Hitzeinaktivierung von Enzymen, Salmonellen und anderen Bakterien in Hühnereier-Eiweiss = Thermal inactivation of enzymes, salmonella and other bacteria in chicken egg white

Autor(en): **Jäckle, Margrit / Schmidt-Lorenz, W.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **80 (1989)**

Heft 2

PDF erstellt am: **29.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-983601

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **88**, 162–193 (1989)
Eingegangen 15. März 1989. Angenommen 10. April 1989

Hitzeinaktivierung von Enzymen, Salmonellen und anderen Bakterien in Hühnereier-Eiweiss

Thermal Inactivation of Enzymes, Salmonella and other Bacteria in Chicken Egg White

Margrit Jäckle und *W. Schmidt-Lorenz*
Institut für Lebensmittelwissenschaft, Eidg. Technische Hochschule, Zürich

Einleitung

Nach Artikel 174 Absatz 3 der eidg. Lebensmittelverordnung (1) mit Stand vom 1. Januar 1983 sollte bei Vollei und Eigelb durch die Überprüfung der α-Amylase- und Phosphatase-Aktivitäten kontrollierbar sein, ob eine ausreichende Pasteurisation erfolgt ist.* In vorausgegangenen Untersuchungen (2, 3) wurde nachgewiesen, dass die Forderung einer Inaktivierung der Phosphatase nicht erfüllbar ist. Dagegen erwies sich die Bestimmung der α-Amylase-Aktivität mit dem Phadebas^{R}-Amylase-Test sowohl bei Vollei als auch bei Eigelb zum Nachweis einer erfolgten Hitzepasteurisation als gut geeignet.

Bei Hühnereiweiss werden in der Praxis bisher noch keine entsprechenden enzymatischen Nachweise einer Erhitzung durchgeführt. Bisherige Untersuchungen über die unterschiedlichen Enzymaktivitäten in Hühnereiweiss (4–7) hatten ergeben, dass in Eiweiss insgesamt nur wenige Enzyme und diese nur mit relativ niedrigen katalytischen Aktivitäten vorhanden sind. Die Enzyme ß-Galactosidase, ß-Glucuronidase, Lipase, Cytochrom-Oxidase, Oxidase, Peroxidase und Phosphatase waren mit den angewandten Bestimmungsverfahren nicht nachweisbar. Für die Aktivitäten der α-Mannosidase, N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase, α-Amylase und Katalase wurden nur geringe Werte bestimmt, die sich zudem von Ei zu Ei um mehr als das Dreifache unterschieden. Nur für das Enzym Lysozym, das aufgrund seiner bakteriolytischen Wirkung neben den bakteriostatisch wirkenden Proteinen Avidin, Ovotransferrin und Riboflavin sowie dem hohen pH-Wert von mehr als 9,0 mitverantwortlich ist für die erschwerte Vermehrung von Bakterien in Eiweiss, wurden höhere Aktivitätswerte bestimmt.

* Anlässlich der Revision vom 4. November 1987 wurde Absatz 3 von Artikel 174 wie folgt geändert: «Eier und Eiprodukte dürfen als pasteurisiert bezeichnet werden, wenn durch eine Hitzebehandlung alle vegetativen pathogenen Keime so reduziert sind, dass die Toleranz- und Grenzwerte der Verordnung des EDI vom 1. Juli 1987 über die hygienisch-mikrobiologischen Anforderungen an Lebensmittel, Gebrauchs- und Verbrauchsgegenstände nicht überschritten werden.»

Die Angaben über das Ausmass der Enzyminaktivierung sind oft widersprechend. Nach *Henderson* und *Robinson* (6) erfolgt bei der Hitzebehandlung von Eiweiss bei 57,8 °C während 2,5 Minuten keine Verminderung der α-Mannosidase- und Lysozym-Aktivitäten, dagegen eine Inaktivierung der N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase und Katalase um rund 90 bzw. 50%. *Donovan* und *Hansen* (10) bestimmten nach Erhitzung von Eiweiss mit einem pH-Wert von 7,0 bei Temperaturen zwischen 58 und 62 °C eine Reduktion der N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase-Aktivität um mehr als 60%. Für Eiweiss mit pH-Werten von 9,0 und mehr, wie sie bei industriell hergestellten Eiweissmassen üblich sind, sind bisher keine entsprechenden Angaben bekannt. Die Inaktivierungskinetik der α-Amylase wurde wegen der nur geringen Aktivität in unbehandeltem Eiweiss nicht untersucht. *Imai* (8) und *Monsey* und *Jones* (9) beurteilten dagegen den Nachweis der α-Amylase zur Kontrolle der ausreichenden Pasteurisation von Eiweiss als brauchbar.

Im Vergleich zu den Eiprodukten Vollei und Eigelb, die ohne Qualitätseinbussen auf mehr als 60 °C erhitzt werden können, ist Eiweiss wesentlich hitzeempfindlicher. Bei den in der Praxis angewandten Pasteurisationstemperaturen zwischen 55 und 60 °C (11) kann die Schlagfähigkeit stark beeinträchtigt werden. Nach Absenken des pH-Wertes auf 7,0 durch Zusatz von Milchsäure und $Al_2(SO_4)_3$ wird die Hitzedenaturierung der Eiweissproteine zwar geringer, aber gleichzeitig die Hitzeresistenz der Mikroorganismen wie insbesondere von Salmonellen erhöht (12). Die Beeinträchtigung der funktionellen Eigenschaften von Eiweiss mit pH-Werten von mehr als 9,0 lässt sich durch Zugabe von Schlaghilfen vor der Hitzebehandlung vermindern oder sogar ganz verhüten. Für pasteurisiertes Eiweiss hat sich Triethylcitrat als geeignet erwiesen (11, 13). Die Zugabe dieses Stabilisators ist nach der eidg. Zusatzstoffverordnung (14) für Eiweiss bis zu Konzentrationen von 250 ppm erlaubt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war wie bei den vorausgegangenen Untersuchungen von Vollei (2) und Eigelb (3) zunächst die Bestimmung der Hitzeinaktivierung der α-Amylase und zusätzlich noch der drei Enzyme N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase, Lysozym und Katalase in Hühnereier-Eiweiss. Ausserdem wurde die spezifische Hitzeresistenz von sieben potentiell pathogenen Bakterien in Eiweiss ohne und mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat sowie die Inaktivierung der in industriell hergestellten Eiweissmassen vorhandenen aeroben mesophilen Keime und Enterobacteriaceen bestimmt. Aufgrund der Korrelationen der Hitzeinaktivierungswerte der vier Enzyme und der Testkeime war dann eine Beurteilung über die Eignung des Enzymtests zur Kontrolle einer ausreichenden Pasteurisation von Eiweiss möglich.

Material und Methoden

Eiprodukte

– Schaleneier der Provenienz BRD; Klasse: A; Gewicht: 52–64 Gramm; Alter: 2–3 Monate

- Abreiben der Eischalen mit 3%iger Formaldehydlösung vor dem Aufschlagen
- Herstellung der Eiweissmasse durch manuelles Aufschlagen von je 5 bis 7 Schaleneiern und sorgfältige manuelle Trennung von Eiweiss und Eigelb
- Homogenisation der Eiweissmasse mit Stomacher (Lab-Blender 400) während zwei Minuten
- Herstellung von Eiweissmassen mit 250 ppm (0,25 g kg^{-1}) Triethylcitrat durch Zugabe von 25 mg Triethylcitrat (Merck 800251) pro 100 g Eiweiss
- Nach der Hitzebehandlung Mischen der Eiweissmasse 1:1 (w/v) mit Verdünnungslösung (0,9% NaCl, 0,1% Tryptone) zur besseren Pipettierbarkeit
- Industriell aufgeschlagene, unpasteurisierte und pasteurisierte Eiweissprodukte gekühlt in 2-kg-Kartons (+ 4 °C) angeliefert bis 24 Stunden nach Herstellung im Erzeugerbetrieb

Testkeime

- *Escherichia coli* ATCC 25992
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442
- *Salmonella typhimurium* ATCC 13311
- *Salmonella senftenberg 775 W* NCTC 9959
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Staphylococcus aureus* No. 148 (Labor für Lebensmittel-Mikrobiologie
- *Staphylococcus aureus* No. 150 ETH Zürich; isoliert aus Teigwaren)

Bestimmung der Enzym-Aktivitäten in Eiweiss

nach den von *Jäckle* und *Geiges* (24) sowie *Jäckle* et al. (15) beschriebenen Methoden.

Beimpfung, Pasteurisation, Koloniezahlbestimmungen und Auswertung

Die Beimpfung des Eiweiss mit den Testbakterien, die Hitzebehandlung der Eiweissmassen in Pasteurisationsbeuteln bei Temperaturen zwischen 54 und 60 °C, die Koloniezahlbestimmungen sowie die Auswertung der ermittelten Daten erfolgten wie von *Jäckle* et al. (2) bei den vorausgegangenen Untersuchungen von Vollei beschrieben. Die Bestimmung der Enterobacteriaceen-Koloniezahlen erfolgte im Plattengussverfahren mit VRBD-Agar (BBL 95300) mit Deckschicht nach 24 Stunden Bebrütung bei 37 °C.

Identifikation der Isolate aus pasteurisiertem Eiweiss

Von 50 Isolaten von nach dem Zufallsprinzip ausgewählten Kolonien, die nach Hitzebehandlung industriell hergestellter Eiweissmassen auf BHI-Agar

(Brain heart infusion agar, Difco 0037) gewachsen waren, wurden Reinkulturen angelegt.

Die Identifikation der Isolate erfolgte nach Bestimmung von Zellform und Beweglichkeit sowie den Reaktionen in den Aminopeptidase-, Katalase-, Cytochrom-Oxidase-Tests und der Glucoseverwertung im Oxidations-Fermentations-(O/F)Test.

