

Neuere Erkenntnisse zur Hürdentechnologie – Erfassung von kombinierten Hürden

Recent results on the hurdle technology – Measuring of combined hurdles

W. RÖDEL und R. SCHEUER

Zusammenfassung

Das Wechselspiel dreier Verfahren/Hürden, nämlich der Temperatur (Gradient 17 °C bis 27 °C; Schrittweite 1 °C), der Wasseraktivität (a_w -Wert 0,990; 0,985; 0,980) und eines Konservierungstoffes (Natriumnitrit) wird, im Hinblick auf das mikrobiologische Verhalten von *Escherichia coli* (*E. coli*), in zwei unterschiedlich hohen Ausgangs-Keimzahlen (ca. 1×10^3 und 1×10^6 KBE/ml) betrachtet. Die Untersuchungen zeigen, dass die Hürden äußerst komplexe Abhängigkeiten aufweisen können. Keinesfalls ist das Bild einer einfachen additiven Wirksamkeit zwischen Hürden gegeben, vielmehr zeigt sich ein äußerst vielfältiges Verhaltensmuster. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass das Hürdenmodell nur unter quantitativen Gesichtspunkten betrachtet werden kann. Nicht nur der Einfluss der Temperatur auf das Keimwachstum wird durch die sonstigen Milieubedingungen erst definiert, auch die Wirksamkeit eines Zusatzstoffes (Konservierungstoffes) kann sich milieuhängig ändern. Ziel der Untersuchungen wird es sein, bei ausreichender Datenlage eine voraussagende Mikrobiologie zu ermöglichen.

Summary

The fluctuation of three treatments/hurdles, i.e. the temperature (gradient 17 °C to 27 °C, step 1 °C), the water activity (a_w of 0.990, 0.985, 0.980) and the preservative sodium nitrite, are examined with regard to the microbial behaviour of *Escherichia coli*. The bacterial counts of the inoculum were 1×10^3 and 1×10^6 cfu/ml. The results indicate that the effects of the hurdles can show very complex dependencies. In no case the hypothesis of a simple additive effect between different hurdles is sufficient and correct. Usually the microorganisms show extremely various behaviour patterns. The investigations presented here document the necessity to consider the 'hurdle-model' from a quantitative point of view. Not only the influence of the temperature on the activity of the microorganisms will be defined by the other environmental conditions, but the efficiency of an additive (preservative) like sodium nitrite can be changed by the environmental influence, too. The goal of this investigation is to enable a predictive microbiology, if the database is adequate.

Schlüsselwörter	Hürdentechnologie – <i>Escherichia coli</i> – kombinierte Hürden – quantitative Erfassung
Key Words	hurdle technology – <i>Escherichia coli</i> – combined hurdles – quantitative measuring

Einleitung

Technologie ist ein Unterbegriff der Technik und bezeichnet das Anwenden eines oder mehrerer physikalischer, chemischer oder biologischer Verfahren in festgelegter logistischer Vernetzung, um bestimmte Stoffe oder Erzeugnisse zu gewinnen, zu verarbeiten oder herzustellen. Bezogen

auf Lebensmittel handelt es sich bei diesen Verfahren z.B. um Erhitzung oder Kühlung (physikalische Verfahren), Absenkung des Wasseraktivitäts-Wertes durch Trocknung oder Salzung (physikalisch-chemische Verfahren), Einsatz von Konservierungstoffen (chemische Verfahren), Säuerung durch Gluconodelta-lacton oder Milchsäure (chemisch-biologische

Verfahren), Reifung (biologische Verfahren). Diese Verfahren können im Sinne einer mikrobiologischen Stabilisierung der Lebensmittel auch als Hürden bezeichnet werden. Daher der Begriff „Hürdentechnologie“.

Einer der Ausgangspunkte der Hürdentechnologie war eine Betrachtung der Wasseraktivitätswerte (a_w -Werte) und Säuregrade (pH-Werte) handelsüblicher Fleischerzeugnisse aus Deutschland. Den gemessenen a_w - und pH-Werten wurden Literaturdaten über die Mikrobiologie von Verderbnis erregenden oder pathogenen Mikroorganismen gegenübergestellt (RÖDEL, 1975). Für die Fleischerzeugnisse konnten Werte in einem pH-Wert-Bereich von 4,5 bis 6,8 und einem a_w -Wert-Bereich von 0,70 bis 0,98 ermittelt werden, wobei die Messwerte des weitaus überwiegenden Anteils der Fleischerzeugnisse in einem engeren Feld von pH 5,5 bis pH 6,5 und a_w 0,87 bis a_w 0,97 lagen. In der Graphik (Abb. 1) sind die Bereiche

lagerfähiger Fleischerzeugnisse grün markiert, verderblicher Fleischerzeugnisse (maximale Lagertemperatur 10 °C) gelb und leicht verderblicher Fleischerzeugnisse (maximale Lagertemperatur 5 °C) rot. Aufgrund der Datenbasis bezieht sich diese Graphik ausschließlich auf Fleischerzeugnisse, die in guter handwerklicher Praxis (geringe Ausgangskeimzahlen) gewonnen wurden und mit einer Keimflora-Zusammensetzung, wie sie für diese Produkte zu erwarten ist. Weitere quantitative Untersuchungen anderer Lebensmittel bzw. anderer Verfahren sind prinzipiell möglich, liegen jedoch bisher nicht vor.

