

Natriumnitrit versus Pflanzenextrakt: Wirksamkeit gegenüber *Listeria monocytogenes*

Sodium nitrite versus plant extract: antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*

J. KABISCH, R. PICHNER, H.-G. HECHELMANN und M. GAREIS

Zusammenfassung

Natriumnitrit ist ein künstlicher Lebensmittelzusatzstoff, der den verschiedensten Rohwurstwaren zur Konservierung zugesetzt wird. Chemische Zusatzstoffe werden von den Verbrauchern generell weniger akzeptiert als alternative Zusätze auf pflanzlicher Basis. Über die mikrobiologische Wirksamkeit solcher „Nitritersatzstoffe“ ist die wissenschaftliche Datenlage allerdings unzureichend, weshalb wir einen dieser kommerziell angebotenen nitratthaltigen Pflanzenextrakte näher untersucht haben. Dazu wurden Challenge-Tests mit grober Mettwurst durchgeführt, die künstlich mit *Listeria monocytogenes* belastet wurde. Die Produkte wurden mit dem Zusatz von Nitritpökelsalz oder alternativ mit Pflanzenextrakt hergestellt und die Effekte auf *Listeria monocytogenes* überprüft. In den Untersuchungen zeigte sich, dass der Zusatz des nitratthaltigen Pflanzenextraktes keinen antimikrobiellen Effekt auf den pathogenen Mikroorganismus hatte und eine Vermehrung von *Listeria monocytogenes* nicht ausgeschlossen werden konnte.

Summary

Sodium nitrite is an artificial food additive used for preservation of various types of raw sausage. Generally, consumers accept chemical additives to a lesser extent compared to those based on plant extracts. As only a few studies have addressed the use of nitrate-containing plant extracts against pathogens associated with meat, we investigated a commercially available extract. For that purpose challenge tests of different batches of raw fermented spreadable sausages were inoculated with *Listeria monocytogenes*. Sausages were produced using nitrite curing salt and plant extracts, respectively, in order to assess the effects on *Listeria monocytogenes*.

Our investigations revealed that addition of the nitrate-containing plant extract did not show any antimicrobial effect against *Listeria monocytogenes*. A growth of *Listeria monocytogenes* could therefore not be ruled out.

Schlüsselwörter

Natriumnitrit – Pflanzenextrakt – antimikrobielle Wirkung – fermentierte Rohwurst – *Listeria monocytogenes*

Key Words

sodium nitrite – plant extract – antimicrobial activity – fermented sausage – *Listeria monocytogenes*

Einleitung

Rohwurstzeugnisse stabilisieren sich ausschließlich über einen geeigneten Fermentationsprozess. Dabei entscheiden Ablauf und Bedingungen des Prozesses sowie Zusatzstoffe und Qualität der Ausgangsmaterialien über die Sicherheit des Endproduktes. Das Rohmaterial für die Herstellung von Rohwurstzeugnissen, zumeist Schweine-, aber auch Rindfleisch kann mit verschiedenen Krankheitserregern belastet sein (ALBIHN *et al.*, 2003;

FARBER *et al.*, 1989; FONTAIN *et al.*, 2007; GOBAT and JEMMI, 1990). Zur Haltbarmachung und Wachstumshemmung von solchen unerwünschten Keimen wird Rohwürsten Nitrit oder Nitrat zugesetzt. Nitrat wird hier vor allem bei langgereiften Produkten verwendet. In solchen Produkten wird Nitrat durch chemische bzw. mikrobiologische Reaktionen zu Nitrit umgewandelt. Da diese Prozesse langsam, aber kontinuierlich ablaufen, kann Nitrit seine positiven Wirkungen über einen längeren Zeitraum entfalten.

Zu den positiven Effekten des Nitrits zählen die Umrötung (WIRTH, 1991), Aromabildung (FISCHER *et al.*, 2005), Konservierung (ALBERT *et al.*, 2003; HECHELMANN *et al.*, 1974) und der Oxidationsschutz (ARNETH, 2001; RÖDEL *et al.*, 1992).