Resultate

Hitzeinaktivierung von Enzymen in industriell hergestellten Eiweissmassen

Die Hitzeinaktivierung von N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase wurde bei 57 °C, von Lysozym bei 57, 60 und 63 °C, von α-Amylase und Katalase bei 54, 55,5, 57, 58,5 und 60 °C in Abhängigkeit von der Erhitzungszeit jeweils im Doppel bei drei industriell hergestellten Eiweissmassen unterschiedlicher Aktivität bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse der drei Versuchsreihen mit jeweils unterschiedlichen Enzymaktivitäten der Eiweissmassen wurde für jede Bestimmung die Restaktivität als Prozent der Ausgangsaktivität (= 100%) berechnet und diese dann in den Abbildungen 1 bis 4 in logarithmischem Massstab (log %-Aktivität) gegen die Zeit aufgetragen. Aus den Steigungen der durch lineare Regression bestimmten Geraden wurden dann die D-Werte ermittelt.

N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase

In Abbildung 1 sind für die drei industriell hergestellten Eiweissmassen mit Ausgangsaktivitäten von 10,5; 21 und 39 U l^{-1} die Mittelwerte wie auch die Extremwerte der prozentualen Restaktivitäten aus den drei Einzelbestimmungen nach Erhitzung bei 57 °C angegeben. Die Inaktivierungen erfolgten praktisch exponentiell. Bereits nach 30 Sekunden war keine Restaktivität mehr nachweisbar.

Demgegenüber verlief die Inaktivierung des Enzyms in einer Eiweissmischung aus fünf Schaleneiern mit einer wesentlich höheren Ausgangsaktivität von 396 U l^{-1} anfangs deutlich rascher. Nach ca. 20 Sekunden Erhitzung, als noch eine Restaktivität von 18 U l^{-1} vorhanden war, erfolgte sie dann langsamer und mit gleicher Geschwindigkeit wie in den industriell hergestellten Eiweissprodukten. Nach einer Minute Hitzebehandlung bei 57 °C war auch in dieser Probe keine Restaktivität mehr erfassbar.

Lysozym

Die Inaktivierung von Lysozym verlief bei den drei geprüften Temperaturen exponentiell (Abb. 2). Die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden r (n 8) lagen mit einem Mittelwert von −0,972 zwischen −0,937 und −0,992.

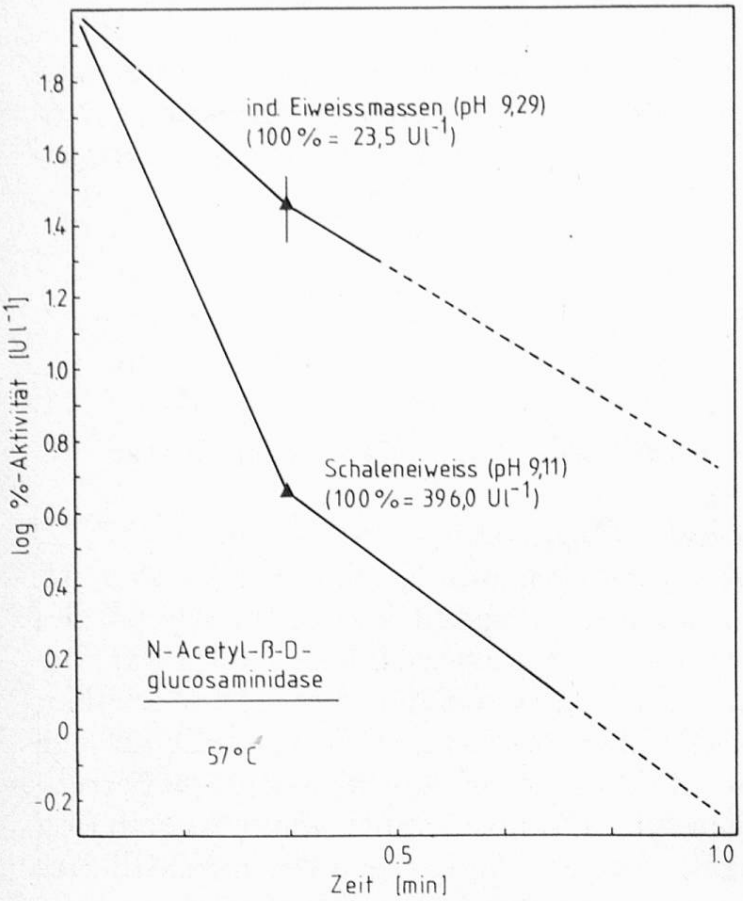

Abb. 1. Inaktivierung der N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase in industriell hergestellten Eiweissmassen (ind. EW, Mittel- und Extremwerte aus drei Versuchsreihen) und einer Eiweissprobe aus fünf Schaleneiern, mit unterschiedlichen Ausgangsaktivitäten bei einer Pasteurisationstemperatur von 57 °C in Abhängigkeit von der Pasteurisationszeit (– – – unterhalb der Nachweisgrenze von E = 0,02 bzw. 4,8 U l^{-1}))

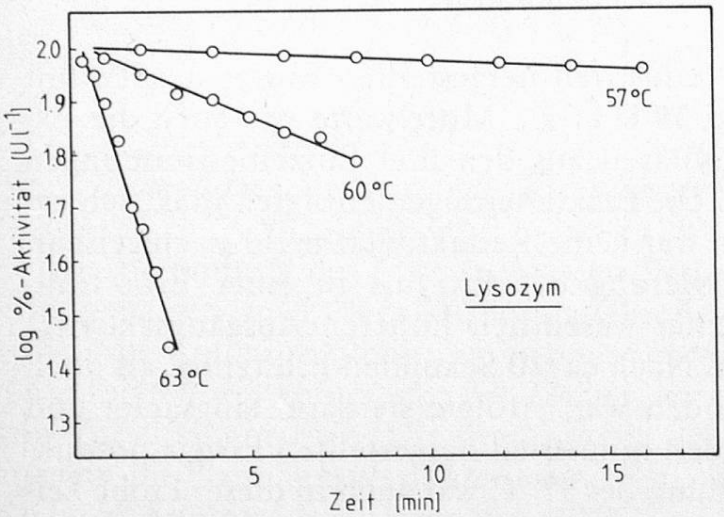

Abb. 2. Inaktivierung von Lysozym in Eiweiss bei den drei Pasteurisationstemperaturen von 57, 60 und 63 °C in Abhängigkeit von der Pasteurisationszeit

Wenn das Eiweiss in den Pasteurisationsbeuteln bei 57 und 60 °C länger als 6 Minuten bzw. 40 Sekunden erhitzt wurde, setzte infolge Koagulation eine zunehmend stärker werdende Trübung ein, bei 63 °C bereits innerhalb der Aufheizzeit von 20 Sekunden. Bei diesen Temperatur-Zeit-Bedingungen wurde das Enzym aber nur zu annähernd 40% inaktiviert.

Katalase

Für die Katalase ergaben sich bei den Temperaturen von 54 bis 58,5 °C gekrümmte Inaktivierungskurven. Nur bei 60 °C verlief die Abnahme der Restaktivitäten exponentiell (Abb. 3). Die Korrelationskoeffizienten *r (n* 8) für den gesamten Bereich der Inaktivierungskurven lagen mit einem Mittelwert von –0,980 zwischen –0,977 und –0,998.

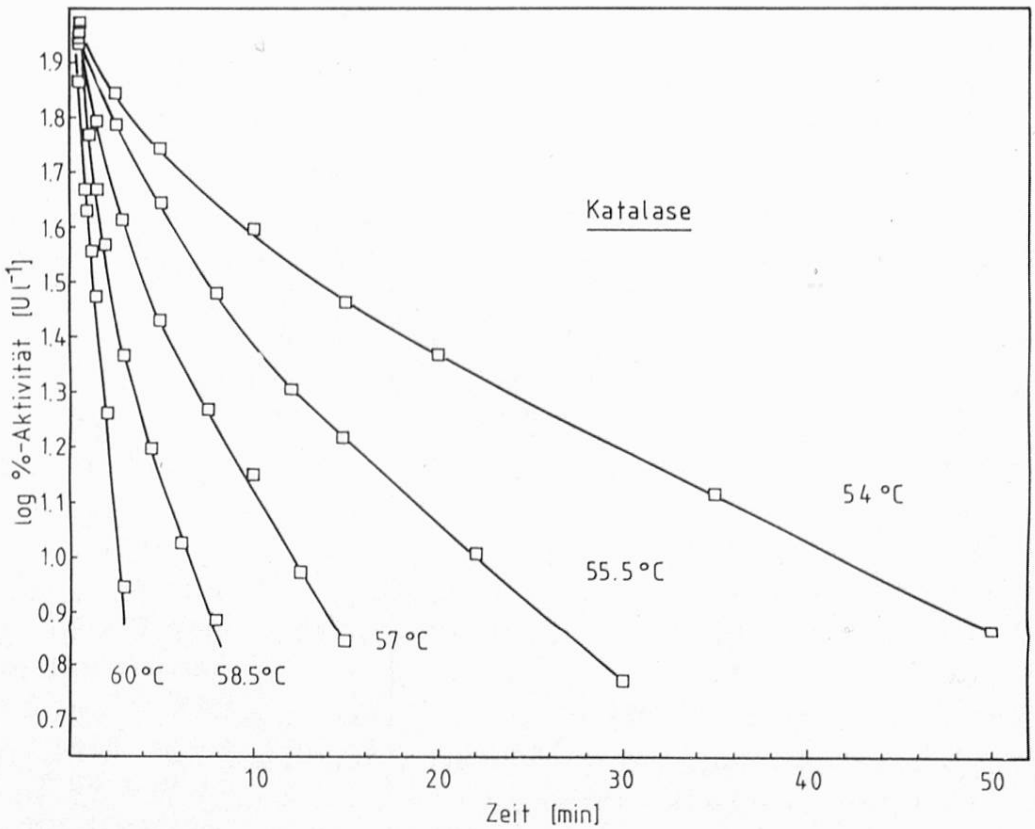

Abb. 3. Inaktivierung der Katalase in Eiweiss bei fünf Pasteurisationstemperaturen zwischen 54 und 60 °C in Abhängigkeit von der Pasteurisationszeit

Wenn das Eiweiss in den Pasteurisationsbeuteln bei 60 °C länger als 0,6 Minuten und bei 54 °C länger als 47 Minuten erhitzt wurde, erfolgte ebenfalls eine zunehmend stärker werdende Trübung der Eiweissmasse. Bei diesen Temperatur-Zeit-Bedingungen wurde die Katalase um etwa 38 bis 88% inaktiviert.

