbar, 2=Aussehen wie bei Vakuumverlust, 3=offensichtlich aufgebläht, puffed; 4=auf volle Größe aufgebläht, noch nicht prall gespannt; 5=auf volle Größe aufgebläht, Folie straff gespannt; Geruch-Skala: 1= frisch, fleischig, produktspezifisch, mit leicht säuerlicher Note; 2= säuerlich, jedoch nicht unappetitlich; 3= sauer, leicht unangenehm, nicht mehr frisch; 4= muffig, stark unappetitlich, verdorben; *1=Pack Blowing Score nach BOEREMA et. al, 2007

Fortsetzung Tabelle 33: Übersicht über die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der Lammfleischproben

Probe	MKZ aerob KbE/g	MKZ anaerob KbE/g	<i>Enterobacteriaceae</i> aerob KbE/g	<i>Enterobacteriaceae</i> anaerob KbE/g	MRS 5.7 KbE/g	MRS 5.0 KbE/g	MEA ⁺ KbE/g	GYP KbE/g	pH	Score- Stufe (0-5) ^{*1}	Geruch- Skala (1-4)	Hefe- Isolat(e)
LA-AUS-2	2,0x10 ⁸	2,0x10 ⁸	<10 ³	<10 ³	6,0<10 ⁷	4,6<10 ⁷	<10 ²	>10 ³	5,36	1	4	nein
LA-AUS-3	1,1x10 ⁸	1,4x10 ⁸	<10 ³	<10 ³	1,6<10 ⁸	8,6<10 ⁷	<10 ²	<10 ²	5,27	2	2	nein
LA-NZ-1	3,5x10 ⁸	>10 ⁸	2,7x10 ⁴	2,0x10 ⁶	2,8x10 ⁵	3,1x10 ⁵	2,0x10 ³	1,0x10 ²	5,44	1	1	nein
LA-NZ-2	>10 ⁸	1,2x10 ⁷	4,6x10 ⁴	9,4x10 ⁵	<10 ³	entfällt*	<10 ²	2,9x10 ⁴	5,57	2	1	nein
LA-NZ-3	2,2x10 ⁸	2,3x10 ⁸	3,2x10 ⁷	>10 ⁸	<10 ³	<10 ³	<10 ²	>10 ³	6,12	3	3	nein
LA-NZ-4	4,3x10 ⁷	6,2x10 ⁷	<10 ³	<10 ³	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ²	>10 ³	5,60	1	1	nein
LA-NZ-5	4,5x10 ⁷	4,4x10 ⁷	1,5x10 ⁵	5,3x10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	9,0x10 ²	>10 ³	5,64	0	1	nein
LA-NZ-6	1,0x10 ⁶	2,5x10 ⁸	<10 ³	3,5x10 ⁴	9,0x10 ⁷	1,5x10 ⁸	<10 ²	>10 ³	5,54	0	1	nein
LA-NZ-7	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ³	2,0x10 ⁵	<10 ⁴	<10 ⁴	1,3x10 ³	<10 ²	5,77	0	1	nein
LA-NZ-8	9,5x10 ⁷	1,4x10 ⁸	1,3x10 ⁵	1,0x10 ⁶	<10 ⁴	<10 ⁴	3,0x10 ³	>10 ³	6,45	0	1	nein
LA-NZ-9	4,7x10 ⁷	5,9x10 ⁷	1,2x10 ⁷	2,0x10 ⁷	<10 ³	<10 ³	2,4x10 ³	>10 ³	5,64	1	1	ja
LA-NZ-10	4,6x10 ⁷	4,6x10 ⁷	<10 ³	2,0x10 ⁵	<10 ³	<10 ³	<10 ²	>10 ³	5,75	0	1	nein

AUS=Australien, entfällt*=nicht durchgeführt/nicht auswertbar, GYP=Glukose-Hefe-Extrakt-Pepton-Agar, LA=Lammfleisch, MEA⁺=Malzextraktagar mit Novobiocin, MKZ=Meso-ophile Keimzahl, MRS 5.7=Agar nach de Man, Rogosa und Sharpe mit pH 5,0, MRS 5.0=Agar nach de Man, Rogosa und Sharpe mit pH 5,0, NZ=Neuseeland, Score-Stufen*1: 0=keine sichtbaren Gasblasen; 1=wenige Gasblasen im Fleischtopf sichtbar, 2=Aussehen wie bei Vakuumverlust, 3=offensichtlich aufgebläht, puffig; 4=auf volle Größe aufgebläht, noch nicht prall gespannt; 5=auf volle Größe aufgebläht, Folie straff gespannt; Geruch-Skala: 1= frisch, fleischig, produkt-spezifisch, mit leicht säuerlicher Note; 2= säuerlich, jedoch nicht unappetitlich; 3= sauer, leicht unangenehm, nicht mehr frisch; 4= muffig, stark unappetitlich, verdorben; ; *1=Pack Blowing Score nach BOEREMA et. al, 2007

