

Die Bedeutung der Redoxpotential-Messung für den Bereich der Lebensmittelsicherheit und Lebensmittelqualität

Untersuchungen zum Verständnis und zur Interpretation des Begriffes „Metabolic Exhaustion“

R. SCHEUER

Zusammenfassung

Für den Bereich der Lebensmittelsicherheit und Lebensmittelqualität existieren verschiedene Konzepte und Leitfäden, die dem Produzenten – gewissermaßen – eine Hilfestellung für die Herstellung sicherer und qualitativ guter Produkte geben sollen. Zurzeit ist es jedoch noch nicht möglich, anhand dieser Modellvorstellungen, für den Einzelfall, zuverlässig die zu erwartenden Produkteigenschaften vorhersagen zu können. Die theoretischen Ansätze, wie z. B. die „Hürden-Technologie“, enthalten daneben verschiedene Hypothesen und Annahmen, die bisher noch nicht ausreichend abgeklärt worden sind, oder weiterer Interpretation bedürfen. So sind auch die theoretischen Modellvorstellungen, die das Auftreten des Phänomens „Metabolic Exhaustion“ erklären sollen, noch nicht durch Messungen eindeutig wissenschaftlich bestätigt worden. Die nachfolgend beschriebenen Versuchsanordnungen, auf Basis von Redoxpotential-Messungen, hatten das Ziel, eine Interpretation und nachvollziehbare Begründung für das Auftreten dieses Phänomens zu liefern. Die Ergebnisse dieser Messungen sollen im Folgenden nochmals in Form eines Review dargestellt werden.

Schlüsselwörter Redoxpotential-Messung – Hürden-Technologie – Metabolic Exhaustion

Einleitung

Bedeutung der Redoxpotential-Messung im Lebensmittelbereich

Die Redoxpotential-Messung findet auf dem Gebiet der Lebensmittelsicherheit erstaunlich wenig Beachtung, obwohl im Grunde nahezu alle biochemischen Abläufe und Vorgänge auf Reduktions-/Oxidations-Reaktionen beruhen. Da Behandlung und Lagerung von Lebensmitteln die

Redoxpotential-Werte im Produkt ebenfalls beeinflussen können, wären sie somit möglicherweise auch ein Schlüssel für die Beurteilung der Produkteigenschaften oder von verfahrensbedingten Veränderungen der Produktqualität. Wir hatten darüber häufig berichtet. Eine Untersuchungsreihe,

die wir im Hinblick auf weiterführende Erkenntnisse zum Thema „Metabolic Exhaustion“ durchgeführt haben, soll hier nochmals dargestellt werden (RÖDEL und SCHEUER, 2007).

Was versteht man unter „Metabolic Exhaustion“ im Konzept der Hürden-Technologie?

Der Begriff „Metabolic Exhaustion“ im Konzept der „Hürden-Technologie“ geht – in seiner Auslegung – auf Leistner zurück (LEISTNER und GOULD, 2002). Bei zahlreichen Untersuchungen zeigte sich, dass es bei bestimmten Lebensmitteln, den sogenannten „ambient-stable foods“, zu einem Absterben von pathogenen Sporen und vegetativen Keimen kommen kann, wenn diese Produkte unter moderaten Temperatur-Bedingungen (z. B. bei Raumtemperatur) gelagert werden; hingegen bei Lagerung unter Kühlung die Sporen und Keime lebensfähig bleiben. Dieses Verhalten wird im Konzept der „Hürdenttechnologie“ als eine „Auto-Sterilisation“ bezeichnet.

Die theoretische Auslegung von „Metabolic Exhaustion“ geht nun von der Mutmaßung aus, dass die Sporen unter den moderaten Temperatur-Bedingungen gewisse „osmoregulatorische Prozesse“ starten würden, was, in der Folge, zu einem sinnlosen Verbrauch an metabolischen Reserven und Energien in den Zellen führen würde, gefolgt, letztlich, von einem Absterben der Sporen. Bei vegetativen Keimen käme es – gemäß dieser Annahme – bei den moderaten Temperaturen gleichfalls zu einem unnötigen Verbrauch von Energien und Stoffwechsel-Reserven, gefolgt vom Zelltod.