α-Amylase

Die Inaktivierungskurven der α-Amylase verliefen mit Ausnahme der 60 °C-Kurve nicht exponentiell, sondern nach einem zunächst steilen linearen Abfall mehr oder weniger deutlich sigmoid (Abb. 4).

Bei 54 und 55,5 °C war der sigmoide Verlauf so ausgeprägt, dass eine Inaktivierung unter die für die Ermittlung der α-Amylase-Aktivität in Eiweiss mit dem Phadebas-Test festgesetzte Nachweisgrenze von 3,08 U l^{-1} (15) nicht erreicht wur-

de. Bei 57, 58,5 und 60 °C waren nach 3 und 1,5 Minuten bzw. weniger als einer Minute keine Restaktivitäten mehr nachweisbar.

Nach Berechnung der Regressionsgeraden für die Temperaturen von 54 bis 60 °C wurden für die gesamte Erhitzungszeit Korrelationskoeffizienten *r (n* 8 bis 16) von –0,895 bis –0,991 bestimmt bei einem Mittelwert von –0,941.

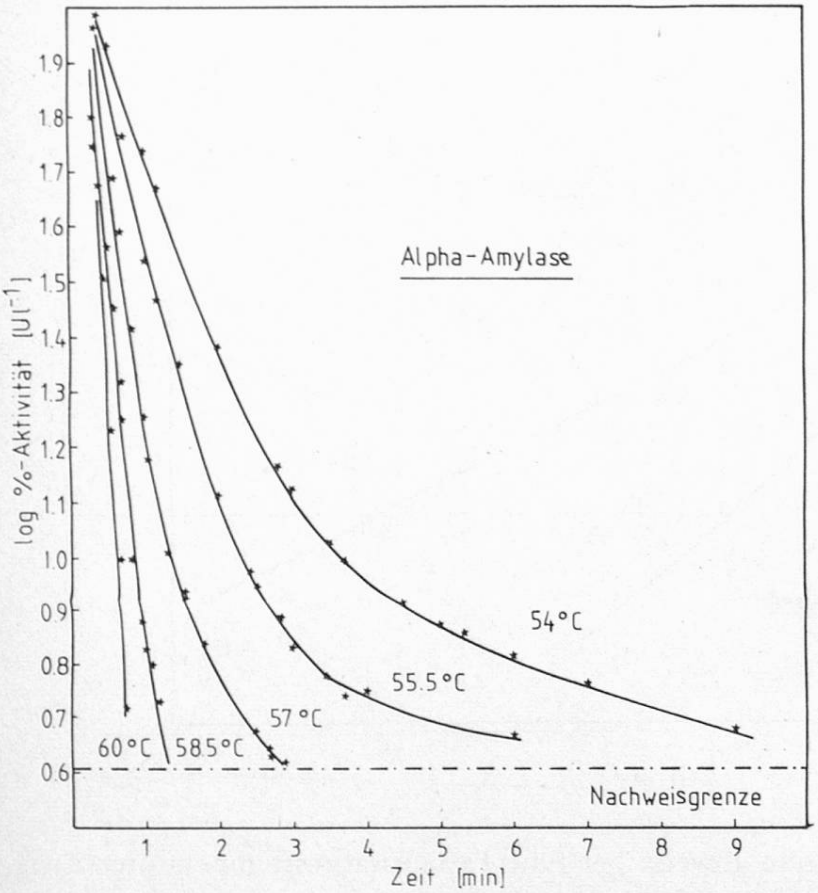

Abb. 4. Inaktivierung der α-Amylase in Eiweiss bei fünf Pasteurisationstemperaturen zwischen 54 und 60 °C in Abhängigkeit von der Pasteurisationszeit

Koagulation der Eiweissmasse

Auch die Eiweisskoagulation, definiert als Zeitpunkt deutlich erkennbarer Trübung während der Erhitzung, erfolgte exponentiell (Abb. 12 A). Die ermittelte Regressionsgerade hatte bei einem Korrelationskoeffizienten *r (n* 5) von –0,998 einen Achsenabschnitt von 18,28 und eine Steigung von –0,308.

Hitzeinaktivierung von Bakterien in Eiweiss

In den Abbildungen 5 bis 11 sind die Überlebenskurven der sieben geprüften Bakterienstämme in Eiweiss ohne und mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat, selbsthergestellt aus 2 bis 3 Monate alten Schaleneiern, in halblogarithmischem

Massstab dargestellt. Die aufgeführten Koloniezahlen (KBE ml^{-1}) sind jeweils Mittelwerte von zwei unabhängigen Versuchsreihen, in denen bei allen fünf Erhitzungstemperaturen jeweils dieselbe beimpfte Eiweissmasse (pH 9,2) geprüft wurde.

Die Koloniezahlen der ATCC-Stämme *Escheria coli* (Abb. 5), *Pseudomonas aeruginosa* (Abb. 6), *Staphylococcus aureus* (Abb. 7) und *Salmonella typhimurium* (Abb. 10) wurden im untersuchten Temperaturbereich zwischen 54 und 60 °C in Eiweiss ohne Zusatz von Triethylcitrat innerhalb von ein bis vier Minuten um mehr als vier Zehnerpotenzen reduziert. In Eiweiss mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat waren für eine gleichwertige Keimzahlreduktion halb so lange Erhitzungszeiten erforderlich. Die Überlebenskurven dieser vier Testkeime verliefen nach zunächst leichter Schulterbildung bei *E. coli* (Abb. 5) und *S. typhimurium* (Abb. 10) eindeutig exponentiell. Die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden *r (n* 3 bis 7) lagen mit einem Mittelwert von –0,990 zwischen –0,967 und –0,999.

Bei den hitzeresistenteren Stämmen 148 und 150 von *Staphylococcus aureus* (Abb. 8 und 9) sowie *Salmonella senftenberg* 775 W (Abb. 11) waren für eine Inaktivierung um vier Zehnerpotenzen bei 60 °C in Eiweiss ohne und mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat Erhitzungszeiten von zwei bis drei Minuten notwendig. Bei der niedrigsten untersuchten Temperatur von 54 °C wurden dafür in Eiweiss ohne Triethylcitrat bei *S. aureus 148* (Abb. 8) und *S. senftenberg 775 W* (Abb. 11) 28 bzw. 32 Minuten und bei *S. aureus* 150 (Abb. 9) sogar über 60 Minuten benötigt, in Eiweiss mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat entsprechend 26, 23 bzw. über 90 Minuten.

Die Überlebenskurven von *S. aureus* 148 (Abb. 8) und *S. senftenberg* 775 W (Abb. 11) wiesen bei den niedrigeren Erhitzungstemperaturen von 54 bis 57 °C einen mehr oder weniger deutlichen Knickpunkt auf. Dabei folgte nach einem zunächst steileren exponentiellen Abfall um eine bis über zwei Zehnerpotenzen ein flacherer, ebenfalls exponentieller Verlauf.

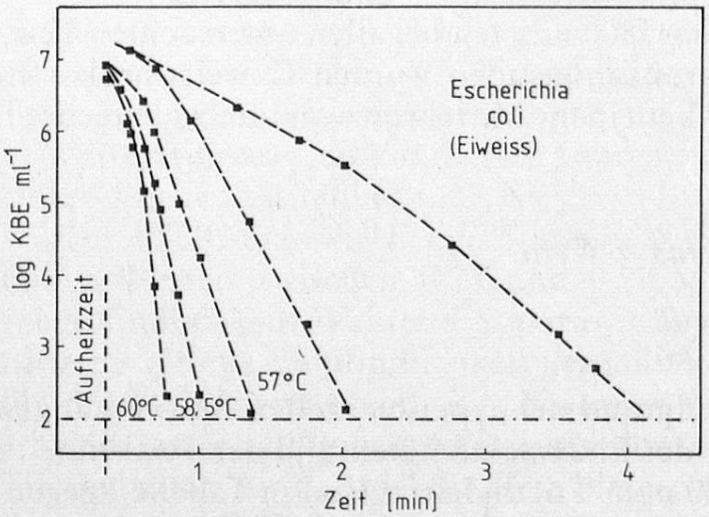

Abb. 5. Inaktivierung von *Escherichia coli* ATCC 25992 in Eiweiss bei fünf Pasteurisationstemperaturen zwischen 54 und 60 °C in Abhängigkeit von der Pasteurisationszeit

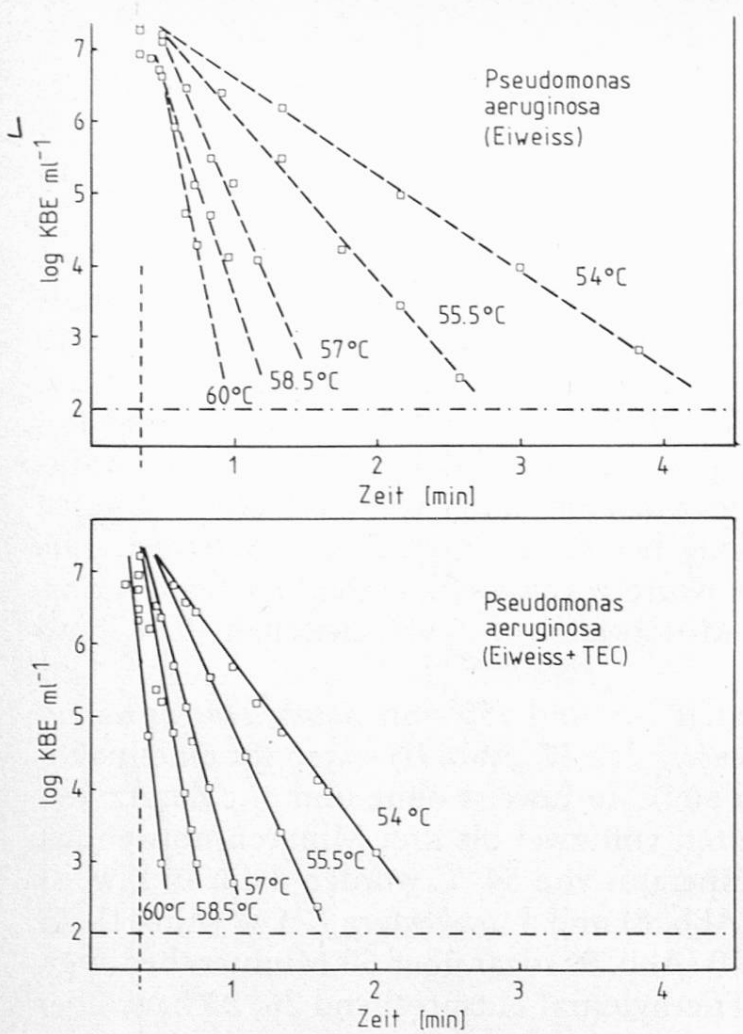

Abb. 6. Inaktivierung von *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 in Eiweiss ohne und mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat (TEC) bei fünf Pasteurisationstemperaturen zwischen 54 und 60 °C in Abhängigkeit von der Pasteurisationszeit