Auf Grundlage auch dieser Untersuchungen wurde ein Modell entwickelt, das die mikrobiologische Stabilität und Sicherheit der Lebensmittel über gegenseitig unabhängige Hürden definiert, die sich ergänzen und beliebig verändert und ausgetauscht werden könnten (LEISTNER, 1995, 2000, 2002, 2003).

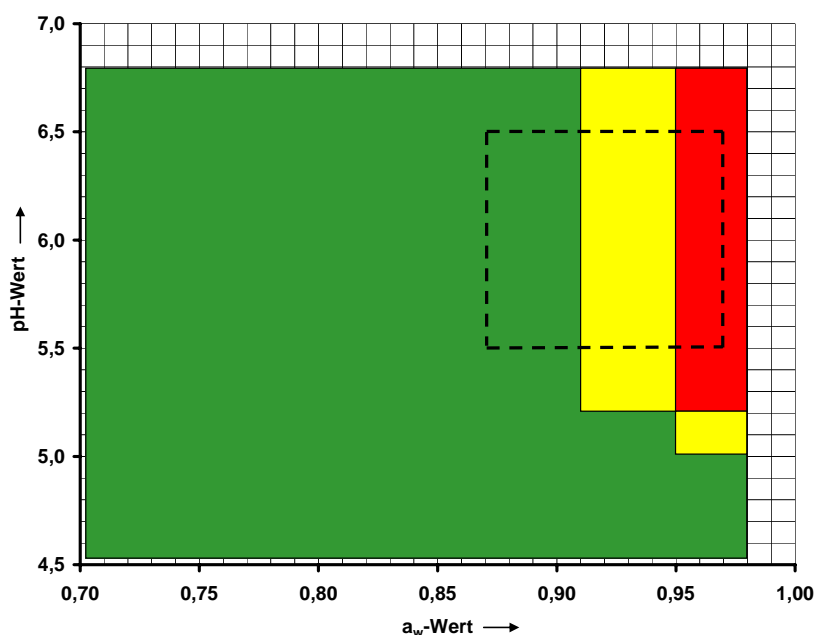


Abb. 1: Hürdenkonzept für Fleischerzeugnisse (nach RÖDEL, 1975)*.

- pH < 5,0; oder a_w < 0,91; oder pH < 5,2 und a_w < 0,95; Kühlung nicht erforderlich (lagerfähig)
- pH = 5,2 => 5,0; oder a_w = 0,95 => 0,91; Temperatur max. 10 °C (verderblich)
- pH > 5,2 und a_w > 0,95; Temperatur max. 5 °C (leicht verderblich)

(*) Fleischerzeugnisse können grundsätzlich in dem dargestellten Bereich von pH 4,5-6,8 und a_w 0,70-0,98 liegen. Mehr als 90 % der Produkte zeigen jedoch ein weitaus engeres Spektrum von pH 5,5-6,5 und a_w 0,87-0,97 (gestricheltes Rechteck)

Ein Modell ist eine Vereinfachung der realen Vorgänge oder Zustände, wobei das Modell sich immer an der Nützlichkeit orientieren sollte (Pragmatismus: Für wen?, Warum?, Wozu?). Wesentlich ist letztlich die Rechtfertigung der Zuverlässigkeit der Fiktion durch die tätige Praxis, das heißt der praktische Nachweis, dass die mit Hilfe des Modells aufgebaute Theorie auf die realen Verhältnisse effektiv angewendet werden kann.

In der nachfolgend beschriebenen Versuchsanordnung wird das Wechselspiel dreier Verfahren/Hürden, das sind die Temperatur (Gradient 17 °C bis 27 °C; Schrittweite 1 °C), der a_w -Wert (0,990; 0,985; 0,980) und ein Konservierungsstoff (Natriumnitrit), im Hinblick auf das mikrobiologische Verhalten eines „Testkeims“ betrachtet. Als „Testkeim“ diente *Escherichia coli* (*E. coli*) in zwei unterschiedlich hohen Ausgangs-Keimzahlen (ca. 1×10^3 und 1×10^6 Keime pro Milliliter (KBE/ml)). Während des Versuchsablaufes wurden kontinuierlich oder in gewissen zeitlichen Abständen die Keimzahl, das Redoxpotential, der pH-Wert, der a_w -Wert und die Konzentration von Natriumnitrit in dem Nährsubstrat gemessen.