Ein unerwünschter Aspekt ist jedoch die Reaktion von Nitrit mit Eiweißbestandteilen in Lebensmitteln zu potenziell Krebs erregenden Nitrosaminen (Rywotycki, 1997; Rywotycki, 2007). Obwohl die Nitritmenge, die täglich über gepökelte Fleisch-erzeugnisse aufgenommen wird, im Vergleich zum endogen produzierten Nitrit sehr gering ist, sind sowohl die Lebensmittel verarbeitenden Betriebe als auch die Wissenschaft daran interessiert, die zugesetzten Mengen so niedrig wie notwendig zu halten. Vom Verbraucher werden nämlich chemische Zusatzstoffe generell weniger akzeptiert als Zutaten auf pflanzlicher Basis (z. B. Gewürze, Pflanzenextrakte).

Gewürzextrakte bzw. -öle enthalten als antimikrobielle Komponente ätherische Öle (BAJPAI *et al.*, 2008; FRIEDLY *et al.*, 2009; MUNOZ *et al.*, 2009). Obwohl diese unter *in-vitro* Bedingungen eine sehr gute Keim hemmende Wirkung zeigen (BAJPAI *et al.*, 2008; FRIEDLY *et al.*, 2009), müssten die ätherischen Öle dem Produkt in hohen und somit in sensorisch nicht akzeptablen Konzentrationen zugesetzt werden.

In der Praxis werden daher nitrathaltige Pflanzenextrakte bevorzugt. Diese haben den Vorteil, dass sie zum einen auf Grund ihrer roten Farbe das Rohwurstprodukt sofort umröten und dass sie zum anderen Nitrit über chemische und mikrobiologi-

sche Prozesse über einen langen Zeitraum aus dem Nitrat bilden. Einen weiteren Vorteil bieten diese Wurstwaren den Herstellern, da mit Gewürz- und Pflanzenextrakten umgerötete Rohwurstprodukte als „Konservierungsstoff frei“ deklariert werden können, obwohl sie z. T. einen hohen Nitratgehalt aufweisen und somit ebenfalls zur Bildung von Nitrosaminen beitragen können (FISCHER *et al.*, 2005). Die mikrobiologische Stabilität solcher Produkte kann derzeit nicht ausreichend bewertet werden, da entsprechende wissenschaftliche Studien bislang fehlen.

Ziel des Projektes war daher die Überprüfung des Verhaltens/der Absterbekinetiken von *Listeria monocytogenes* in einem schnittfesten Rohwurstprodukt, das ohne Nitritzusatz hergestellt wurde. Dazu wurde die Originalrezeptur mit Pflanzenextrakt (0,5 %) mit einer Rezeptur mit Nitritpökelsalz (0,8-0,9 %) verglichen.

Material und Methoden

Um das Verhalten der Lebensmittelinfektionserreger unter dem Einfluss variabler Faktoren und unter praxisüblichen Reifungsverfahren zu prüfen, wurden Challengetest durchgeföhrt. Dazu wurde eine handelsübliche grobe Mettwurst artifiziell mit einem Pool von drei *Listeria monocytogenes* Stämmen kontaminiert.

Zur Herstellung des Beimpfungspools (Inokulum) wurden die aus Tabelle 1 ersichtlichen Mikroorganismen aus der Stammsammlung des Max Rubner-Institutes eingesetzt.

Tab. 1: Artname, Stammnummer und Herkunft der verwendeten Organismen

Art	Serotyp	Stammnummer	Herkunft
<i>Listeria monocytogenes</i>	1/2 a	Li 127 SLCC 6139	Liquor/Mensch Universität Mannheim (D)
<i>Listeria monocytogenes</i>	4 b	Li 2 NTCC 10527	Liquor/Mensch BgVV Berlin (D)
<i>Listeria monocytogenes</i>	4 d	Li 135	Produktionsumfeld MRI-Kulmbach (D)

SLCC: Seeligers *Listeria* Culture Collection (Prof. Seeliger, Würzburg);

NTCC: National Collection of Type Cultures;

Li: Stammnummern des Max Rubner-Institutes (MRI) Kulmbach

Die Höhe der eingesetzten Keimmenge wurde variiert, um zum einen zu sehen, wie sich die eingesetzten Mikroorganismen unter realistischen und zum anderen unter Bedingungen mit einer sehr hohen Beimpfung im Produkt verhalten. Im ersten Fall wurde das Brät mit einer Keimdichte von $2 \log_{10}$ KbE/g (1×10^2 KbE/g), im zweiten mit $3 \log_{10}$ KbE/g (1×10^3 KbE/g) und im dritten Fall mit $5 \log_{10}$ KbE/g (1×10^5 KbE/g) beimpft.