Bei den höheren Temperaturen von 58,5 und 60 °C verliefen die Kurven ohne Knickpunkt. Die Korrelationskoeffizienten *r* (*n* 4 bis 7) lagen bei den flachen Ästen der Überlebenskurven mit einem Mittelwert von –0,996 zwischen –0,985 und –0,999, für den gesamten Bereich der Überlebenskurven mit einem nur wenig tieferen Mittelwert von –0,990 zwischen –0,979 und –0,997.

Die Überlebenskurven von *S. aureus* 150 verliefen bei allen untersuchten Temperaturen exponentiell. Für die Regressionsgeraden wurden Korrelationskoeffizienten zwischen –0,986 und –0,999 bei einem Mittelwert von –0,996 berechnet.

D- und z-Werte

Bakterien

Die mittels linearer Regression aufgrund der experimentellen Bestimmungen (Abb. 1 bis 11) berechneten D-Werte der Enzymaktivitäten und der Testkeime in Eiweiss ohne und mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat sind in Tabelle 1 gegenübergestellt. Die Auftragung der D-Werte in logarithmischem Massstab gegen die

Temperatur ergibt die D-Kurven (Decimal Reduction Time Curve), deren Steigungen den z-Werten entsprechen.

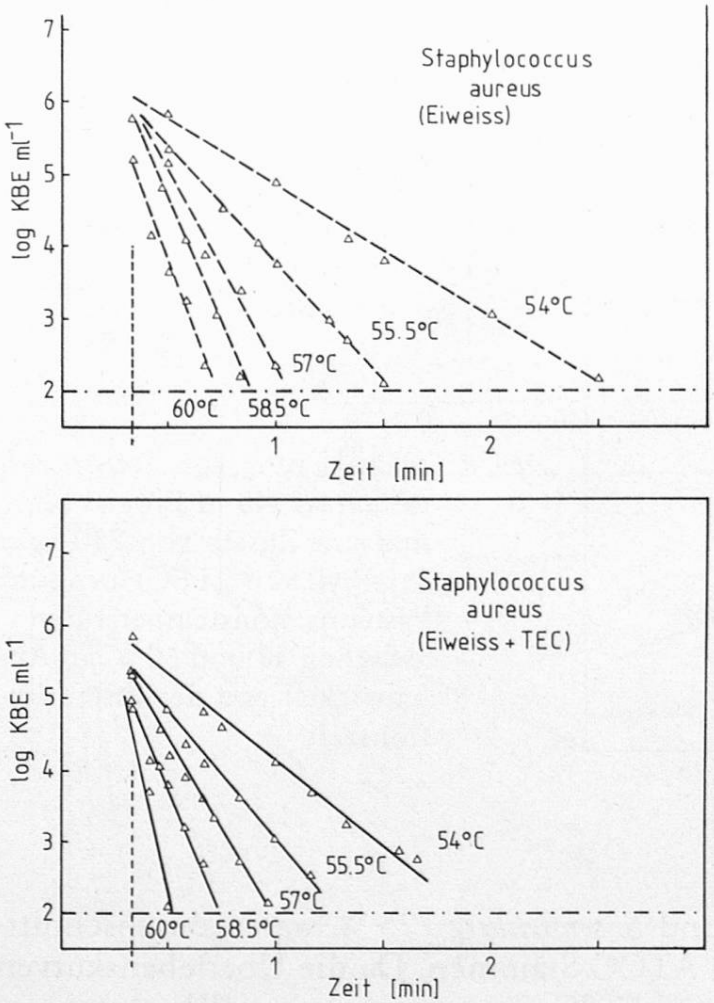

Abb. 7. Inaktivierung von *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 in Eiweiss ohne und mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat (TEC) bei fünf Pasteurisationstemperaturen zwischen 54 und 60 °C in Abhängigkeit von der Pasteurisationszeit

In Abbildung 12 A sind die D-Kurven für Lysozym, Katalase, α-Amylase und *S. typhimurium* und in Abbildung 12 B für die α-Amylase und die Testkeime *S. typhimurium, S. senftenberg* 775 W und *S. aureus* 150 dargestellt. Während bei den Testkeimen die in Eiweiss ohne bzw. mit Zusatz von Triethylcitrat bestimmten D-Werte teilweise stark variierten, waren bei den Enzymen keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

Die ATCC-Stämme *E. coli, S. aureus, S. typhimurium* und *P. aeruginosa* zeigten mit D-Werten zwischen 0,23 und 0,71 Minuten insgesamt relativ hohe Hitzeempfindlichkeit. Während *S. aureus* in Eiweiss ohne und mit Triethylcitrat annähernd gleiche Empfindlichkeit gegenüber der Hitzeeinwirkung aufwies, waren für die Inaktivierung von *S. typhimurium* und *P. aeruginosa* in Eiweiss mit Triethylcitrat nur halb so lange Pasteurisationszeiten erforderlich als in Eiweiss ohne Triethylcitrat. Als Beispiel für diese hitzeempfindlichen Testkeime sind in Abbildung 12 die D-Kurven von *S. typhimurium* wiedergegeben.

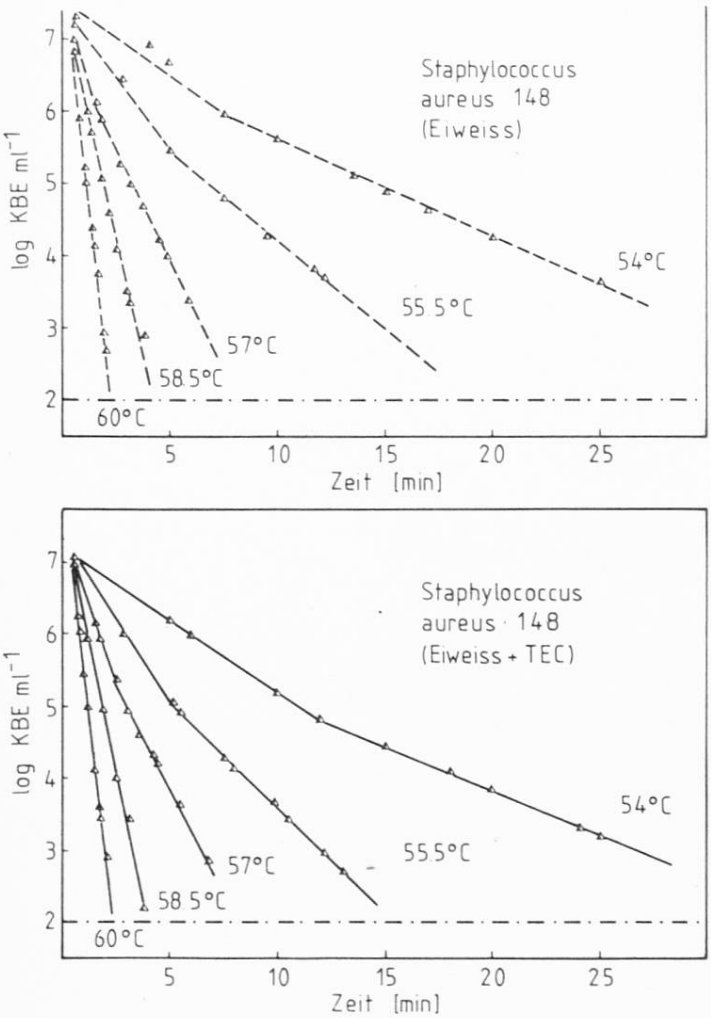

Abb. 8. Inaktivierung von *Staphylococcus aureus* 148 in Eiweiss ohne und mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat (TEC) bei fünf Pasteurisationstemperaturen zwischen 54 und 60 °C in Abhängigkeit von der Pasteurisationszeit

Die D-Werte von *S. aureus* 148 und *S. senftenberg* 775 W waren durchschnittlich 10- bis 17fach höher als bei den ATCC-Stämmen. Da die Überlebenskurven bei den Temperaturen zwischen 54 und 57 °C aus zwei exponentiellen Ästen unterschiedlicher Steigungen zusammengesetzt waren, liessen sich im Prinzip drei verschiedene D-Werte ableiten: D_1 für den ersten steileren Ast, D_2 für den flacher verlaufenden Ast der Überlebenskurve und D_M für die gesamte Überlebenskurve. Im Hinblick auf die Anwendbarkeit in der Praxis sind in Tabelle 1 und bei den ermittelten Parametern der Regressionsgeraden in Abbildung 12 nur die D_2- und D_M-Werte aufgeführt. Die abgebildeten D-Kurven (Abb. 12 B) von *S. senftenberg* 775 W gelten für die D_M-Werte.

