

Sporeninaktivierung in Brühwurst durch kombinierte Hochdruck- und Wärmebehandlung

Spore inactivation in cooked sausage with combined high pressure and heat treatment

W.-D. MÜLLER und I. DEDERER

Zusammenfassung

Das Ziel der durchgeführten Untersuchungen war es, durch kombinierte Anwendung von Hochdruck- und Wärmebehandlung die vollständige Inaktivierung von aeroben und anaeroben mesophilen und thermophilen Bakteriensporen in Brühwurstkonserven zu erreichen. Dadurch sollten tropenlagerfähige Brühwurstkonserven mit hoher sensorischer Verzehrsqualität hergestellt werden. Durch verschiedene gleichzeitige kombinierte Hochdruck- und Wärmebehandlungsverfahren war es möglich, alle Sporenbildner mit der notwendigen Sicherheit zu inaktivieren. Die Verzehrsqualität der so hergestellten Brühwurstkonserven war unbefriedigend. Bei der zeitversetzten Anwendung der Hochdruck- und Wärmebehandlung wurde einerseits eine wärmeinduzierte Auskeimung der Sporen provoziert, mit nachfolgender Hochdruckbehandlung (HDB). Andererseits wurde die Sporenauskeimung durch HDB provoziert, mit nachfolgender Pasteurisation. Bei der wärmeinduzierten Auskeimung wiesen die ausgekeimten Bakterien eine derartige Druckresistenz auf, dass sie auch bei Drücken von 800 MPa nicht ausreichend inaktiviert werden konnten. Durch die druckinduzierte Auskeimung bei einem moderaten Druck von 300 MPa und nachfolgender Pasteurisation war es möglich alle Sporenbildner zu inaktivieren. Die so hergestellten tropenlagerfähigen Brühwurstkonserven waren von sehr guter sensorischer Qualität.

Summary

The objective of the carried out investigations was to reach the entire inactivation of aerobic and anaerobic mesophilic and thermophilic bacterial spores in canned cooked sausages by combined application of high-pressure and heat treatment. Tropical-storable canned cooked sausages with high sensory consumption quality should be thereby produced. It was possible to inactivate all sporeformers by different and simultaneous combined high pressure and heat treatments with the necessary security. The consumption quality of the so made canned cooked sausages was unsatisfactory. On the one hand, with the time-moved application of the high-pressure and heat treatment a heat-induced germination of the spores was induced, with a following high-pressure treatment (HPT). On the other hand, the spore germination was induced by HPT, with a following pasteurization. With the heat-induced germination the germinated bacteria showed a such pressure resistance, so that they could not be inactivated also with pressure by 800 MPa. By the pressure-induced germination with a moderate pressure of 300 MPa and the following pasteurization it was possible to inactivate all sporeformers. The so made tropical-storable canned cooked sausage were of very good sensory quality.

Schlüsselwörter

Hochdruckbehandlung und Wärmebehandlung – Brühwurstkonserven – Sporeninaktivierung – Sensorik

Key Words

high pressure treatment and heat treatment – canned cooked sausages – inactivation of bacteriaspores – sensory evaluations

Einleitung

Die Hochdruckbehandlung (HDB) ist ein Verfahren, mit dem Fleischerzeugnisse, wie auch andere Lebensmittel, auf relativ schonende Weise haltbar gemacht werden können. Das Erreichen eines sicheren mikrobiologischen Status der Produkte, deutlich verkürzte Herstellungszeit und Erhaltung der Frischeigenschaften von Produkten sind Aspekte, die die Hochdrucktechnologie besonders bei Fleischerzeugnissen interessant erscheinen lassen. Die hydrostatischen Drücke, die im Lebensmittelbereich angewandt werden, bewegen sich im Bereich zwischen 100 und 1000 MPa (1000-10000 bar). Die Druckgefäßgrößen kommerzieller Anlagen liegen heute zwischen 100 und 500 Litern. Die Behandlung erfolgt meist diskontinuierlich. Wegen der augenblicklich noch hohen Gerätekosten beschränkt sich die Anwendung auf qualitativ hochwertige Produkte. Hoher hydrostatischer Druck bietet als eine Methode zur Herstellung konservierungsstofffreier, mikrobiologisch sicherer und stabiler Erzeugnisse eine attraktive Alternative zur Hitze-Pasteurisierung (WOUTERS *et al.*, 1998). Hefen, Schimmelpilze und vegetative Zellen von Bakterien können durch Drücke im Bereich von 200 bis 700 MPa inaktiviert werden. Gleichzeitig bleibt die sensorische Qualität bestimmter Lebensmittel bei diesen Drücken erhalten (CHEFTEL, 1992; KNORR, 1995).