Insgesamt wurden zwei Untersuchungsreihen im Dreifachansatz durchgeführt, wobei die unbeimpften Kontrollchargen im Versuchsablauf zuerst hergestellt wurden. Die verwendeten Rezepturen sind detailliert in Tabelle 2 angegeben.

Die anschließende Reifung, Verpackung unter Schutzatmosphäre und Lagerung wurden unter praxisüblichen Bedingungen durchgeführt (siehe Tab. 3).

Bei den mikrobiologischen Untersuchungen wurde der Keimzahlverlauf der eingepflichten Stämme, der Milchsäurebakterienflora, der *Enterobacteriaceae* sowie der aeroben mesophilen Mikroorganismen bestimmt. Das Rohmaterial wurde vor der Keimzugabe auf das Vorhandensein von *Listeria monocytogenes* untersucht.

An den Probenziehungstagen wurden die Mettwürste mit einem sterilen Skalpell in der Mitte senkrecht aufgeschnitten. Anschließend wurden unter sterilen Bedingungen 25 g Probenmaterial entnommen und zusammen mit 225 ml 0,85%iger Kochsalzlösung für zwei Minuten im Stomacher homogenisiert. Die Keimzahlbestimmung von *Listeria monocytogenes* erfolgte entsprechend den amtlichen Untersuchungsverfahren des § 64 LFGB mit zwei verschiedenen selektiven Medien. Die Berechnung der Keimdichte der pathogenen Bakterien sowie der Zahl der aeroben Milchsäurebakterien und der aeroben mesophilen Keimflora erfolgte wie unter Punkt 8 der Methode L 06.00 § 64 LFGB beschrieben.

Ergebnisse

Mettwürste sind sortenabhängig gereifte, umgerötete und stark abgetrocknete und somit zur längeren Lagerung bestimmte Fleischerzeugnisse. Eine Mettwurst ist eine Rohwurst aus Schweinemett, einem kräftig gewürzten Hackfleisch, das meist durch Räuchern oder Trocknung haltbar gemacht wird. Je nach Rezept und Region variieren Größe, Feinheit, Würzung und Dauer der Trocknung.

Tab. 2: Verwendete Rezeptur

Pflanzenextrakt - Charge (NATASY S507)			Natriumnitrit - Charge		
Zusatz	Menge pro kg		Zusatz	Menge pro kg	
Natriumchlorid	28 g	2,8 %	Natriumchlorid	28 g	2,8 %
Salamiwürzung	13 g	1,3 %	Salamiwürzung	13 g	1,3 %
NATASY	5 g	0,5 %	Natriumnitrit	252 mg	0,0025 %
Starterkultur	0,8 g	0,08 %	Starterkultur	0,8 g	0,08 %

Tab. 3: Reifeparameter

Zeit	Temperatur	relative Feuchte	Windgeschwindigkeit
1 d	24 °C	95 %	0,2-0,3 m/s
1 d	22 °C	90 %	0,3 m/s
1 d	18 °C	85 %	0,4-0,5 m/s
11 d	14 °C	75 %	0,4-0,5 m/s
Verpackung unter Schutzatmosphäre; 20 % CO ₂ und 80 % N ₂			
28 d	17 °C	-	-

Beimpungsdosis 1×10^2 KbE/g

Es zeigte sich, dass nur in den Chargen mit Natriumnitrit ein Wachstum der eingepfunden Keime verhindert werden konnte (siehe Abb. 1). In den Ansätzen mit einem nitrathaltigen Pflanzenextrakt nahm die Keimzahl innerhalb von 24 Stunden um fast eine Zehnerpotenz zu. Dieser

Zellzahlunterschied blieb bis zum letzten Untersuchungstag bestehen.

Des Weiteren konnte in beiden Ansätzen nur eine leichte Reduktion der Keimzahl von *Listeria monocytogenes* beobachtet werden. Eine vollständige Eliminierung der Keime im Brät war somit auch nach 6 Wochen nicht möglich.