Material und Methoden

Es wurden sowohl physikalisch-chemische als auch mikrobiologische Messungen durchgeführt.

Messanordnung

Das System zur kontinuierlichen Messung der Redoxpotentiale und pH-Werte besteht aus Einstabmessketten (Fa. Schott, Typ Sa Pt 6140) und pH-Einstichelektroden (Fa. Ahlborn, Typ PHEE-112-S), einem Datenlogger (Fa. Ahlborn, ALMEMO 2590-9 V5[®]) zur Aufnahme der Messsignale und einer Datenerfassungsanlage (Laptop) zur Speicherung und Verarbeitung der Daten (Software: Fa. akrobat[®] software, AMR WinControl). Die Messelektroden stecken in passgenauen Messröhrchen, die über einen Thermoblock (Eigenanfertigung) einem exakt festgelegten Temperaturgradienten ausgesetzt werden (Abb. 2). Der Temperaturgradient verlief

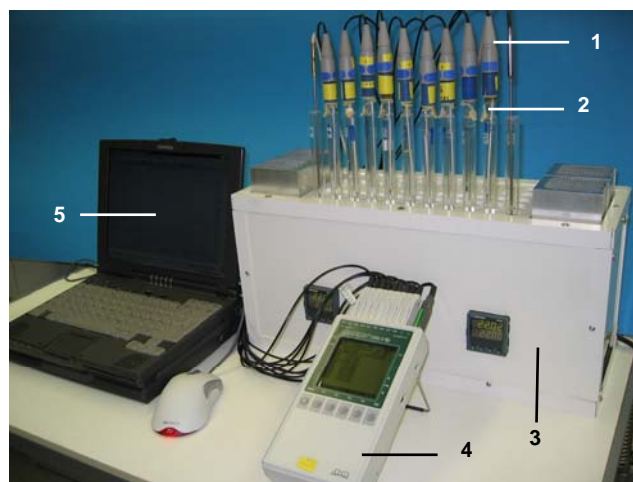


Abb. 2: Messanordnung: 1: Elektrode; 2: Messröhrchen; 3: Thermoblock mit Temperaturgradient (17 °C bis 27 °C); 4: Datenlogger; 5: Datenerfassungsanlage

während der Messreihen von 17 °C bis 27 °C mit einer Schrittweite je Messreihe von 1 °C (Peltiersteuerung). Alle Messungen waren als Doppelmessungen angelegt. Eine eingehende Beschreibung der Methodik zur Redoxpotential-Messung wurde von uns bereits publiziert (RÖDEL und SCHEUER, 1998, 2003a). Der Wasseraktivitätswert wurde am Anfang und Ende der jeweiligen Messreihe mit einem a_w -Kryometer AWK-20[®] (Fa. NAGY) – ebenfalls über Doppelmessung – ermittelt (RÖDEL *et al.*, 1989), der Natriumnitrit-Gehalt in täglichem Abstand direkt in der Suspension der Proben mit Teststäbchen (Merck, Nitrit-Test, Merckoquant) halbquantitativ anhand einer Farbreaktion bestimmt.

Mikrobiologische Methoden

Alle Untersuchungen wurden in einem Flüssig-Nährmedium (Merck, EC-Bouillon) mit einem zusätzlichen Phosphatpuffer (5,50 g Natrium-dihydrogen-phosphat-monohydrat und 7,12 g di-Natriumhydrogen-phosphat-dihydrat pro Liter; äquimolare Lösung) durchgeführt. Die Pufferzugabe sollte den pH-Wert während der Messungen möglichst konstant halten. Durch Zugabe von Kochsalz ergaben sich Wasseraktivitätswerte von circa 0,990; 0,985 und 0,980 in der Bouillon. Die Ausgangskonzentrationen von Natriumnitrit betragen 0 mg/l, 200 mg/l und 400 mg/l. Die einzelnen Chargen wurden mit einem Pool von *E. coli*-Isolaten (Stämme E 162,

E 163, E 164 der Stammsammlung der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel; Standort Kulmbach) beimpft. Die Inokulationsraten betragen etwa $1,1$ bis $3,5 \times 10^3$ KBE/ml (niedriges Inokulum) und $1,3$ bis $3,1 \times 10^6$ KBE/ml (hohes Inokulum).

Zur Keimzählung von *E. coli* wurde jeweils 1 ml der Nährbouillon entnommen und mit 9 ml physiologischer Kochsalzlösung gut vermischt. Nach Anlegen von Verdünnungsreihen wurden jeweils 0,1 ml der entsprechenden Verdünnungsstufen auf Standard I-Agar (Merck) zur Bestimmung der *E. coli*-Zahl aufgetragen und anschließend bei 37 °C für 24 Stunden bebrütet.