Ein Haupthindernis für die Anwendung von hohem hydrostatischem Druck als alleinige Technologie für die Konservierung von Lebensmitteln stellt die ineffiziente Inaktivierung von Bakteriosporen dar. Ungekeimte Bakteriosporen sind extrem druckresistent. Neuere Literaturhinweise deuten jedoch darauf hin, dass bei entsprechenden Druck- und Temperaturkombinationen auch eine vollständige Inaktivierung der Sporen möglich ist.

Zielsetzung

Das Ziel der durchgeführten Untersuchungen war die Erarbeitung grundlegend neuer Erkenntnisse über eine alternative

Haltbarmachung von Brühwurstkonserven durch Hochdruckbehandlung in Verbindung mit einer milden Erhitzung (Pasteurisation) gegenüber der derzeit praktizierten Hoherhitzung auf die Haltbarkeitsstufe von Tropenkonserven. Die so hergestellten Produkte sollen „Frischecharakter“ aufweisen, d.h. die Nachteile der Tropenkonserven bezüglich Hoherhitzungsgeschmack, bitterem, flachem Aroma, Konsistenzmängel (weich), unerwünschten Farbabweichungen sowie Vitaminverlusten können so vermieden werden.

Aus diesem Grund wurden zwei prinzipiell mögliche Behandlungsmethoden geprüft: eine gleichzeitige und eine zeitversetzte Anwendung der Wärme- und Hochdruckbehandlung. Bei der direkten Anwendung der Wärme- und Hochdruckbehandlung erfolgte die Druckbehandlung direkt im Anschluss an die Pasteurisation in dem auf die Kerntemperatur des zu behandelnden Produktes vortemperierten Hochdruckbehälter. Bei der zeitversetzten Anwendung der Wärme- und Hochdruckbehandlung wird die Tatsache genutzt, dass die Sporen sowohl nach einer Pasteurisation – hitzeinduziert – als auch nach einer Hochdruckbehandlung – druckinduziert – auskeimen.

Versuchsdurchführung

Für die Inaktivierungsexperimente wurde Brühwurstbrät aus 64 % Rindfleisch, 18 % Sonnenblumenöl oder Rapsöl und 18 % Eis hergestellt. Als Zutaten wurden 16 g/kg Nitritpökelsalz, 3,0 g/kg Phosphat, 7 g/kg Gewürzmischung und 0,3 g/kg Ascorbat verarbeitet. Um eine ausreichende Sicherheit zu gewährleisten, erfolgte die Beimpfung des Brühwurstbrätes mit einem Pool aus aeroben und anaeroben, mesophilen und thermophilen Sporen (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Clostridium sporogenes* PA 3679, *Bacillus stearothermophilus* DSM B171 und *Clostridium thermosaccharolyticum* ATCC 27384) mit jeweils 10^5 Sporen/g. Das beimpfte Brät wurde in 50 g Alu-Leichtbehältnisse abgefüllt, verschlossen und anschließend erhitzt oder hochdruckbehandelt.

Tab. 1: Variable der Versuche

Parameter	gleichzeitige Anwendung der Wärme- und Druckbehandlung	zeitversetzte Anwendung der Wärme- und Druckbehandlung
Kerntemperatur (KT), °C	60; 65; 70; 75; 80	80; 85; 90; 95
Temperatur im HD-Behälter, °C	60; 65; 70; 75; 80	37
Druck, MPa	500; 600; 700; 800; 900	300; 700
Intervall-Hochdruckbehandlung: Druck-Haltezeit-Druck (Haltezeit-Druck), min	4-2-4; 4-2-4-2-4	4-2-4
Zeit zwischen Druck-Wärmebehandlung/ Wärme-Druckbehandlung, min		20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 120

Die HDB wurde in einem Hochdruck-Lebensmittel-Processor der Fa. EPSI mit einem Reaktionsvolumen von 2,3 l durchgeführt, der zwischen -20 °C und $+80\text{ °C}$ temperierbar ist. Als Hochdruckbehandlungsmethode wurde eine Intervall-Hochdruckbehandlung, Druck-Haltezeit-Druck, mit einer Druckphase von 4 Minuten und einer drucklosen Pause von 2 Minuten, eingesetzt. Die zu untersuchenden Variablen waren Kerntemperatur, Temperatur im Hochdruckbehälter, Druckhöhe und Druckhaltezeit sowie Zeit zwischen Druck- und Wärmebehandlung und Erhitzungsdauer (Tab. 1). Die Alu-Leichtbehältnisse wurden nach der Hochdruckbehandlung bei 30 °C und bei 55 °C bis zu 10 Tagen bebrütet, soweit sie nicht vorher bombierten. Die Bestimmung der Sporenbelastungskonzentration erfolgte nach konventionellen mikrobiologischen Methoden (BAUMGART, 2001) im paraffin-überschichteten Röhrchen in SPS-Agar.