Die grösste Hitzeresistenz hatte der Stamm 150 von *S. aureus.* Mit einem D-Wert von 16,3 Minuten in Eiweiss ohne Triethylcitrat war er bei 54 °C mehr als 2fach weniger hitzeempfindlich als *S. senftenberg* 775 W und über 25fach resistenter als *S. typhimurium.* Bei der höchsten geprüften Erhitzungstemperatur von 60 °C hatten *S. aureus* 150 und *S. senftenberg* 775 W die gleichen D-Werte von 0,58 bzw. 0,59 Minuten. Im Gegensatz zu allen übrigen geprüften Stämmen, die in Eiweiss mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat empfindlicher waren oder wie die beiden anderen Stämme von *S. aureus* höchstens gleiche Empfindlichkeit aufwie-

sen, war *S. aureus* 150 in Eiweiss mit Triethylcitrat bei 60 °C 1,1fach und bei 54 °C 1,5fach resistenter als in Eiweiss ohne Triethylcitrat.

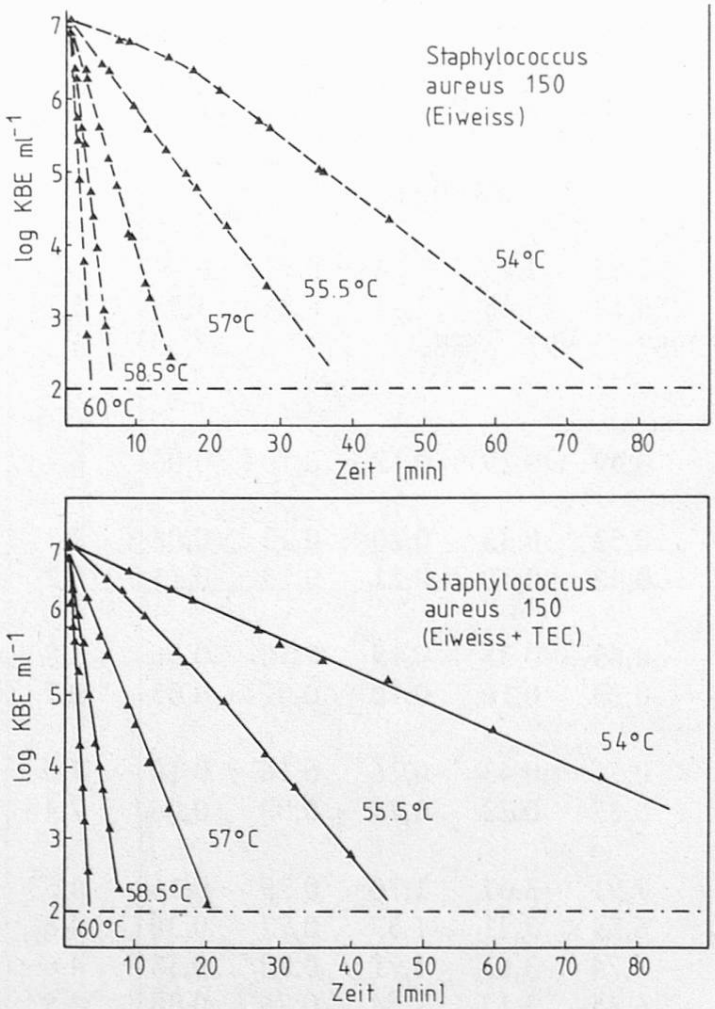

Abb. 9. Inaktivierung von *Staphylococcus aureus* 150 in Eiweiss ohne und mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat (TEC) bei fünf Pasteurisationstemperaturen zwischen 54 und 60 °C in Abhängigkeit von der Pasteurisationszeit

Enzyme

Der $D_{57\,°C}$-Wert der *N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase* war mit 0,24 bis 0,78 Minuten 2- bis 7fach höher als die entsprechenden Werte der hitzeempfindlichen ATCC-Stämme, aber um den Faktor 2 bis 7 deutlich niedriger als diejenigen der resistenten Stämme *S. senftenberg* 775 W und *S. aureus* 148 und 150.

Die α-Amylase zeigte bei niedrigen Temperaturen eine deutlich, bei höheren Temperaturen eine etwas weniger ausgeprägte höhere Hitzeresistenz als die hitzeempfindlichen Testkeime (Abb. 12 A). Die D-Kurve der α-Amylase und die D_M-Kurve von *S. senftenberg* 775 W in Eiweiss ohne Triethylcitrat lagen etwa auf gleicher Höhe, wiesen aber unterschiedliche Steigungen auf, was zur Überschneidung bei 56 °C führte. Daraus resultierte für die α-Amylase bei Temperaturen unter 56 °C, für *S. senftenberg* 775 W dagegen über 56 °C eine etwas höhere Hitzeresistenz in Eiweiss ohne Triethylcitrat. In Eiweiss mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat waren die D-Werte der α-Amylase im untersuchten Temperaturbereich um den Faktor 1,2 bis 1,5 höher.

Tabelle 1. D- und z-Werte von N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase, Lysozym, Katalase, α-Amylase sowie der Testkeime *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Salmonella senftenberg* 775 W und *Staphylococcus aureus* in Eiweiss ohne und mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat (TEC)

Enzyme bzw. Testkeime	TEC 250 ppm		D-Werte in Minuten bei 54,0 °C	55,5 °C	57,0 °C	58,5 °C	60,0 °C	z-Werte in °C
Enzyme								
N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase			0,24–0,78					
α-Amylase	+/–		8,25	3,95	1,86	0,91	0,44	4,7
Katalase	+/–		50,19	25,45	12,91	6,54	3,32	5,1
Lysozym	+/–		2957	997	336	113	38,30	3,2
Testkeime								
Escherichia coli ATCC 25992	–		0,49	0,29	0,17	0,10	0,06	6,7
Staphylococcus aureus ATCC 25923	–		0,52	0,33	0,20	0,13	0,08	7,3
	+		0,42	0,30	0,21	0,15	0,11	10,2
Salmonella typhimurium ATCC 13311	–		0,63	0,35	0,19	0,10	0,06	5,8
	+		0,23	0,16	0,10	0,07	0,05	8,7
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442	–		0,71	0,43	0,26	0,16	0,10	7,0
	+		0,37	0,23	0,14	0,09	0,06	7,4
Staphylococcus aureus 148	–	D_2	7,91	3,67	1,70	0,79	0,36	4,5
		D_M	6,54	3,21	1,57	0,77	0,38	4,8
	+	D_2	7,74	3,63	1,71	0,80	0,38	4,6
		D_M	6,35	3,13	1,54	0,76	0,38	4,9
Salmonella senftenberg 775 W	–	D_2	8,19	4,48	2,45	1,34	0,73	5,7
		D_M	7,30	3,90	2,08	1,05	0,59	5,5
	+	D_2	5,92	3,05	1,57	0,81	0,42	5,2
		D_M	5,51	2,78	1,40	0,71	0,36	5,0
Staphylococcus aureus 150	–		16,26	7,05	3,06	1,33	0,58	4,1
	+		22,92	9,44	3,89	1,60	0,66	3,9
Beginn der Eiweisskoagulation	+/–		45,27	15,64	5,40	1,87	0,64	3,3

+/– Eiweiss mit (+) bzw. ohne (–) Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat (TEC).
D_2 = D-Wert des zweiten flacher verlaufenden Astes der gebrochenen Überlebenskurve.
D_M = D-Wert der gesamten Überlebenskurve.

Die D-Kurven für Katalase und Lysozym lagen über der Kurve der beginnenden Eiweisskoagulation. Beide Enzyme waren um ein vielfaches hitzeresistenter als alle geprüften Stämme.

Die Temperaturabhängigkeit der D-Werte der ATCC-Stämme von *E. coli, S. aureus, S. typhimurium* und *P. aeruginosa* war mit z-Werten von 6 bis 10 °C relativ gering, die der α-Amylase, Katalase und von *S. aureus* 148 und *S. senftenberg* 775 W mit Werten von 4,5 bis 5,5 °C etwas höher. Eine deutlich grössere Temperaturabhängigkeit zeigten die D-Werte von Lysozym und *S. aureus* 150 sowie die Zeiten der beginnenden Eiweisskoagulation mit Werten zwischen 3,2 und 4,1 °C.

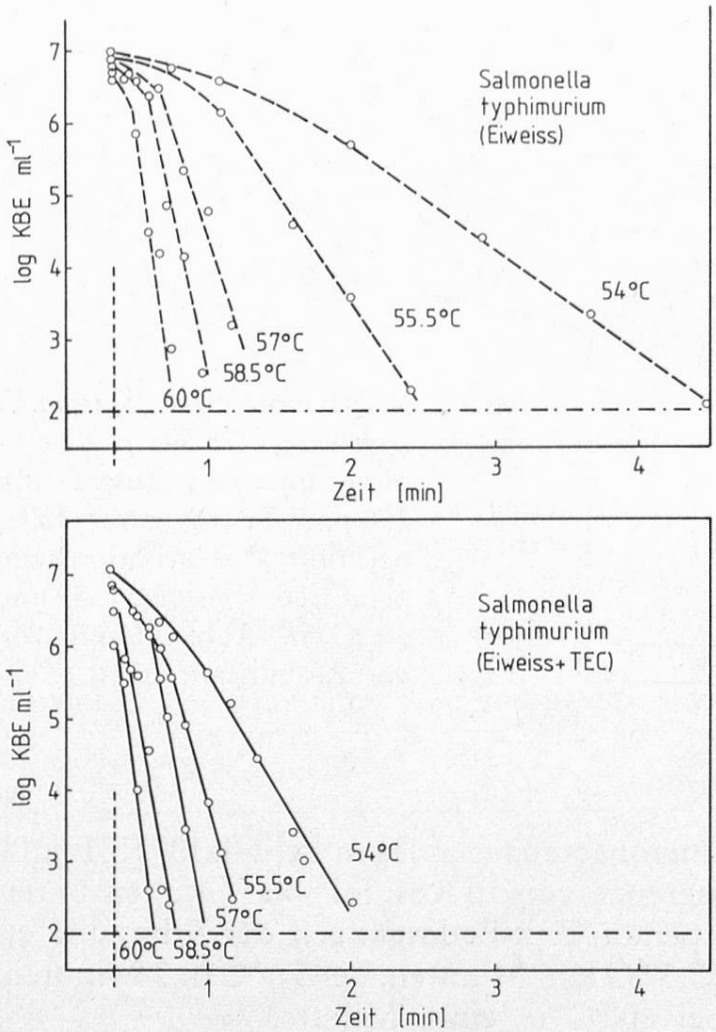

Abb. 10. Inaktivierung von *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 in Eiweiss ohne und mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat (TEC) bei fünf Pasteurisationstemperaturen zwischen 54 und 60 °C in Abhängigkeit von der Pasteurisationszeit

Hitzeinaktivierung von Enterobacteriaceen und aeroben mesophilen Keimen in industriell hergestellten Eiweissprodukten

In den Abbildungen 13 und 14 sind die Überlebenskurven der Enterobacteriaceen bzw. aeroben mesophilen Keime bei sechs verschiedenen, industriell hergestellten Eiweissmassen mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat dargestellt. Die angegebenen Koloniezahlen (KBE ml^{-1}) sind jeweils Mittelwerte von sechs unabhängigen Versuchsreihen, bei denen alle fünf Erhitzungstemperaturen zwischen 54 und 60 °C mit der gleichen Eiweissmasse geprüft worden waren.