Ergebnisse und Diskussion

Aufgrund des aufwändigen Versuchsaufbaus und der Vielzahl der untersuchten Parameter muss sich die Darstellung auf eine Auswahl charakteristischer Ergebnisse beschränken, die jedoch so ausgewählt worden sind, dass sich ein sinnvoller Gesamtüberblick ergibt.

Physikalisch-chemische Untersuchungen
Während der Messung lag ein Temperaturgradient von 17 °C bis 27 °C vor. Die Temperaturdifferenz zwischen den einzelnen Messröhrchen betrug jeweils ein Grad. Die exakte Einstellung und Konstanz der Messtemperatur wurde vor und während des Messverlaufes mit Pt 100 Messfühlern überprüft. Es konnten nur geringfügige Abweichungen von $<0,1$ °C festgestellt werden.

Der pH-Wert wurde durch Zugabe eines Phosphatpuffers weitgehend stabilisiert. Der Ausgangs pH-Wert lag im Bereich von ca. 6,4 bis 6,7. Während der Messung konnte der Wert zeitweise – in Phasen hohen Keimwachstums – um maximal ca. 0,6 pH Einheiten abfallen, stabilisierte sich danach aber wieder auf dem Ausgangswert.

Der Wasseraktivitätswert wurde durch Zugabe von Kochsalz eingestellt. Der Messverlauf hatte keinen nachweisbaren Einfluss auf den Wasseraktivitätswert, so

dass Ausgangs- und Endwert nahezu gleich waren.

Die Restgehalte von Natriumnitrit wurden jeweils am ersten, zweiten, dritten und sechsten Versuchstag halbquantitativ mit Teststäbchen ermittelt. Es zeigte sich ein enger Zusammenhang zwischen der Abbaugeschwindigkeit und der Höhe des Inokulums, des Wasseraktivitätswertes und der Temperatur. Je höher die mikrobielle Aktivität im Medium war, desto höher war auch – wie erwartet – die Abbaugeschwindigkeit von Natriumnitrit.

Der Verlauf der Redoxpotentiale spiegelt den Keimverlauf während der Messungen wider. Die Ergebnisse der Redoxpotentialmessungen soll an vier Beispielen erläutert werden. In Abbildung 3 ist der Relativwert der Wirksamkeit der „Hürde Temperatur“ gegen die vorgelegte Temperatur aufgetragen. Der dargestellte „Relativwert“ wurde aus der Dauer der „elektronischen Lag-Phase“ ermittelt. Wir haben über das Verfahren bereits mehrfach berichtet (RÖDEL und SCHEUER, 2003a, 2003b, 2004). Bei hohen Wasseraktivitätswerten zeigt der Verlauf der errechneten Kurven ein völlig erwartetes Verhalten. Zwei Kurven sind dazu dargestellt. Die rote Kurve bei hoher Ausgangskeimzahl, die grüne Kurve bei geringer Ausgangskeimzahl. Beide Kurven steigen zu tieferen Temperaturen hin an. Das heißt, bei tieferen Temperaturen ist die „elektronische Lag-Phase“ verlängert, das Keimwachstum also verlangsamt. Einen analogen Verlauf hat die Kurve bei geringerer Ausgangskeimzahl. Die Kurve ist jedoch nach oben verschoben und zeigt einen etwas steileren Steigungsverlauf. Die „elektronische Lag-Phase“ wird durch die geringeren Ausgangskeimzahlen verlängert. Bei abgesenkten Wasseraktivitätswerten (durch Kochsalzzugabe zur Bouillon) sind die Kurven weiter nach oben verschoben, was auf ein verzögertes Wachstum bei tieferen Wasseraktivitätswerten hinweist. Der Kurvenverlauf zeigt jedoch Minima. Beide Kurvenverläufe weisen ansonsten ein paralleles Verhalten auf. Die Kurve bei geringeren Ausgangskeimzahlen (schwarz) ist erwartungsgemäß nach oben verschoben. Hürden, wie Wasseraktivitäts-