Ergebnisse

Gleichzeitige Anwendung von Wärme und HD-Behandlung

Bei der gleichzeitigen Anwendung der Wärme und Hochdruckbehandlung erfolgte die HDB direkt im Anschluss an die Pasteurisation in der auf Kerntemperatur des zu behandelnden Produktes vortemperierten Hochdruckanlage.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass die Sporen von *Clostridium thermosaccharolyticum* ATCC 27384 und *Bacillus stearothermophilus* DSM B171 nach

der Pasteurisation und anschließender Hochdruckbehandlung mit 500 MPa und *Bacillus subtilis*-Sporen ab 600 MPa bei der Temperatur von 75 °C nicht mehr nachweisbar waren. *Clostridium sporogenes* erwies sich in den bisherigen Untersuchungen als der mit Abstand druckresistenteste Sporenbildner.

Für die vollständige Inaktivierung der Clostridien-Sporen in den untersuchten Brühwurstbräten waren ein hoher Druck von 900 MPa bei einer niedrigeren Temperatur von 65 °C oder eine höhere Temperatur von 80 °C bei einem niedrigeren Druck von 600 MPa notwendig (Abb. 1 und 2). Der Vergleich der HDB mit 3 Intervallen gegenüber zwei Intervallen erbrachte gesicherte Effekte, ist jedoch nicht so vorteilhaft, dass die zusätzliche Beanspruchung der Anlage damit gerechtfertigt werden könnte.

Bei der sensorischen Bewertung wurde beobachtet, dass sich mit steigendem Druck und steigender Temperatur (Doppelbelastung) die abgesetzte Flüssigkeit von flüssig bis viskos und die Farbe von rötlich bis hell änderten. In der Konsistenz wurden die Proben von bröckelig bei den mit 600 MPa bis streichfähig bei den mit 800 und 900 MPa behandelten Produkten bewertet. Im Geschmack wurden keine Abweichungen festgestellt. Die mit 600 MPa druckbehandelten Proben besaßen noch eine „kurze“ brühwurstartige Konsistenz. Mit dem Druck von 800 MPa bekamen die Produkte eine cremige Konsistenz nach der Art „Fleischcreme“.

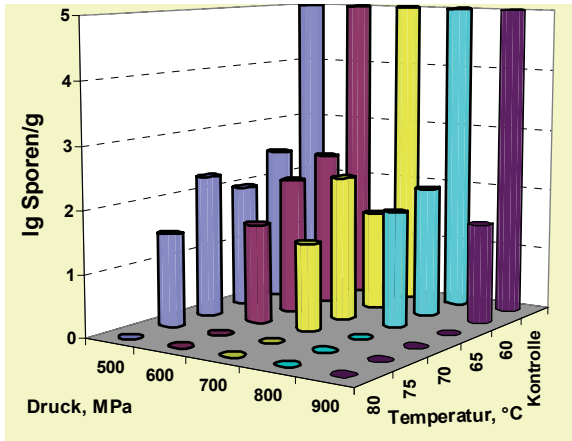


Abb. 1: Einfluss verschiedener Druckhöhen und Temperaturen auf die Inaktivierung der Sporen von *Clostridium sporogenes* (2 x 4 Minuten)

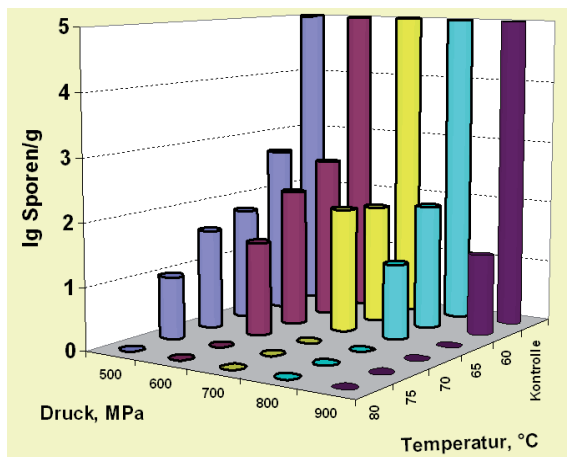


Abb. 2: Einfluss verschiedener Druckhöhen und Temperaturen auf die Inaktivierung der Sporen von *Clostridium sporogenes* (3 x 4 Minuten)