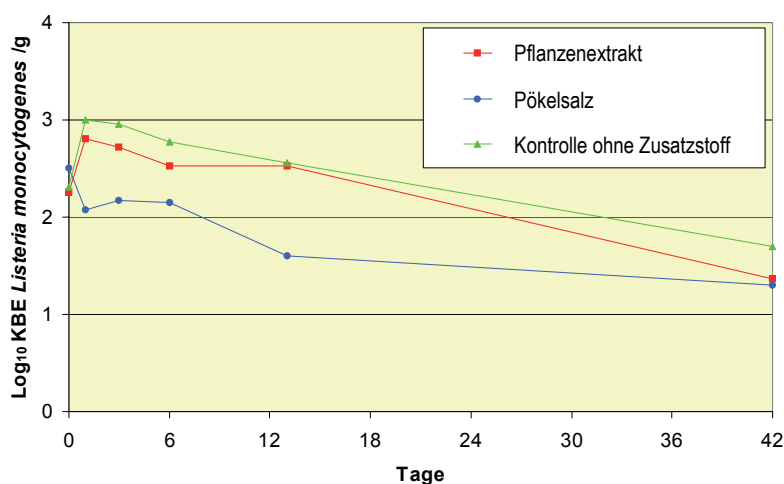


Abb. 1: Einfluss von 0,5 % Pflanzenextrakt und 0,8-0,9 % Pökelsalz auf die Tenazität von *Listeria monocytogenes* in einer Mettwurst

Beimpungsdosis 1×10^3 KbE/g

Wurde das Inokulum auf 1000 Keime pro g Brät erhöht, so konnte auch in diesen Ansätzen eine deutliche Zunahme nur in den mit Pflanzenextrakt hergestellten Chargen beobachtet werden. Der Anstieg der *Listeria monocytogenes* Konzentration fiel hier im Vergleich zur realistischen Beimpfung (vgl. Abb. 1 und 2) sogar noch etwas deutlicher aus. Innerhalb der ersten drei Reifetage stieg die Keimdichte in den mit Pflanzenextrakt hergestellten Chargen

um 1,5 Zehnerpotenzen auf 1×10^5 KbE/g an. In der Charge mit Natriumnitrit konnte zwar anfänglich ebenfalls ein leichtes Wachstum beobachtet werden, jedoch wurden am Tag 3 wieder mit der Ausgangskeimzahl vergleichbare Werte nachgewiesen (siehe Abb. 2). Mit fortschreitender Reifung und Lagerung des Produktes nahm die Keimzahl nicht weiter ab, so dass *Listeria monocytogenes* in beiden Chargen bis zum letzten Untersuchungstag festgestellt werden konnte.