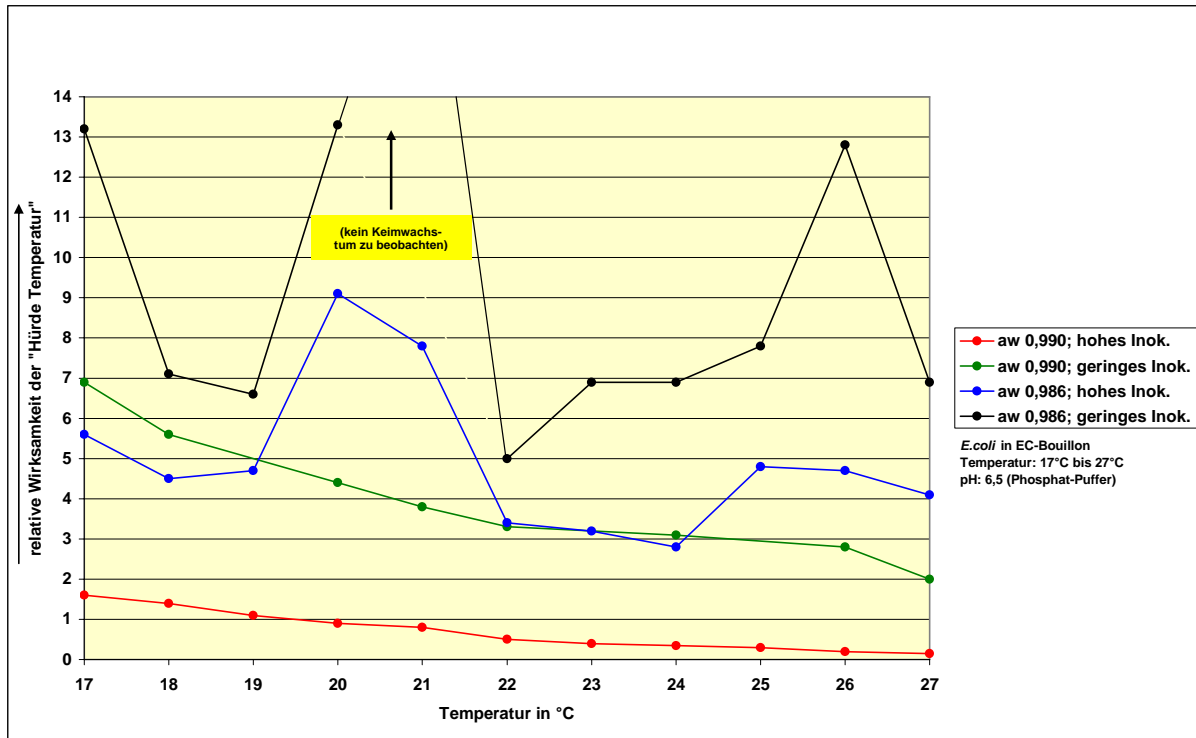


Abb. 3: Relative Wirksamkeit der „Hürde Temperatur“ in Abhängigkeit zur Wasseraktivität und zur Ausgangskeimzahl

Absenkung und Absenkung der Temperatur, addieren sich jedoch bemerkenswerterweise nicht einfach. Im mittleren Temperaturbereich kann es nach vorliegender Beobachtung zu Minima kommen. Dieses Phänomen wurde in der Literatur bereits mehrfach als 'metabolic exhaustion' beschrieben (LEISTNER, 1995, 2000, 2002, 2003; STIEBING, 1999; ALBERT, 2003; RÖDEL und SCHEUER, 2006), d. h. Keime würden zwangsläufig durch Erhöhung der Temperatur gewissermaßen zum Wachstum gezwungen, trotz ungünstiger Verhältnisse des Milieus, und würden deshalb durch Verbrauch der Energiereserven zum Absterben gebracht. Das ist eine mögliche Erklärung für dieses eigentlich unerwartete Verhalten der Mikroorganismen. In den beiden Messkurven (blau und schwarz) liegen zwei Minima vor. Hervorzuheben ist der enge und scharf abgegrenzte Temperaturbereich in dem sich dieser Wechsel im Verhalten der Keime vollzieht. Temperaturänderungen, Änderungen des Wasseraktivitätswertes und die Höhe der Ausgangskeimzahl haben offensichtlich einen bedeutenden Einfluss auf das Wachstumsverhalten von Mikroorganismen.

Mikrobiologische Untersuchungen

Die Darstellung der Keimzahlverläufe beschränkt sich auf die Temperaturen von 17 °C, 22 °C und 27 °C, um die Ergebnisse übersichtlicher darstellen zu können. In Abbildung 4 sind die Kurvenverläufe bei niedriger Inokulumshöhe ($1,1$ bis $3,5 \times 10^3$ KBE/ml), Wasseraktivitätswerten von 0,990; 0,985 und 0,980 und Nitritgehalten von 0 mg/l; 200 mg/l und 400 mg/l dargestellt. Bei hohem Wasseraktivitätswert (a_w 0,990) nehmen die Keimzahlen einen erwarteten Verlauf. Die Keimzahlen bei hohen Temperaturen und geringsten Nitritgehalten steigen am schnellsten an, die Keimzahlen bei den geringeren Temperaturen und den höchsten Nitritgehalten am langsamsten. Wird der Wasseraktivitätswert abgesenkt, zeigen sich graduell gravierende Unterschiede. Diese Anomalie verläuft analog zu den Redoxpotentialverläufen, wie oben beschrieben (metabolic exhaustion). Hohe Temperaturen führen nun plötzlich zum Absterben der Keime. Bei dem niedrigsten Wasseraktivitätswert von 0,980 sinkt die Keimzahl bei einer Temperatur von 27 °C bereits nach einem Tag unter die Nachweisgrenze. Bei