Zeitversetzte Anwendung der Wärme- und HD-Behandlung

Da eine hochtemperierbare Hochdruckanlage zurzeit für die industrielle Anwendung nicht zur Verfügung steht und die gleichzeitige Wärme- und Hochdruckbehandlung zu unerwünschten Produktveränderungen führt, wurde nach einer anderen Möglichkeit zur Sporeninaktivierung gesucht. Dazu wurde eine zeitversetzte hitzeinduzierte oder druckinduzierte Sporenauskeimung mit anschließender Bebrütung und Hochdruckbehandlung oder Pasteurisation untersucht.

Hitzeinduzierte Sporenauskeimung mit anschließender HD-Inaktivierung

Für die Inaktivierungsexperimente wurde das Brühwurstbrät mit Sporen von *Clostridium sporogenes* PA 3679 beimpft, da sich dieser mesophile anaerobe Sporenbildner in bisherigen Versuchen als druckresistentestes Bakterium erwiesen hatte. Bei der Untersuchung der hitzeinduzierten Inaktivierung wurde festgestellt, dass diese unwirksam war, weil die frisch ausgekeimten Sporen eine sehr starke Resistenz gegenüber den nachfolgend angewandten hohen Drücken aufwiesen.

Druckinduzierte Sporenauskeimung mit anschließender Pasteurisation

Für die druckinduzierte Auskeimung wurde das mit 10^5 Sporen/g *Clostridium sporogenes* beimpfte Brühwurstbrät sofort nach dem Abfüllen in Aluminium-Leichtbehälter bei Drücken von 200 bis 800 MPa, in

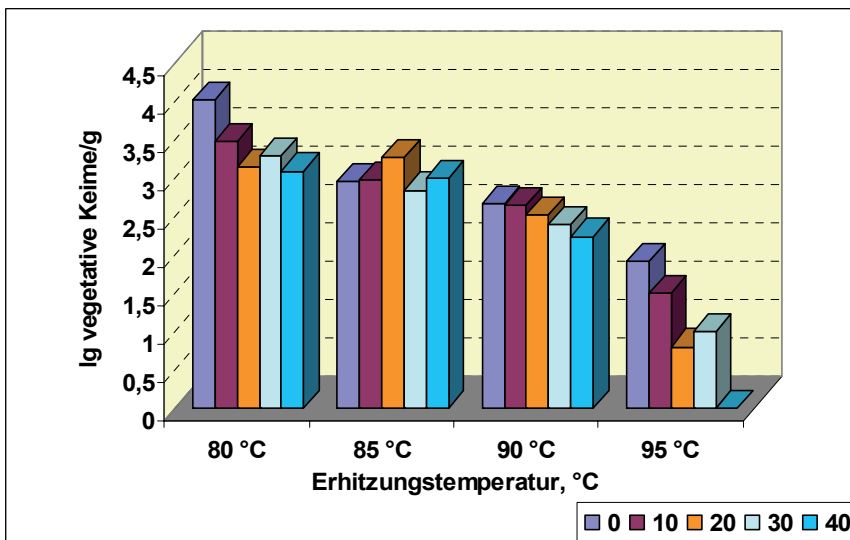


Abb. 3: Druckinduzierte Auskeimung mit nachfolgender Hitzeinaktivierung von *Clostridium sporogenes* bei der HDB von 300 MPa (Ausgangskonzentration 10^5 Sporen/g)

zwei Zyklen von 2-mal 4 Minuten im auf 37 °C vortemperierten HD-Behälter, hochdruckbehandelt. Danach wurden die Dosen 2 Stunden bei 37 °C bebrütet. Bis auf den Druck von 200 MPa wurde nach 2-stündiger Bebrütung eine vollständige Auskeimung der Sporen erreicht.