Diese Auslegung ist im Grunde äußerst spekulativ, da die notwendigen biochemischen Untersuchungen dazu noch völlig fehlen. Die Kenntnis der zellbiologischen Vorgänge, die zum „Metabolic Exhaustion“ führen, und deren quantitative Beschreibung, könnte jedoch für die Erstellung tragfähiger Lebensmittelsicherheits-Konzepte von grundsätzlicher Bedeutung sein.

Die Messung des Redoxpotentials

Das Redoxpotential ist eine Messgröße der Redoxreaktionen. Diese Messgröße gibt das Reduktions/Oxidations-Potential eines Stoffes oder Mediums wieder, das gegen eine Standard-Referenz-Halbzelle unter Standardbedingungen gemessen wird. In biologischen Systemen ist das Standardpotential definiert bei einem pH-Wert von 7,0 gegen eine Standard-Wasserstoffelektrode. Für die praktische Durchführung der Messung ist die Standard-Wasserstoffelektrode aber weniger geeignet, da der Aufbau des Systems kompliziert und diese Elektrode sehr stör anfällig ist. Aus diesem Grunde wird in der Praxis auf andere Halbelemente als Bezugselektrode zurückgegriffen, beispielsweise auf die Kalomel-Elektrode. Bei der Kalomel-Elektrode sind zusätzlich die Potential-Schwankungen aufgrund von Temperatur-Einflüssen geringer als bei der Wasserstoffelektrode, wodurch auch weniger Messfehler auftreten können.

Material und Methoden

Messanordnung zur Bestimmung der Redoxpotential-Werte, des pH-Wertes und a_w -Wertes sowie die Umrechnung der Messwerte

Das System zur kontinuierlichen Messung der Redoxpotentiale bestand aus Einstab-Messketten der Fa. Schott, Typ Sa Pt 6140, einem Datenlogger der Fa. Ahlborn, ALMEMO 2590-9 V5[®], einer Datenerfassungsanlage mit Software der Fa. akrobit[®] software, AMR WinControl und einem Thermoblock. Die Messröhrchen mit der Nährbouillon wurden in die passgenauen Bohrungen des Thermoblocks gegeben, die auf einen Temperatur-Gradient von 17 °C bis 27 °C voreingestellt waren. Die Schrittweite zwischen den Temperaturen in den Messröhrchen betrug 1 °C (Kühlung: Peltier-Elemente).

Der Verlauf der pH-Werte wurde kontinuierlich während des gesamten Messzeitraumes mit pH-Einstichelektroden der Fa. Ahlborn, Typ PHEE-112-S gemessen und

die a_w -Werte, jeweils am Anfang und Ende der Untersuchungsreihen, mit dem a_w -Kryometer AWK-20® der Fa. NAGY (RÖDEL *et al.*, 1989) bestimmt.

Die Potentialwerte wurden zu Beginn der Messung – nach kurzer Einstellphase – elektronisch, über die Steuerungs-Anlage, auf den Wert „Null“ kalibriert, um störende Einflüsse zu beseitigen (Temperaturwerte, Grundwerte der Nährbouillon). Durch diese Kalibrierung konnte der Vergleich innerhalb der verschiedenen Messreihen erleichtert oder auch grundsätzlich erst ermöglicht werden. Alle Messungen, die in unseren Untersuchungen beschrieben wurden, waren als Doppelmessungen angelegt.

Ein Algorithmus ordnete dem Zeitraum vom Startpunkt bis zum exponentiellen Abfall der Messkurve einen spezifischen Wert zu, der sich aus der dazwischen-

liegenden linearen Streckenlänge ergab, und den wir als „relative Wirksamkeit der Hürde“ bezeichnet haben.