17 °C steigt jedoch die Keimzahl deutlich an. Diese Beobachtung bestätigt wiederum die Erfahrung, dass man fermentierte Fleischerzeugnisse mit abgesenkten Wasseraktivitätswerten keinesfalls kühlen sollte, da vor allem durch eine Lagerung bei Raumtemperatur eine weitere Absenkung der Keimzahl stattfinden kann. Die Nitritgehalte können sich verschiedenartig auswirken. Bei bestimmten Temperaturen und Wasseraktivitätswerten kann Nitrit sogar einen Wachstumsschub hervorrufen.

In Abbildung 5 sind die Wachstumskurven bei einem hohen Inokulum ($1,3$ bis $3,1 \times 10^6$ KBE/ml) dargestellt. Auch in diesem Falle können die beschriebenen „Temperaturanomalien“ bei herabgesetzten Wasseraktivitätswerten beobachtet werden. Wegen der hohen Ausgangskeimzahl kommt es jedoch in keinem Falle zu einem völligen Absterben der Keime, aber bei 27 °C und einem Wasseraktivitätswert von 0,980 zu einer deutlichen Keimreduktion nach dem ersten Versuchstag. In allen Fällen erstarken jedoch die Keimzahlen wieder und es werden entsprechend hohe Endkeimzahlen erreicht. Bei hohen Ausgangskeimzahlen kann somit in keinem Falle mit einer mikrobiologischen Stabilisierung eines Produktes gerechnet werden. Bei hohen Ausgangskeimzahlen ist demnach mit völlig andersartigen Keimzahlverläufen zu rechnen. Es ist deshalb keineswegs möglich, bei Versuchen, die mit hoher Ausgangskeimzahl durchgeführt werden, auf Versuchsabläufe mit geringer Ausgangskeimzahl zurückzurechnen, da die mikrobiologischen Prozesse nicht vergleichbar sind und völlig andersartig reagieren. Auch in diesem Beispiel hat Natriumnitrit keine ausgeprägte Wirkung und kann in Einzelfällen gewissermaßen stimulierend wirken.

Ausblick

Die dargelegten Untersuchungen zeigen, dass das Zusammenspiel der Hürden äußerst komplexe Abhängigkeiten aufweisen kann. Keinesfalls ist das Bild einer einfachen additiven Wirksamkeit zwischen Hürden ausreichend und richtig. Mikroorganismen zeigen in der Regel äußerst vielfältige Verhaltensmuster. Die vorliegende Untersuchung soll ein Einstieg zu

einem sinnvollen quantitativen Hürdenmodell liefern. Nicht nur der Einfluss der Temperatur auf das Keimwachstum wird durch die sonstigen Milieubedingungen erst definiert, auch die Wirksamkeit eines Zusatzstoffes (Konservierungsstoffes) kann milieuhängig sein. Die Untersuchungen dazu sollen fortgesetzt werden mit dem Ziel, bei ausreichender Datenlage eine voraussagende Mikrobiologie zu ermöglichen.

Literatur

- Albert, T. (2003): Untersuchungen zur Vermehrungsfähigkeit und Absterbekinetik von *Listeria monocytogenes* in streichfähiger Rohwurst. Vet. Diss. München.
- Leistner, L. (1995): Stable and safe fermented sausages world-wide. In: Campbell-Platt, G. and Cook, P.E. (eds.) Fermented meats, pp160-175. Blackie Academic & Professional, London, UK.
- Leistner, L. (2000): Basic aspects of food preservation by hurdle technology. Int. J. Food Microbiol. 55: 181-186.
- Leistner, L. (2002): Hurdle technologies: Combination treatments for food stability, safety and quality, 194 pages. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
- Leistner, L. (2003): Das Hürdenkonzept in der Fleischwirtschaft. Hygienicum news Nr. 4: 4-8.
- Rödel, W. (1975): Einstufung von Fleischerzeugnissen in leicht verderbliche, verderbliche und lagerfähige Produkte aufgrund des pH-Wertes und a_w Wertes. Vet. Diss. FU Berlin.
- Rödel, W. und R. Scheuer (1998): Das Redoxpotential bei Fleisch und Fleischerzeugnissen. 1. Bedeutung, Messung und Berechnung des Redoxpotentialwertes. Fleischwirtsch. 78: 975-981.
- Rödel, W. und R. Scheuer (2003a): Zur Beziehung von Redoxpotenzial und Keimwachstum (Teil 1). Fleischwirtsch. 83: 98-101.
- Rödel, W. und R. Scheuer (2003b): Zur Beziehung von Redoxpotenzial und Keimwachstum (Teil 2). Fleischwirtsch. 83: 127-131.
- Rödel, W. und R. Scheuer (2004): Hürdentechnologie: Quantitative Erfassung von „Sicherheits-Hürden“ der Lebensmittel mit der Redoxpotentialmessung. Jahresbericht 2003 der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach, 59-61.
- Rödel, W., R. Scheuer und H. Wagner (1989): Neues Verfahren zur Bestimmung der Wasseraktivität bei Fleischerzeugnissen. Fleischwirtsch. 69: 1396-1399.
- Rödel, W., R. Scheuer und T. Albert (2006): Verhalten von pathogenen *E. coli* in kurzgereiften, streichfähigen, rohen Fleischerzeugnissen – 2. Bedeutung von Reifeprogrammen und Zusatzstoffen. Fleischwirtsch. 86: 110-115.
- Stiebing, A. (1999): Weniger Keime bei hoher Temperatur. Fleischwirtsch. 79: 68-70.