Tabelle 34: Anzahl und Herkunft der Rindfleischproben, aus denen Hefen isoliert wurden sowie Anzahl der gewonnenen Hefe-Isolate je Probenherkunftsland

Kontinent	Herkunftsland	Anzahl der Rindfleischproben	Anzahl der Rindfleischproben, aus denen Hefen isoliert wurden	Anzahl der Hefe-isolate
Amerika (Nord- und Südamerika)	Argentinien	11	4	8
	Brasilien	1	0	0
	Uruguay	6	3	5
	USA	2	2	3
		20	9	16
Europa	Deutschland	12	3	5
	Frankreich	2	1	2
	Irland	4	2	5
	Niederlande	2	2	7
		20	8	19
Ozeanien	Australien	10	5	9
	Neuseeland	10	4	8
		20	9	17
	Gesamt	60	26	52

Tabelle 35: Anzahl und Herkunft der Lammfleischproben, aus denen Hefen isoliert wurden sowie Anzahl der gewonnenen Hefe-Isolate je Probenherkunftsland

Kontinent	Herkunftsland	Anzahl der Rindfleischproben	Anzahl der Lammfleischproben, aus denen Hefen isoliert wurden	Anzahl der Hefe-isolate
Europa	Deutschland	9	4	7
	Irland	6	3	10
	Wales	5	2	4
		20	9	21
Ozeanien	Australien	3	0	0
	Neuseeland	10	1	1
		13	1	1
	Gesamt	33	10	22

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis, Inhaber des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit des Veterinärwissenschaftlichen Departments der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Überlassung des Themas sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Geräte und Materialien zur Anfertigung der Arbeit. Außerdem danke ich ihm für das Vertrauen, das er in mich setzte.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Rebecca Bonke, für die allzeit gute Betreuung, die Hilfestellung bei der Erstellung dieser Arbeit und die geduldigen Korrekturen.

Weiterhin gilt mein Dank den wissenschaftlichen Mitarbeitern, den technischen Assistenten und den übrigen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit für die herzliche Aufnahme, das gute Arbeitsklima und die schöne gemeinsame Zeit. Ich möchte mich besonders bei Frau Johanna Dietz, Frau Mariko Hermanns und Frau Verena Hohenester für die Unterstützung bei den mikro- und molekularbiologischen Untersuchungen im Labor bedanken. Ganz besonders möchte ich mich außerdem bei Frau Dr. Biermaier, Frau Dr. PD Karin Schwaiger, Frau Dr. Wacheck, Frau Dr. Ziplies und Herrn Dr. Gottschalk für die fachliche sowie moralische Unterstützung und die geduldigen Korrekturen bedanken. Ohne Eure Freundschaft, Hilfe und Geduld wäre die pünktliche Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Frau Dr. Barbara Biermaier stand mir, fachlich und menschlich, stets mit Rat und Tat zur Seite. Danke für deine großartige Hilfe und dafür, dass ich mich immer auf dich verlassen konnte. Frau Stefanie Rupp und Herrn Thomas Körner danke ich für die wertvolle Hilfe im Labor und die schöne gemeinsame Zeit. Bei Herrn Sebastian Ulrich möchte ich mich für die Unterstützung bei Fragen rund um die EDV bedanken.

Frau Dr. Andrea Didier aus dem Lehrstuhl für Milchhygiene danke ich herzlich für ihre Unterstützung und Hilfe bei der PCR und Interpretation der Sequenzierungsergebnisse.

Sybille Holzmann danke ich für ihre Hilfe, ihren Optimismus, ihre Ratschläge, und dafür, dass sie meine Zeit am Lehrstuhl verschönert hat.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen Freunden aus München, die mich stets ermutigt und unterstützt haben und mit denen ich eine wunderbare Zeit hatte.

Schließlich und insbesondere danke ich meiner Mutter, ohne deren Liebe, Stärke und finanzielle Unterstützung weder mein Studium, noch das meiner Schwestern möglich gewesen wären. Sie hat immer an mich geglaubt und in allen Lebenslagen unterstützt. Ebenso waren meine Schwestern Margarita und Stephania Paniora trotz weiter Ferne in den letzten vier Jahren immer für mich da und gaben mir Kraft.