Die frisch ausgekeimten Bakterien zeigten nach der anschließenden Erhitzung auf die Kerntemperaturen von 80 °C bis 95 °C eine hohe Resistenz (Abb. 3). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Erhitzungstemperaturen auf die Abtötung der vegetativen Keime festgestellt. Mit steigender Erhitzungstemperatur und der Verlängerung der Erhitzungszeit kam es zu einer zunehmenden Inaktivierung der ausgekeimten Bakterien. Bei einer

Temperatur von 95 °C und einer Erhitzungsdauer von 40 min war es möglich, alle Bakterien zu inaktivieren. Eine derartig lange Haltezeit bei 95 °C führte zu einer nicht akzeptablen Schädigung der Produktqualität.

In weiteren Versuchen wurden Proben nach der HDB von 300 MPa und unterschiedlichen Bebrütungszeiten von 20 bis 100 Minuten mit einem 10-minütigen Abstand bei 37 °C für 20 Minuten bei der Kerntemperatur von 95 °C erhitzt. Dabei sollte bei der Sporenauskeimung die Zeit festgestellt werden, in der die Sporen noch nicht vollständig ausgekeimt sind, aber ihre sporenspezifische Hitzeresistenz bereits verloren haben. Zu Beginn der Auskeimung der Sporen zur Entwicklung einer

Abb. 4: Druckinduzierte Auskeimung der Sporen von *Clostridium sporogenes* nach der HDB bei 300 MPa und anschließender Bebrütung bei 37 °C (Ausgangskonzentration 105 Sporen/g) (n = 3)

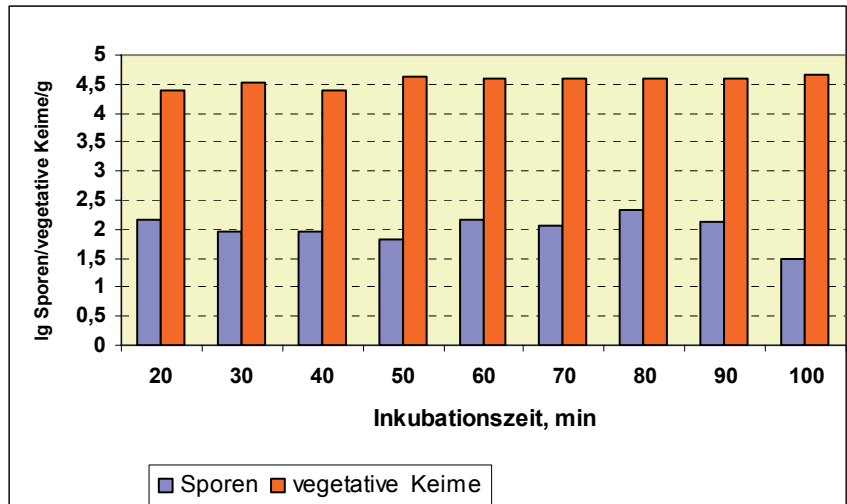
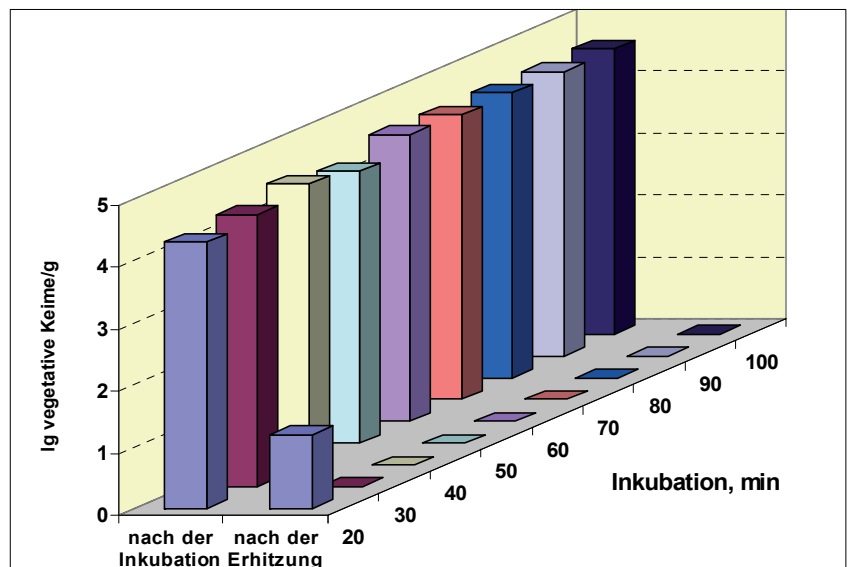


Abb. 5: Druckinduzierte Auskeimung mit nachfolgender Hitzeinaktivierung von *Clostridium sporogenes* bei 95 °C und der Erhitzungsdauer von 20 Minuten (n = 3)



vegetativen Bakterienzelle wird die für die Hitzeresistenz verantwortliche Dipicolinsäure in der Zellwand der Spore abgebaut.