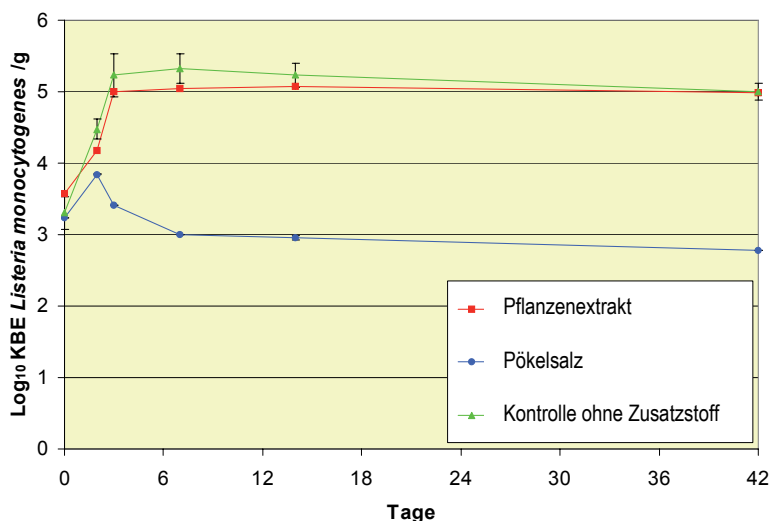


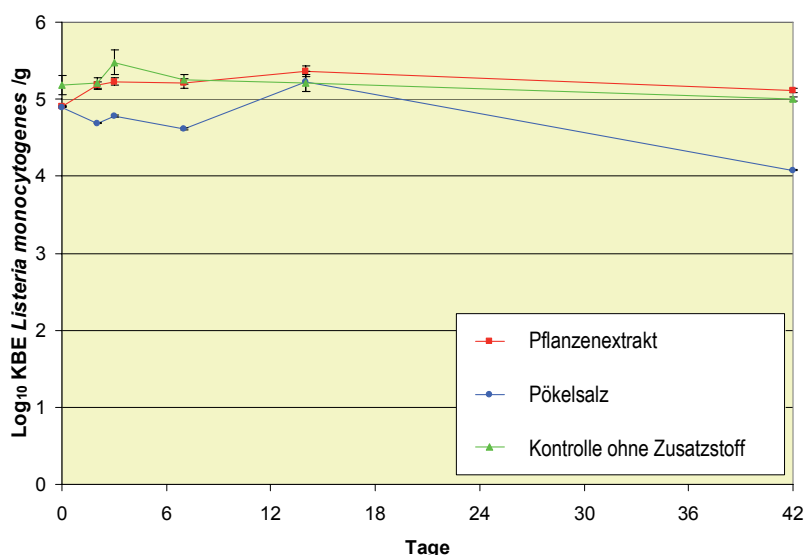
Abb. 2: Einfluss von 0,5 % Pflanzenextrakt und 0,8-0,9 % Pökelsalz auf die Tenazität von *Listeria monocytogenes* in einer Mettwurst

Beimpfungsdosis 1×10^5 KbE/g

Auch bei einer Erhöhung der zugesetzten Keimmenge auf 100.000 KbE/g konnte nur in den Ansätzen mit Natriumnitrit eine Wachstumshemmung beobachtet werden (siehe Abb. 3). In den Versuchen mit dem pflanzlichen Extrakt nahm die Zellzahl von *Listeria monocytogenes* erneut zu. Obwohl

der Anstieg in diesen Untersuchungen etwas schwächer ausfiel, konnte doch eine Tendenz beobachtet werden, die gut mit den Ergebnissen der zwei vorangegangenen Versuche übereinstimmt (vgl. Abb. 1, Abb. 2 und Abb. 3). Eine deutliche Reduktion der Keimzahlen konnte erneut in keinem der Ansätze festgestellt werden.

Abb. 3: Einfluss von 0,5 % Pflanzenextrakt und 0,8-0,9 % Pökelsalz auf die Tenazität von *Listeria monocytogenes* in einer Mettwurst

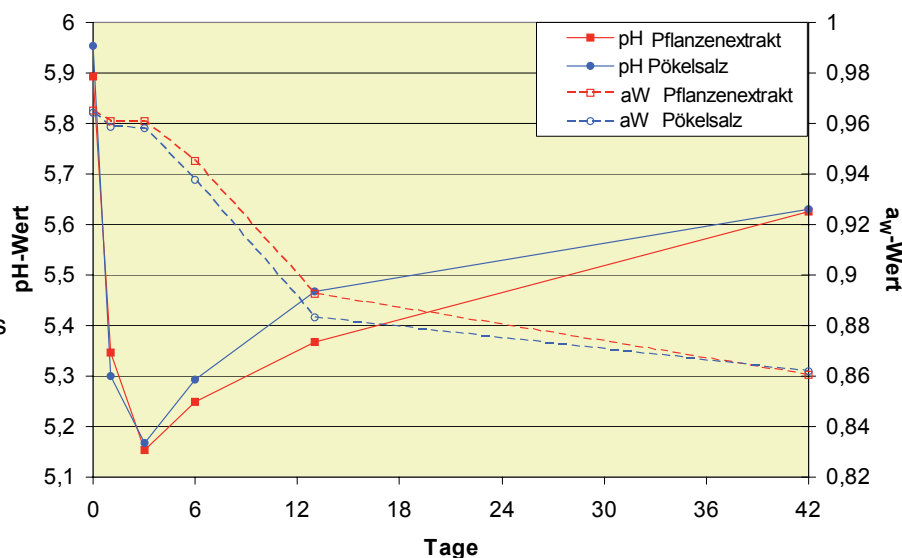


pH- und a_w -Wertverlauf

Zum Beginn der Untersuchungen lag der pH-Wert zwischen 5,9 und 5,95 und fiel bei allen Chargen innerhalb von drei Tagen auf Werte von 5,15 (siehe Abb. 4) ab. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Chargen war nicht zu erkennen. Mit Zunahme der Lagerungszeit stieg der pH-Wert in beiden Produkten auf 5,65 am Tag 42 an.