Zur Veranschaulichung dieser Berechnungsmethode sind in Abbildung 1, als Beispiel, die Verläufe der Redoxpotential-Werte, in Nährmedien, die mit *Escherichia coli* inokuliert wurden, über einen Temperatur-Gradienten von 15 °C bis 30 °C dargestellt. Wie aus der Graphik hervorgeht, ist der Zeitraum vom Startpunkt (Kalibriert auf E = 0 mV) bis zum exponentiellen Verlauf der Messkurve, den wir als „elektronische Lag-Phase“ bezeichnet haben, bei den höheren Temperaturen kürzer als bei den tieferen Temperaturen. Aus der Bestimmung der jeweiligen Zeitdauer der „elektronischen Lag-Phase“ wurde die „relative Wirksamkeit der Hürde“ berechnet. Folglich ergibt sich bei einer Temperatur der Bouillon von 15 °C eine höhere „relative Wachstumshürde“ als bei 30 °C.

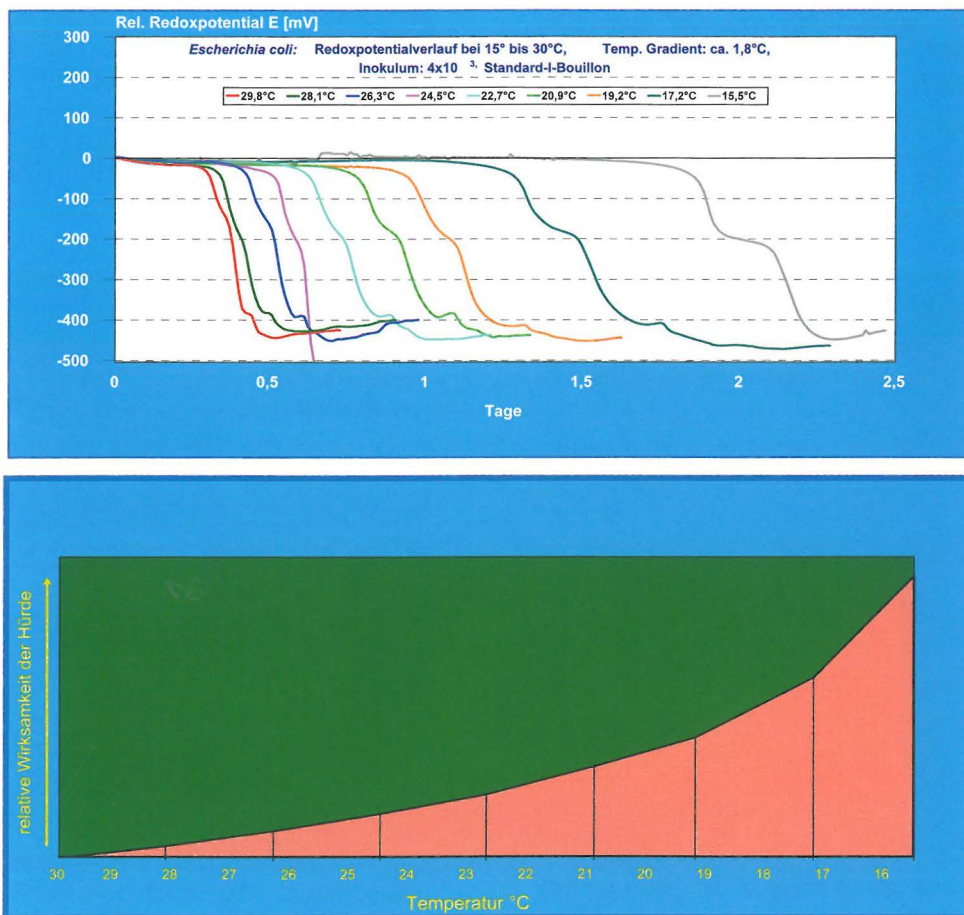


Abb. 1: Beispiel für die Kalibrierung der Messwerte und Umrechnung mit einem Algorithmus auf den Zahlenwert „relative Wirksamkeit der Hürden“