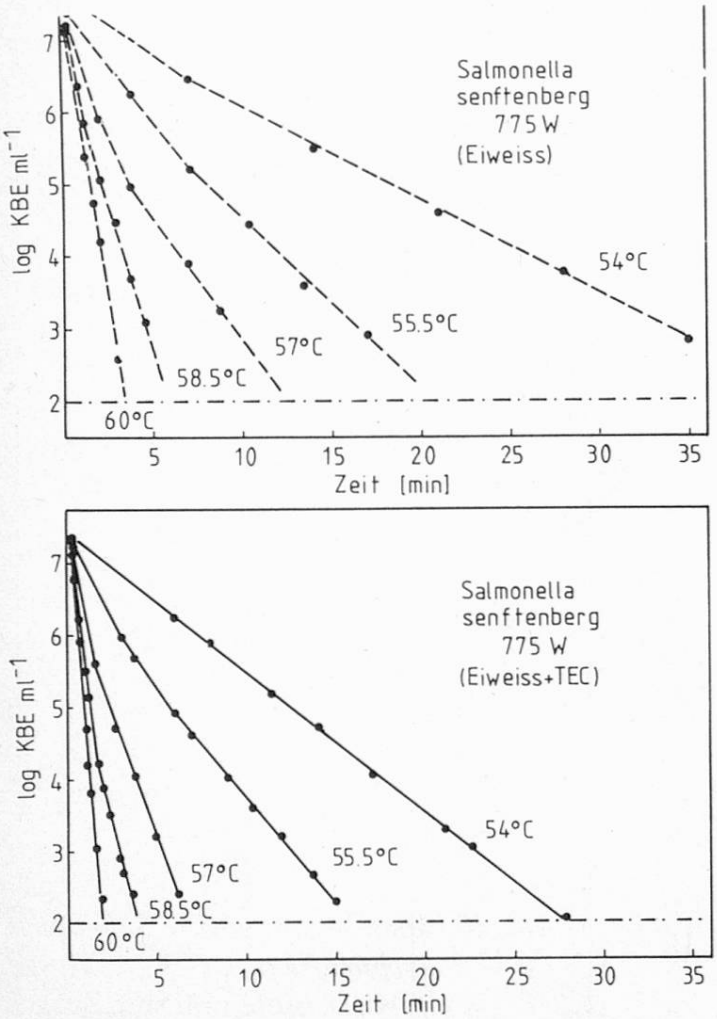

Abb. 11. Inaktivierung von *Salmonella senftenberg* 775 W in Eiweiss ohne und mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat (TEC) bei fünf Pasteurisationstemperaturen zwischen 54 und 60 °C in Abhängigkeit von der Pasteurisationszeit

Die Ausgangskoloniezahlen der Enterobacteriaceen lagen bei 1-4x10^4 KBE ml^{-1}. Eine Reduktion unter die Nachweisgrenze von 10 KBE ml^{-1} war in allen untersuchten Proben bei folgenden Temperatur-Zeit-Bedingungen der Erhitzung erfolgt: bei 54 °C in 10 Minuten, bei 55,5 °C in 5 Minuten, bei 57 °C in 3 Minuten, bei 58,5 °C in 1,5 Minuten und bei 60 °C in einer Minute.

Die Überlebenskurven der aeroben mesophilen Keime wiesen bei allen untersuchten Temperaturen nach zunächst steilem Abfall um eine bis zwei Zehnerpotenzen einen ausgeprägten sigmoiden Verlauf mit Tailing auf. Für die Reduktion der Koloniezahlen um 2,2 Zehnerpotenzen von 2×10^5 auf $1{,}3 \times 10^3$ KBE ml^{-1} musste das Eiweiss bei 54, 55,5 und 57 °C für 10, 5 bzw. 3 Minuten erhitzt werden. Eine Reduktion um weitere 0,5 Zehnerpotenzen, entsprechend einer Koloniezahl von 4×10^2 KBE ml^{-1}, erforderte mindestens doppelt so lange Pasteurisationszeiten.

70% der Isolate von 50 Kolonien, die nach Erhitzung bei 57 °C für drei Minuten auf BHI-Agar gewachsen waren, wurden als *Streptococcus,* 20% als Coryneforme und 10% als Flavobakterien identifiziert. Je ein Isolat war eine *Bacillus*- und *Micrococcus*-Art.

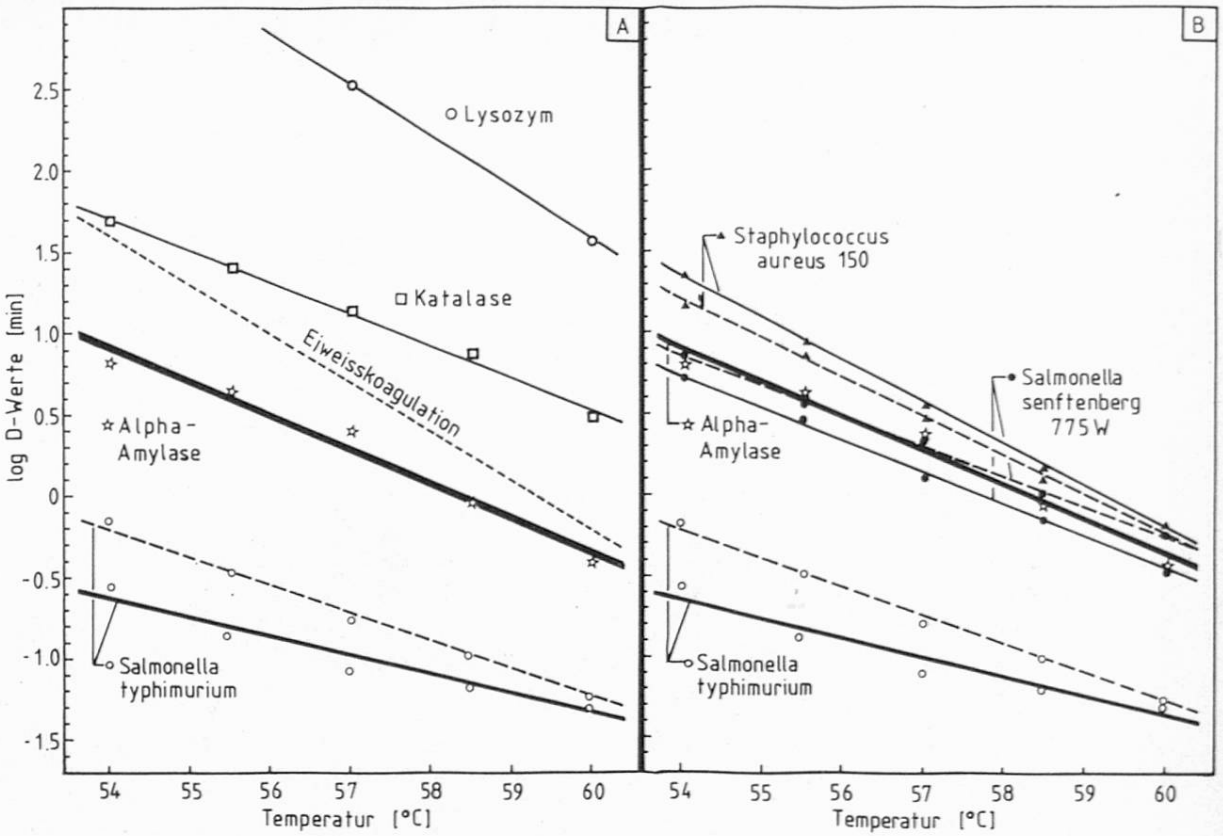

Abb. 12. D-Kurven (Decimal Reduction Time Curve) für A) Lysozym, Katalase, α-Amylase und *Salmonella typhimurium* und B) α-Amylase, *Salmonella typhimurium, Salmonella senftenberg* 775 W und *Staphylococcus aureus* in Eiweiss ohne (– – –) und mit (——) Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat (TEC)

Parameter der ermittelten Regressionsgeraden zu Abbildung 12:

Enzyme bzw. Testkeime	TEC 250 ppm		Parameter der Regressionsgeraden a	b	r (n)
Enzyme					
α-Amylase*	+/–		12,413	–0,213	–0,986 (5)
Katalase*	+/–		12,317	–0,197	–0,997 (5)
Lysozym*	+/–		20,470	–0,315	–0,999 (3)
Testkeime					
Escherichia coli ATCC 25992	–		7,732	–0,149	–0,997 (5)
Staphylococcus aureus	–		7,139	–0,137	–0,991 (4)
ATCC 25923	+		4,911	–0,098	–0,995 (5)
Salmonella typhimurium	–		9,152	–0,173	–0,993 (5)
ATCC 13311*	+		5,545	–0,114	–0,950 (5)
Pseudomonas aeruginosa	–		7,576	–0,143	–0,989 (5)
ATCC 15442	+		6,848	–0,135	–0,998 (5)
Staphylococcus aureus 148	–	D_2	12,926	–0,223	–0,998 (5)
		D_M	11,950	–0,206	–0,999 (5)
	+	D_2	12,711	–0,219	–0,999 (5)
		D_M	11,851	–0,205	–0,999 (5)
Salmonella senftenberg 775 W*	–	D_2	10,338	–0,175	–0,994 (5)
		D_M	10,666	–0,182	–0,999 (5)
	+	D_2	11,135	–0,192	–0,986 (5)
		D_M	11,452	–0,198	–0,997 (5)
Staphylococcus aureus 150*	–		14,265	–0,242	–0,999 (5)
	+		15,229	–0,257	–0,999 (5)
Beginn der Eiweisskoagulation*	+/–		18,277	–0,308	–0,998 (5)