Daher hat sich gezeigt, dass es nicht notwendig ist so lange zu inkubieren bis alle Sporen vollständig ausgekeimt sind. Wie Abbildung 4 zeigt, sind während der Inkubationszeiten zwischen 20 und 100 Minuten ca. 10^2 der Clostridien als Sporen, mit zunehmender Tendenz zwischen 10^4 und nahe 10^5 als vegetative Keime nachweisbar.

Nach 20-minütiger Erhitzung bei 95 °C überlebten 10 vegetative *Clostridium sporogenes* in Proben, die nach HD-Behandlung mit 300 MPa 20 Minuten bei 37 °C bebrütet wurden (Abb. 5). Ab 30-minütiger Bebrütungszeit konnte in den erhitzten Proben kein Wachstum mehr festgestellt werden.

Durch eine zweistufige zeitversetzte Hochdruckbehandlung gelang es mit einem moderaten Druck von 300 MPa die Sporen von *Clostridium sporogenes* druckinduziert zum Auskeimen anzuregen. Bei einer geeigneten Bebrütungszeit ab 30 min bei 37 °C verlieren die Sporen so viel von ihrer Hitzeresistenz, dass sie bei einer Kerntemperatur von 95 °C nach 20 min vollständig inaktiviert werden konnten.

Da das eigentliche Ziel die Herstellung von tropenlagerfähigen Konserven war, wurden weitere Versuche mit den thermophilen Sporenbildnern *Bacillus stearothermophilus* DSM B171 und *Clostridium thermosaccharolyticum* ATCC 27 384 sowie *Bacillus subtilis* ATCC 6633, mit jeweils 10^5 Sporen/g durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die vorgenannten Bedingungen für die vollständige Inaktivierung der thermophilen Sporenbildner nicht ausreichend waren. In 20 % der Alu-Leichtbehältnisse waren noch *Clostridium thermosaccharolyticum* ATCC 27 384 und in 50 % der Alu-Leichtbehältnisse *Bacillus stearothermophilus* DSM B171 mit 10^1 - 10^2 Sporen/g nachweisbar. Aus diesem Grund wurde vor der Bebrütung bei 37 °C ein zusätzlicher Bebrütungsschritt bei 60 °C für 40 min vorgeschaltet. Die thermophilen Sporenbildner konnten durch diese Ver-

änderung des Bebrütungsverfahrens zuverlässig und reproduzierbar (n=6) inaktiviert werden. Die so hergestellten Brühwurstkonserven hatten nach den sensorischen Bewertungen Frischwarencharakter. Nach 12-monatiger Bebrütung der mit den 4 vorgenannten Sporenbildnern beimpften Brühwurstkonserven bei 37 °C und 55 °C gab es keine Bombagen. Bei den mikrobiologischen Untersuchungen konnten keine Bakterien oder Sporen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind ausschließlich repräsentativ für die untersuchte Rezeptur und die verwendeten Sporenbildner. Bei anderen Rezepturen (z. B. pH-Wert, a_w -Wert, Kochsalzgehalt, Pökelfstoffe) bzw. anderen Sporenbildnern sind abweichende Ergebnisse nicht auszuschließen.

Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der Sporeninaktivierung haben gezeigt, dass hohe hydrostatische Drücke in Verbindung mit geeigneten Temperaturen in Abhängigkeit von den gewählten Temperatur/Zeit-Bedingungen zur teilweisen oder vollständigen Inaktivierung von Mikroorganismen und Sporen eingesetzt werden können. Als alternative oder ergänzende Maßnahme zur schonenden Haltbarmachung mikrobiologisch kritischer Fleischerzeugnisse könnte die HDB deshalb von großem technologischem Interesse sein.

Literatur

- WOUTERS, P. C., E. GLASKER & J.P.P.M. SMELT (1998): Effect of high pressure on inactivation kinetics and events related to proton efflux in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 509-514
- CHEFTEL, J.-C. (1992): Effect of hydrostatic pressure on food constituents: an overview. *Colloq. INSERM* 224, 195-209
- KNORR, D. (1995): Hydrostatic pressure treatment of food, 159-175. In: G. W. Gould (ed.), *New methods of food preservation*. Blackie Academic and Professional, Glasgow, Scotland
- BAUMGART, J. (2001): Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. *Lose Blattsammlung*. Behr's Verlag Hamburg.