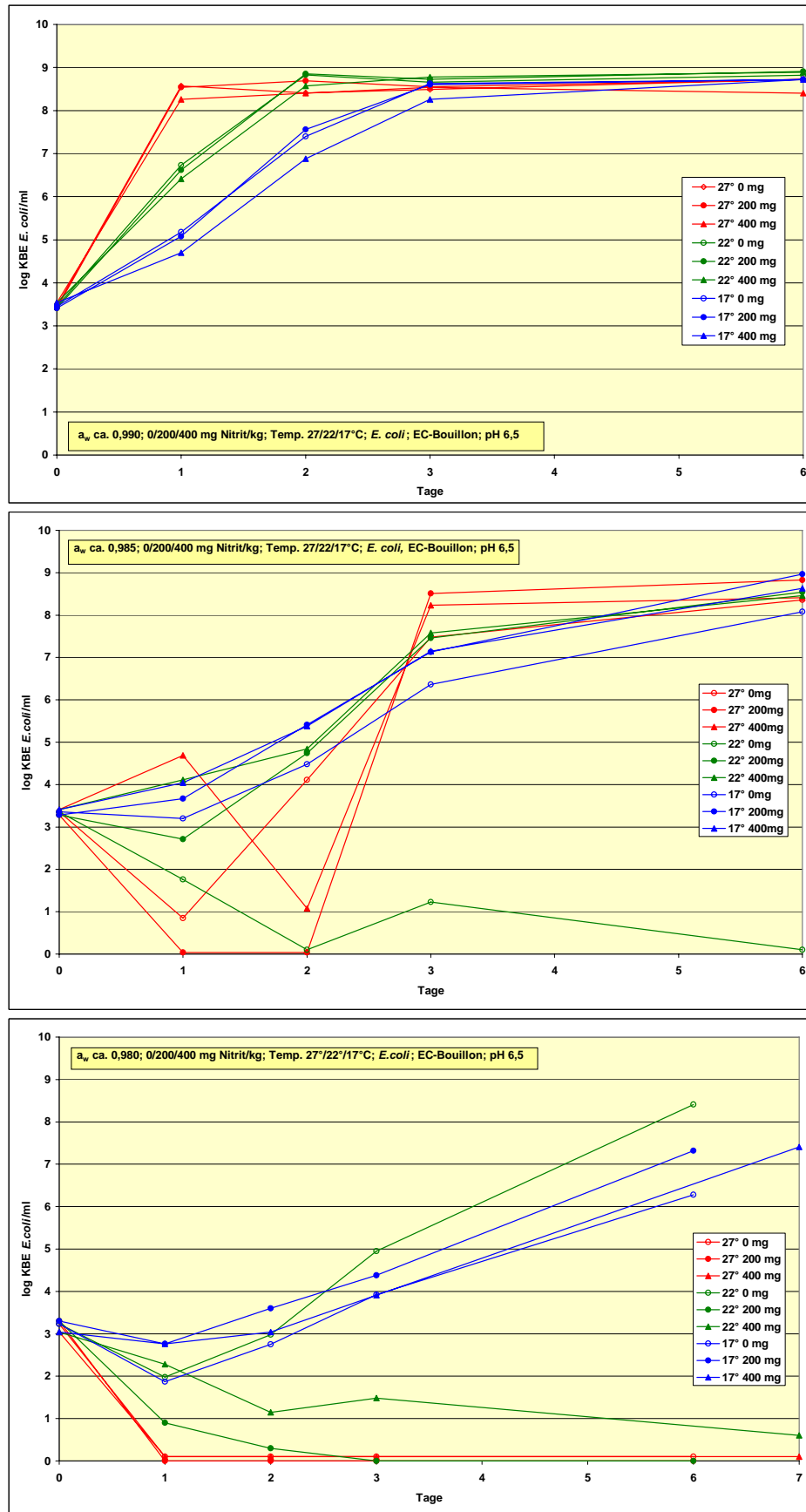


Abb. 4: Keimzahlverlauf von *E. coli* bei niedrigem Inokulum ($1,1$ bis $3,5 \times 10^3$ KBE/ml); Temperaturen von 17°C , 22°C und 27°C , Wasseraktivitätswerten von $0,990$ (obere Abb.), $0,985$ (mittlere Abb.) und $0,980$ (untere Abb.) sowie Nitritgehalten von 0 mg/l, 200 mg/l und 400 mg/l