* in Abbildung dargestellt
+/– Eiweiss mit (+) bzw. ohne (–) Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat
D_2 = D-Wert des zweiten flacher verlaufenden Astes der gebrochenen Überlebenskurve
D_M = D-Wert der gesamten Überlebenskurve

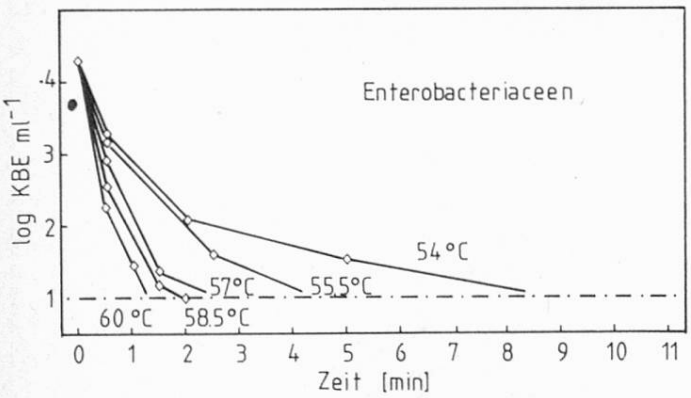

Abb. 13. Inaktivierung der Enterobacteriaceen in industriell hergestellten Eiweissmassen mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat bei fünf Pasteurisationstemperaturen zwischen 54 und 60 °C in Abhängigkeit von der Pasteurisationszeit (Mittelwerte von 6 Versuchsreihen)

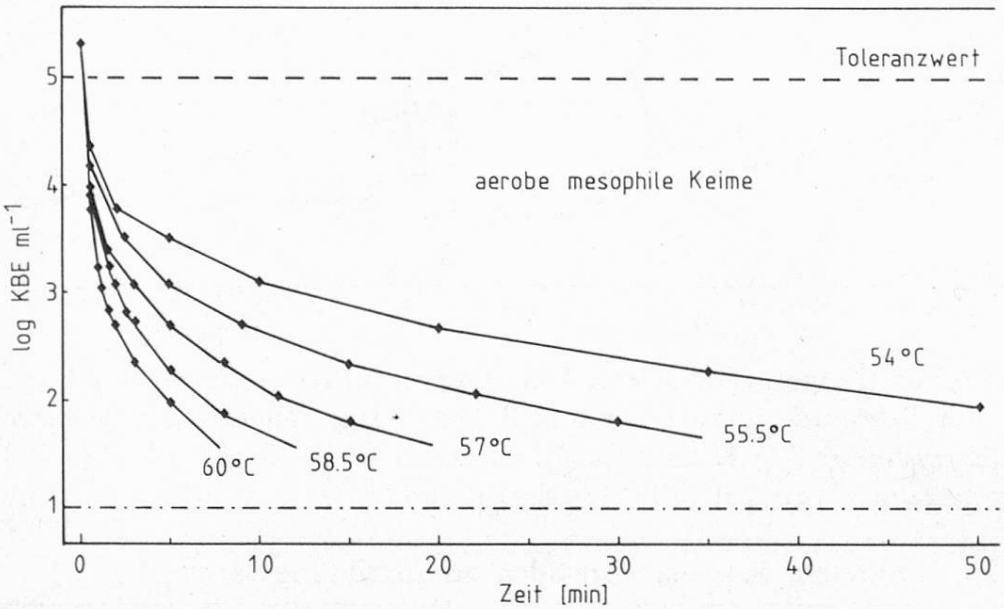

Abb. 14. Inaktivierung der aeroben mesophilen Keime in industriell hergestellten Eiweissmassen mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat bei fünf Pasteurisationstemperaturen zwischen 54 und 60 °C in Abhängigkeit von der Pasteurisationszeit (Mittelwerte von 6 Versuchsreihen); – – – Toleranzwert nach der eidg. Hygieneverordnung (16)

Koloniezahlen, Katalase- und α-Amylase-Aktivitäten in industriell hergestellten Eiweissprodukten vor und nach Pasteurisation

In Tabelle 2 sind die Koloniezahlen der aeroben mesophilen Keime und Enterobacteriaceen sowie die α-Amylase- und Katalase-Aktivitäten, wie sie in 15 verschiedenen Chargen von industriell hergestellten Eiweissmassen mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat vor und nach der Hitzebehandlung bei 57 °C während sechs Minuten in einem Plattenpasteur bestimmt wurden, aufgeführt.

Bei diesen Pasteurisationsbedingungen wurden die Koloniezahlen der aeroben mesophilen Keime um ca. drei Zehnerpotenzen reduziert. Die Enterobacteriaceen wurden mit einer Ausnahme in allen Proben unter die Nachweisgrenze von 10 KBE ml^{-1} inaktiviert.

Tabelle 2. Koloniezahlen von aeroben mesophilen Keimen und Enterobacteriaceen und α-Amylase- und Katalase-Aktivitäten in 15 industriell hergestellten Eiweissmassen mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat vor (up) und nach (p) der Pasteurisation für 6 Minuten bei 57 °C im Plattenpasteur

Charge	Aerobe mesophile Keime KBE ml^{-1}		Enterobacteriaceen KBE ml^{-1}		α-Amylase-Aktivität [U l^{-1}] (%)		Katalase-Aktivität [U l^{-1}] (%)	
	up (10^3)	p (10^3)	up (10^3)	p	up (100%)	p (%)	up (100%)	p (%)
1	40	0,1	16	< 10	111,8	u. N.	41,1	10,0 (24,3)
2	100	0,8	16	< 10	77,9	u. N.	32,5	9,1 (28,1)
3	100	0,2	4	< 10	74,1	u. N.	40,5	10,4 (25,4)
4	200	1,6	6	20	81,0	3,7 (4,6)	27,9	16,2 (58,1)
5	250	3,2	8	< 10	73,2	u. N.	21,3	5,5 (25,8)
6	320	2,5	32	< 10	74,2	u. N.	22,2	4,1 (18,5)
7	320	3,2	40	< 10	77,7	u. N.	29,9	5,6 (18,7)
8	400	3,2	20	< 10	67,8	u. N.	18,7	3,8 (20,3)
9	600	0,1	40	< 10	71,1	u. N.	36,3	4,8 (13,2)
10	1000	0,2	40	< 10	74,8	u. N.	32,7	4,1 (12,5)
11	2000	0,2	20	< 10	52,1	u. N.	20,4	1,3 (6,4)
12	3200	4,0	40	< 10	78,8	u. N.	34,1	7,2 (21,1)
13	4000	1,3	40	< 10	74,9	u. N.	40,8	11,4 (27,9)
14	5000	0,5	10	< 10	74,5	u. N.	23,6	3,3 (14,0)
15	7900	0,6	10	< 10	75,5	u. N.	21,3	4,6 (21,6)
$\bar{x}$	1700	1,4	23	(< 10)	76,0	(u. N.)	29,6	6,8 (22,4)
VK (%)	138,0	96,4	62,6		15,8		27,0	58,1 (52,1)

up = unpasteurisiertes Eiweiss
p = pasteurisiertes Eiweiss
u. N. = unter der Nachweisgrenze des Phadebas^R-Amylase-Tests von 3,08 U l^{-1}
VK = Variationskoeffizient

Während die Katalase nach dieser Hitzebehandlung noch Restaktivitäten von im Mittel 22% aufwies, wurde die α-Amylase-Aktivität unter die Nachweisgrenze des für die Bestimmung der α-Amylase in Eiweiss mit dem Phadebas^R-Test festgesetzten Wertes von 3,08 U l^{-1} reduziert. Nur bei einer Probe wurden sowohl für die α-Amylase als auch für die Katalase deutlich höhere Restaktivitäten von 3,7 bzw. 16,2 U l^{-1} bestimmt.

Diskussion

Hitzeinaktivierung von Enzymen in Eiweiss

N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase

Die Aktivität der N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase ist stark vom pH-Wert der Eiweissmasse abhängig und sinkt rasch ab, wenn dieser 9,0 bis 9,1 übersteigt (7, 17). In der Regel werden Eiweissmassen, die in industriellen Betrieben pasteurisiert werden, aus importierten Schaleneiern hergestellt. Nach Angaben von Eiprodukteproduzenten werden die Eier je nach Bedarf vor der Verarbeitung ein bis zwei Monate bei 10 °C gelagert. Dabei steigt der pH-Wert im Eiweiss, der bei frisch gelegten Eiern 7,4 beträgt, bis auf 9,6 an (18). In vorliegenden Untersuchungen wurden bei über 30 industriell hergestellten Eiweissmassen pH-Werte zwischen 9,18 und 9,59 bei einem Mittelwert von 9,35 bestimmt.