Der a_w -Wert betrug am Tag 0, kurz nach der Beimpfung, 0,963 (siehe Abb. 4). Die Abnahme der Wasseraktivität war bei beiden Chargen vergleichbar. Nach einer 14-tägigen Reifung wurden in den Ansätzen a_w -Werte von 0,88 bis 0,89 gemessen. Nach dem Verpacken unter Schutzatmosphäre nahm die Wasseraktivität, bedingt durch den behinderten Wasseraustausch, nur noch geringfügig ab.

Abb. 4: Vergleich des Einflusses eines Pflanzenextraktes (0,5 %) und Pökelsalz (0,8-0,9 %) auf den pH- und a_w -Wertverlauf in einer Mettwurst



Am Tag 42 wurde in beiden Chargen ein a_w -Wert von 0,861 gemessen (siehe Abb. 4). Wie auch der Vergleich zur unbeimpften Charge zeigte, blieb der a_w -Wert am Anfang und im Verlauf der Reifung durch den eingepflichten Keimpool unbeeinflusst.

Technologische Beurteilung

Die mit einem Nitritersatzstoff hergestellte Mettwurst wies bereits am Tag der Herstellung eine angenehme rote Farbe auf (siehe Abb. 5). Ab dem dritten Reifetag waren beide Produkte hinsichtlich der Farbintensität und Farbhaltung nicht mehr zu unterscheiden (siehe Abb. 6). Die Farbstabilität in den mit Pflanzenextrakten hergestellten Mettwürsten blieb bis zum letzten Untersuchungstag gewährleistet.



Abb. 5: Vergleich einer mit 0,5 % Pflanzenextrakt (A) und einer mit 0,8-0,9 % Pökelsalz hergestellten Mettwurst (B) am Tag 0



Abb. 6: Vergleich einer mit 0,5 % Pflanzenextrakt (A) und einer mit 0,8-0,9 % Pökelsalz hergestellten Mettwurst (B) am Tag 3

Beide Mettwurst-Chargen hatten bis zum letzten Tag einen aromatischen und frischen Geruch. Jedoch wies die mit einem alternativen Nitritersatzstoff hergestellte grobe Mettwurst nicht das typische Pökelaroma auf.

Schlussfolgerung

Die ersten Reifetage sind für das Produkt Mettwurst entscheidend, da hier die stabilisierenden Faktoren wie niedriger a_w - und pH-Wert noch nicht ausgeprägt sind. Hier verhinderte Nitrit sehr effektiv das Wachstum von *Listeria monocytogenes*. Allein in den Mettwürsten, die mit dem nitrathaltigen Pflanzenextrakt produziert wurden, konnte eine Zunahme der Keimdichte von *Listeria monocytogenes* nachgewiesen werden. Somit wurde durch die Reduktion des Nitrats, sowohl auf chemischen als auch auf mikrobiologischem Weg, nicht genügend Natriumnitrit für eine antimikrobielle Wirkung freigesetzt. Dies führte dazu, dass sich *Listeria monocytogenes* am Anfang der Reifung bei relativ hohen pH- und a_w -Werten vermehren konnte. Erst als nach drei Tagen ein sehr niedriger pH-Wert von 5,15 erreicht wurde, konnte das Wachstum der pathogenen Keime gestoppt werden.

Durch die dynamisch im Produkt ablaufenden Prozesse war von diesem Moment an keine weitere Vermehrung mehr möglich, da der Stoffwechsel von *L. monocytogenes* sich an die ändernden Umweltbedingungen anpassen musste. Die dazu benötigte Energie fehlte damit für ein weiteres Wachstum.

Mit der Absenkung des a_w -Wertes im Laufe der Reifung auf unter 0,89 wurde das Produkt mikrobiologisch stabilisiert, da unterhalb dieser Grenze ein Wachstum von *L. monocytogenes* nicht möglich ist (KOSEKI and YAMAMOTO, 2007).