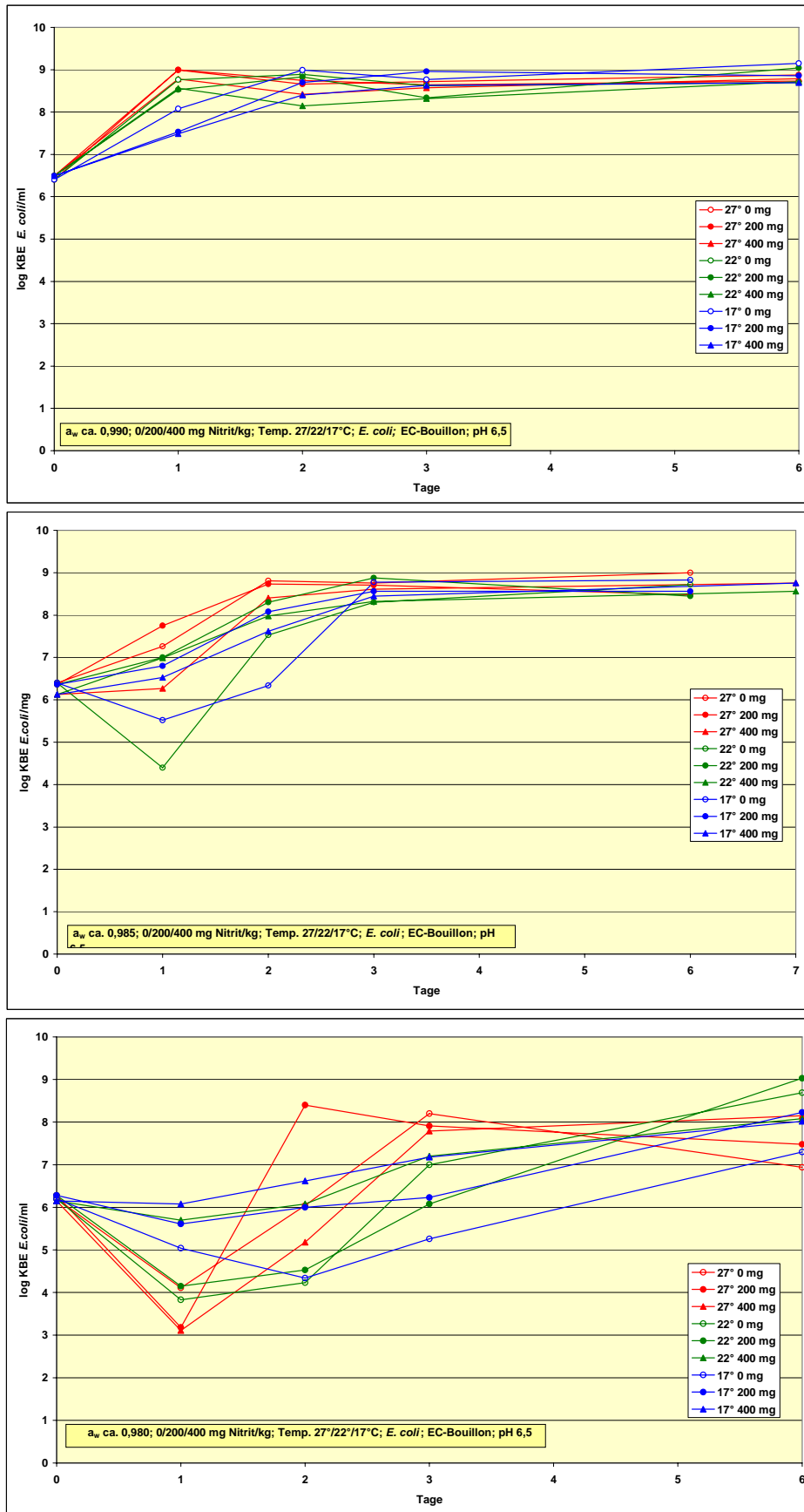


Abb. 5: Keimzahlverlauf von *E. coli* bei hohem Inokulum ($1,3$ bis $3,1 \times 10^6$ KBE/ml); Temperaturen von 17°C , 22°C und 27°C , Wasseraktivitätswerten von $0,990$ (obere Abb.), $0,985$ (mittlere Abb.) und $0,980$ (untere Abb.) sowie Nitritgehalten von 0 mg/l, 200 mg/l und 400 mg/l