Herstellung der Messmedien

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde ein Flüssig-Nährmedium (Merck, EC-Bouillon) mit gepuffertem pH-Wert von ca. 6,5 (Phosphatpuffer) verwendet. Nach Trennung in zwei Chargen wurden die Nährmedien mit Kochsalz auf Wasseraktivitätswerte von 0,990 oder 0,986 eingestellt und, nach erneuter Chargentrennung, jeweils mit einem Pool von *E. coli*-Isolaten auf Keimzahldichten von $1,1$ bis $3,5 \times 10^3$ KBE/ml (niedriges Inokulum) und $1,3$ bis $3,1 \times 10^6$ KBE/ml (hohes Inokulum) beimpft (Stämme E 162, E 163, E 164 der Stammsammlung, Kulmbach; geprüfte Übernacht-Kulturen).

werte, die im Bereich $< 0,1$ °C lagen, festgestellt werden.

Der Ausgangs-pH-Wert lag nach Zugabe des Phosphat-Puffers bei etwa $\text{pH} = 6,5$. Während der Messung fiel der pH-Wert während der „exponentiellen Phase“ kurzzeitig um maximal 0,6 pH-Wert-Einheiten ab und stabilisierte sich danach wieder.

Die Wasseraktivitätswerte ($a_w = 0,990$; $0,986$) änderten sich nicht messbar, d. h. der Anfangs-Wert und der Wert am Ende des Mess-Zeitraumes waren nahezu identisch.

Ergebnisse

Messung der Temperatur, des pH-Wertes und des a_w -Wertes

Die exakte Einstellung und Konstanz der Messtemperaturen wurde vor und während des Messverlaufes mit Pt 100 Messfühlern überprüft. Es konnten nur geringfügige Abweichungen der Temperatur-

Messung und Umrechnung der Redoxpotential-Werte

Aus den Kurvenverläufen wurden mit der Auswerte-Software die „relativen Wirksamkeiten der Hürden“ berechnet. Die Messergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 2 dargestellt. In der Abbildung sind die Relativwerte der Hürden gegen die Temperatur-Werte aufgetragen.

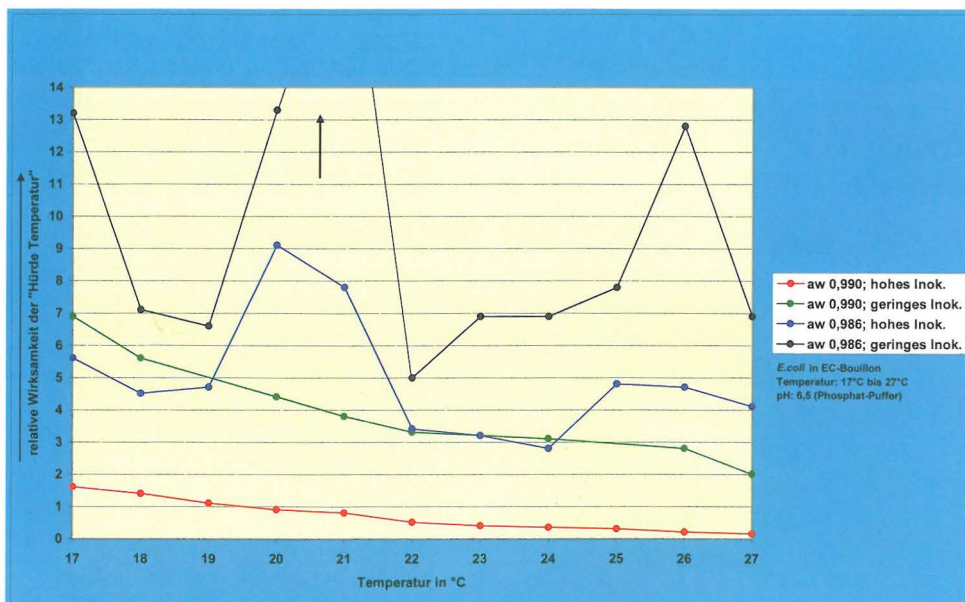


Abb. 2: Relative Wirksamkeit der Hürde Temperatur“ in Abhängigkeit zur Wasseraktivität und zur Ausgangs-Keimzahl, Fleischwirtschaft, 87, 111-115