Weiterhin fiel in den Untersuchungen auf, dass die Keimzahl von *Listeria monocytogenes* nie unter die mikrobiologische Nachweisgrenze von < 10 KbE/g gesenkt

werden konnte. Der Keim erwies sich damit auch bei sehr niedrigen Wasseraktivitätswerten von 0,86 als sehr widerstandsfähig. Auf Grund der Ergebnisse wird deutlich, dass *Listeria monocytogenes* in den Fleisch verarbeitenden Betrieben besonderer Beachtung bedarf.

Auf Grund der Ergebnisse aus unseren früheren Untersuchungen wird ein Zusatz von mindestens 100 mg/kg Natriumnitrit empfohlen, um das Produkt Rohwurst vor allem in den ersten Reifetagen mikrobiologisch zu stabilisieren. Aus technologischer Sicht jedoch war das mit einem Nitritersatzstoff (Natasy) hergestellte Produkt nicht zu beanstanden.

Literatur

- Albert, T., M. Gareis, and L. Kröckel. 2003. Microbiological quality of organically produced meat products. *Fleischwirtschaft* 83:147-150.
- Albihn, A., E. Eriksson, C. Wallen, and A. Aspan. 2003. Verotoxinogenic *Escherichia coli* (VTEC) O157: H7 a nationwide Swedish survey of bovine faeces. *Acta Veterinaria Scandinavica* 44:43-52.
- Arneth, W. 2001. Chemistry of curing meat flavour. *Fleischwirtschaft* 81:85-87.
- Bajpai, V., T. D. Nguyen, O. Kwon, and S. Kang. 2008. Analysis and the potential applications of essential oil and leaf extracts of *Silene armeria* L. to control food spoilage and food-borne pathogens. *European Food Research and Technology* 227.
- Farber, J. M., G. W. Sanders, and M. A. Johnston. 1989. A Survey of Various Foods for the Presence of *Listeria* Species. *Journal of Food Protection* 52:456-458.
- Fischer, A., K. Ulmer, G. Wolf, and A. Bristle. 2005. Reddening of emulsion type sausage without nitrite curing salt 2. Influence on microbial growth, shelf life and sensory properties. *Fleischwirtschaft* 85:106-109.
- Fontain, M. C. G., J. M. Lorenzo, S. Martinez, I. Franco, and J. Carballo. 2007. Microbiological characteristics of Botillo, a Spanish traditional pork sausage. *Lwt-Food Science and Technology* 40:1610-1622.
- Friedly, E. C., P. G. Crandall, S. C. Ricke, M. Roman, C. O'Bryan, and V. I. Chalova. 2009. In vitro Antilisterial Effects of Citrus Oil Fractions in Combination with Organic Acids. *Journal of Food Science* 74:M67-M72.
- Gobat, P. F. and T. Jemmi. 1990. Epidemiologic Studies on *Listeria* Spp. in Slaughterhouses. *Fleischwirtschaft* 70:1448-1450.
- Hechelmann, H., Z. Bem, K. Uchida, and L. Leistner. 1974. Microorganisms of the Klebsiellae tribe in refrigerated meat and products. *Fleischwirtschaft*: 54 (9) 1515-1517 54:1515-1517.
- Koseki, S. and K. Yamamoto. 2007. Water activity of bacterial suspension media unable to account for the baroprotective effect of solute concentration on the inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology* 115:43-47.
- Munoz, M., L. Guevara, A. Palop, J. Tabera, and P. S. Fernandez. 2009. Determination of the effect of plant essential oils obtained by supercritical fluid extraction on the growth and viability of *Listeria monocytogenes* in broth and food systems using flow cytometry. *Lwt-Food Science and Technology* 42:220-227.
- Rödel, W., R. Scheuer, A. Stiebing, and P. G. Klettner. 1992. Measuring the oxygen content in meat products. *Fleischwirtschaft* 72:966-968.
- Rywotycki, R. 1997. The occurrence of nitrosamines in meat. *Medycyna Weterynaryjna* 53:726-729.
- Rywotycki, R. 2007. The effect of baking of various kinds of raw meat from different animal species and meat with functional additives on nitrosamine contamination level. *Food Chemistry* 101:540-548.
- Wirth, F. 1991. Restricting and Dispensing with Curing Agents in Meat-Products. *Fleischwirtschaft* 71:1051-1054.