Bei den hohen Wasseraktivitätswerten ($a_w = 0,990$) verhielten sich die Messwert-Verläufe völlig „normal“. Mit ansteigender Temperatur verringerte sich die „elektronische Lag-Phase“ und damit auch die berechnete „relative Wirksamkeit der Hürde Temperatur“. Diese Charakteristik zeigt sich bei den Proben mit hohem und niedrigem Ausgangs-Inokulum. Lediglich die Wachstumsrate war bei einer geringeren Ausgangskeimzahl, wie aus dem Kurvenverlauf in der Abbildung ersichtlich (Grün), vermindert, gegenüber den Proben mit einer höheren Ausgangskeimzahl (Rot). Beide Kurven fallen demnach zu höheren Temperaturen hin ab, da bei den höheren Temperaturen die berechnete „relative Hürde“ kleiner ist. Die grün markierte Kurve ist in der Graphik nach oben verschoben und zeigt auch einen etwas steileren Verlauf.

Die Kurven der Proben mit dem tieferen a_w -Wert (Blau und Schwarz) liegen über den Kurven mit dem höheren a_w -Wert (Grün und Rot), was auf ein verzögertes Wachstum durch die höhere „Hürde Wasseraktivität“ hinweist. Die beiden Verläufe niedriges Inokulum / hoher Wasser-Aktivitätswert (Grün) und hohes Inokulum / tiefer Aktivitätswert (Blau) liegen ziemlich dicht beieinander und überschneiden sich teilweise. Die schwarze Kurve (niedriges Inokulum / hoher Aktivitätswert) liegt hingegen deutlich darüber. Das beschriebene Verhalten der Messkurven ist nicht ungewöhnlich und könnte prinzipiell auch so qualitativ vorhergesagt werden.

Die blaue und die schwarze Kurve haben jedoch ungewöhnliche Maxima, die in übereinstimmenden Temperaturbereichen liegen. Die Hürde „Wasseraktivitäts-Wert-Absenkung“, gekoppelt mit der Hürde „Absenkung der Temperatur“, zeigt demnach kein additives Verhalten, wie es nach einer einfachen Interpretation des Hürdenkonzeptes zu erwarten wäre, sondern es sind Extrema vorhanden, die vornehmlich in dem Temperatur-Bereich von ca. 19 °C bis 22 °C zu erkennen sind, und zwar besonders deutlich bei Proben mit einem niedrigen Ausgangs-Inokulum. Im Bereich 24 °C bis 27 °C ist ein zweites Maximum in den

Messkurven vorhanden, jedoch ist dieses Maximum weniger stark ausgeprägt.

Diskussion

Die dargelegten Untersuchungen zeigen, dass zwischen dem Zusammenspiel von Stabilitätsfaktoren für Lebensmittel (Hürden) äußerst komplexe Abhängigkeiten bestehen können. Keinesfalls ist das Bild einer einfachen additiven Wirksamkeit zwischen den verschiedenen Faktoren ausreichend und richtig.

Es traten bei der Kombination bestimmter Hürden ungewöhnliche Maxima in den Messkurven auf, wobei das Maximum im Falle einer niedrigen Ausgangs-Keimzahl, tiefem a_w -Wert und in einem mittleren Temperaturbereich (19 °C bis 22 °C) besonders stark ausgeprägt ist. Dieses Ergebnis könnte eine Erklärung für die erwähnten Beobachtungen aus der Praxis liefern, dass bei bestimmten Lebensmitteln, den sogenannten „*ambient-stable foods*“, es zu einem völligen Verschwinden von (pathogenen) Keimen und Sporen kommen kann, die vorher – in geringen Keimzahlen – auf dem Produkt nachgewiesen werden konnten. Der Begriff „Auto-Sterilisation“ ist in diesem Zusammenhang aber ersichtlich irreführend.

Auch bei den hohen Ausgangs-Keimzahlen kam es im Bereich von 19 °C bis 22 °C zu einer Verlängerung der „elektronischen Lag-Phasen“. Der Ausschlag des Maximums ist hier aber deutlich weniger stark ausgeprägt. Solche Beobachtungen einer nur geringfügigen Hemmung der Keimvermehrung sind wahrscheinlich nur auf dem Wege über Potentialmessungen möglich, da diese Messungen die metabolischen Verhältnisse quantitativ relativ genau aufzeigen können, und auch kontinuierlich – über den gesamten Versuchszeitraum – verlaufen.

Neben quantitativen Aussagen zur Höhe des jeweiligen Ausschlages der Maxima in den Messkurven und der Temperatur-Bereiche, in denen diese Extrema auftreten, ermöglicht die Redoxpotential-

Messung darüber hinaus einen Einstieg in die Interpretation des Begriffs „Metabolic Exhaustion“.

Schlussfolgerungen und Hypothesen

Erstens: Das im Versuch verwendete Nährmedium hat eine speziell ausgelegte Zusammensetzung, die generell ein optimales Wachstum von *Escherichia coli* – Keimen begünstigt.

Zweitens: Ein schlagartiger Anstieg der Inhibitorischen-Wirkung trat in bestimmten Temperatur-Intervallen auf, und zwar, wenn den Nährmedien Kochsalz zur Absenkung des a_w -Wertes zugesetzt worden war.

Drittens: In diesem Temperaturbereich entfalten üblicherweise die regulatorischen Bestandteile der Zelle ihre höchsten katalytischen Aktivitäten, d. h. die regulatorischen Zellbestandteile (z. B. Enzyme) liegen in einer besonders aktiven Molekül-Konformation vor.

Viertens: Ionen der Salze im wässrigen Medium stören bekanntermaßen die schwachen Ionenbindungen der regulatorischen Zellbestandteile und damit deren Molekülstruktur. Sie verlieren dadurch ihre Aktivität (Substratspezifität).

Auf Basis der Untersuchung, also dem Auftreten von Maxima in den Messkurven, könnte also geschlussfolgert werden, dass die regulatorischen Zellbestandteile (Enzyme) in ihrer besonders reaktiven und aktiven Molekül-Konformation, die sich bei den beobachteten spezifischen Temperaturen ausbilden, äußerst empfindlich auf die Gegenwart von Kochsalz in der wässrigen Nährlösung reagieren, und so weitere Stoffwechselforgänge eingeschränkt, oder völlig ausgeschaltet werden könnten. Isoliert und in geringer Zellkonzentration vorliegender Keime und Sporen reagieren auf solche Stresssituationen bekanntermaßen wesentlich empfindlicher als größere Kolonien (Adaption/Selektion).

Aus diesem Verhalten ließen sich letztlich auch die Beobachtungen erklären, dass

Sporen oder vegetative Keime (z. B. Pathogene), die in relativ geringen Keimzahlen auf „ambient-stable foods“ vorliegen, unter „eigentlich“ optimalen Temperatur-Bedingungen, spontan völlig verschwinden können oder nicht mehr nachweisbar sind.

Literatur

Leistner, L., Gould, G. W. (2002): Hurdle Technologies-Combination Treatments for Food Stability, Safety and Quality. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 155-156

Rödel, W., Scheuer, R., Wagner, H. (1989): Neues Verfahren zur Bestimmung der Wasseraktivität bei Fleischerzeugnissen. Fleischwirtschaft, 69, 1396-1399

Rödel, W., Scheuer, R. (2007): Neue Erkenntnisse zur Hürdentechnologie – Erfassung von kombinierten Hürden. Fleischwirtschaft, 87, 111-115