Die hier bei 57 °C geprüften drei industriell hergestellten Eiweissmassen hatten pH-Werte zwischen 9,22 und 9,35 und Ausgangsaktivitäten der N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase von 10,5 bis 39 U l^{-1}. Für die 90%ige Inaktivierung des Enzyms wurde ein D-Wert von 0,78 Minuten bestimmt. Dagegen wurde in der Eiweissprobe mit der wesentlich höheren Ausgangsaktivität von 396 U l^{-1} und einem pH-Wert von 9,11 das Enzym zunächst innerhalb von 20 Sekunden um 95% auf 18 U l^{-1} inaktiviert, was einem D-Wert von 0,24 Minuten entspricht. Bei weiterer Erhitzung erfolgte dann auch in dieser Probe die Inaktivierung mit ähnlicher Geschwindigkeit wie in den industriellen Eiweissmassen. Die Ursache dafür könnte sein, dass das Enzym in multiplen Formen, die als Isoenzyme oder auch als Isozyme bezeichnet werden, vorhanden war. Die Isoenzyme katalysieren die gleiche Reaktion, unterscheiden sich aber durch ihre Primärstruktur und andere Eigenschaften (19, 20). Danach könnte in der Eiweissprobe mit 396 U l^{-1} zunächst das hitzeempfindlichere Isoenzym inaktiviert worden sein. Der zweite flacher verlaufende Ast der Kurve würde dann der Inaktivierung eines hitzeresistenteren Isoenzyms entsprechen. Da in den industriell hergestellten Eiweissmassen nur noch dieser Inaktivierungsverlauf festzustellen war, ist anzunehmen, dass nur noch das resistentere Isoenzym vorhanden und nachdem das empfindlichere Isoenzym bereits während der Lagerung der Schaleneier inaktiviert war.

Dass die D-Werte der N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase nicht allein von der Erhitzungstemperatur, sondern unter anderem auch in hohem Masse vom pH-Wert der Eiweissmasse beeinflusst werden, wurde bereits 1971 von *Donovan* und *Hansen* (10) festgestellt. Danach waren bei höheren pH-Werten kürzere Erhitzungszeiten für die Inaktivierung des Enzyms erforderlich. Aus den dort gemachten Angaben lassen sich für Eiweiss mit pH-Werten von 6,8, 7,0 und 7,2 bei der Erhitzungstemperatur von 57 °C D-Werte von 46,6, 26,2 bzw. 15,9 Minuten berechnen. Wenn diese D-Werte in logarithmischem Massstab den entsprechenden pH-Werten gegenübergestellt werden, ergibt sich ein linearer Zusammenhang. Die ermittelte Regressionsgerade weist einen Achsenabschnitt von 9,583 und ei-

ne Steigung von –1,165 auf bei einem Korrelationskoeffizienten *r (n* 3) von –0,999. Durch Interpolation lassen sich aus diesen Daten für pH-Werte grösser als 9,1 D-Werte von weniger als 0,1 Minute errechnen. Während also in frischem Eiweiss mit pH-Werten zwischen 7,0 und 7,4 nach der Pasteurisation bei in der Praxis angewandten Temperatur-Zeit-Bedingungen (60 °C, 3,5 Minuten, pH 7,0) noch Restaktivitäten bis 30% der ursprünglichen Aktivität nachzuweisen sind (10), erfolgt in Eiweissmassen mit pH-Werten von 9,1 und mehr bei 57 °C innerhalb von weniger als einer Minute eine vollständige Inaktivierung des Enzyms.

Da die Aktivität der N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase infolge Erhöhung des pH-Wertes während der Lagerung der Schaleneier stark abnimmt und zudem die Inaktivierung durch Hitzebehandlung bei diesen pH-Werten ausserordentlich rasch erfolgt, eignet sich die N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase nicht zum Nachweis der ausreichenden Pasteurisation von Eiweiss.

Lysozym

Die Resultate zahlreicher Untersuchungen mit Eiweiss und reinen Lysozymlösungen (6, 21–23) haben gezeigt, dass die Hitzeinaktivierung von Lysozym stark vom pH-Wert und der Konzentration der Eiweissproteine Ovalbumin und Ovomucin, die mit Lysozym interagieren, abhängig ist. Nach den vorliegenden Resultaten wird Lysozym in Eiweiss mit einem pH-Wert von 9,2 nach Pasteurisation bei 62,5 °C für 10 Minuten um 98% inaktiviert. Dieser Wert stimmt gut mit den Angaben von *Cunningham* und *Lineweaver* (21) überein, die für Eiweiss mit einem pH-Wert von 9,0 unter diesen Bedingungen eine Inaktivierung von über 95% ermittelten. In Eiweiss mit einem pH-Wert von 7,0 bestimmten sie dagegen eine Aktivitätsverminderung um etwa 10%. In einem Phosphatpuffer von pH 9,0 mit einem Lysozymgehalt, der jenem von Hühnereiweiss entspricht, konnten sie dagegen keine Inaktivierung feststellen.

Henderson und *Robinson* (6) pasteurisierten Eiweiss bei Temperaturen zwischen 53 und 60 °C während 2,5 Minuten und fanden, dass die Hitzebehandlung bis 58 °C keinen Einfluss auf die Lysozym-Aktivität hatte. In Eiweissproben, die bei 59 und 60 °C pasteurisiert wurden, erfolgte hingegen eine 50 bzw 67%ige Inaktivierung. *Cunningham* und *Lineweaver* (22) fanden nach Hitzebehandlung von Eiweiss mit einem pH-Wert von 9,0 bei 60 °C während 5 Minuten eine wesentlich geringere Inaktivierung von 40%. In den vorliegenden Untersuchungen wurden bei dieser Temperatur nach 2,5 Minuten Aktivitätsverminderungen von 14% und nach 5 Minuten von 27% festgestellt.

Wie aus der Kurve der Temperatur-Zeit-Abhängigkeit der Eiweisskoagulation (Abb. 12 A) ersichtlich ist, setzt bei 60 °C bereits nach weniger als 40 Sekunden eine Zunahme der Trübung der Eiweissmasse ein. Unter Beachtung der Erhaltung ausreichender Produktequalität, das heisst Verhütung der Koagulation, war im untersuchten Temperaturbereich eine Inaktivierung von Lysozym um lediglich 4% erreichbar. Damit ist die Messung der Lysozymaktivität zur Anzeige einer ausreichenden Eiweisspasteurisation nicht geeignet.

Katalase

Die Gegenüberstellung der D-Kurven von Katalase und beginnender Eiweisskoagulation (Abb. 12 A) zeigt, dass im Temperaturbereich von 54 bis 60 °C eine 90%ige Inaktivierung der Katalase zu einer sehr starken Beeinträchtigung der Eiweissqualität führt. Bei Temperatur-Zeit-Bedingungen, die keine Veränderungen der Eiweissmasse verursachen, ist eine Aktivitätsverminderung von höchstens 38% bei 60 °C bis 88% bei 54 °C möglich.

Nach *Henderson* und *Robinson* (6) wurde die Katalase in 15 industriell hergestellten Eiweissmassen nach Hitzebehandlung bei einer Temperatur von 57,8 °C während 2,5 Minuten im Durchschnitt zur Hälfte inaktiviert. Dies entspricht genau dem Wert, der sich mit Hilfe der Parameter der Regressionsgeraden in Abbildung 12 berechnen lässt.

Bei in der Schweiz angewandten Pasteurisationsbedingungen von 57 °C und 6 Minuten Haltezeit erfolgt eine Inaktivierung um 65,7%. Bei Proben mit Aktivitäten zwischen 18,7 und 41,1 U l^{-1}, wie sie in den industriell hergestellten Eiweissmassen bestimmt wurden (Tabelle 2), waren nach einer entsprechenden Hitzebehandlung noch Restaktivitäten von 6,4 bis 14,1 U l^{-1} nachweisbar. Damit lag letzterer Wert nur wenig unter der niedrigsten in unpasteurisierten Eiweissmassen erfassten Aktivität von 18,7 U l^{-1}.

Um die unterschiedlichen Aktivitäten in unbehandelten Eiweissmassen zu berücksichtigen, schlagen *Stadelman* und *Cotterill* (13) vor, für die Kontrolle der ausreichenden Erhitzung von Eiweiss Katalase-Aktivitätsmessungen vor und nach der Pasteurisation durchzuführen.

α-Amylase

In vorangegangenen Untersuchungen (24) wurde nachgewiesen, dass die α-Amylase-Aktivität in Eigelb mehr als 30fach höher ist als in Eiweiss. Da in Eiweiss von frischen, einen Tag alten Eiern oft höhere Aktivitäten als in älteren Eiern bestimmt wurden (15), ist es wenig wahrscheinlich, dass die α-Amylase mit zunehmendem Alter der Schaleneier aus der Eigelbfraktion ins Eiweiss diffundiert. Hingegen besteht die Möglichkeit, dass bei nicht genügend sorgfältiger Trennung von Eiweiss und Eigelb die α-Amylase-Aktivität in Eiweiss infolge Verunreinigung mit Eigelb erhöht wird. Eigelbkontaminationen von 0,03%, wie sie von der eiweissverarbeitenden Industrie noch toleriert werden (13, 18), verursachen aber nur geringfügig höhere Aktivitätswerte in Eiweiss. Sie liegen innerhalb der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Phadebas-Methode von 4,8 bis 7,2% (24).

Ein Vergleich der D-Werte der α-Amylasen in Eiweiss, Vollei und Eigelb in Tabelle 3 lässt in Eiweiss eine um mehr als 40- bzw. 60fach geringere Hitzeresistenz als in Vollei bzw. Eigelb erkennen. Möglicherweise ist auch die Inaktivierung der α-Amylase stark vom pH-Wert abhängig und erfolgt mit zunehmenden Werten rascher. Dies würde auch die bereits früher (3) beobachtete, 1,4fach geringere Hitzeresistenz der α-Amylase in Vollei mit einem pH-Wert von 7,6 gegenüber Eigelb mit 6,1 erklären.

Tabelle 3. $D_{60\,°C}$-Werte und z-Werte der α-Amylase, von *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 und *Salmonella senftenberg* 775 W in Eiweiss (pH 9,1), Vollei (pH 7,6) und Eigelb (pH 6,1)

α-Amylase bzw. Testkeime	$D_{60\,°C}$-Werte in Minuten			z-Werte in °C		
	Eiweiss	Vollei	Eigelb	Eiweiss	Vollei	Eigelb
α-Amylase	0,44	18,97	27,54	4,7	4,3	4,3
Testkeime						
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442	0,10	0,25	0,25	7,0	7,1	10,1
Salmonella typhimurium ATCC 13311	0,06	0,24	0,52	5,8	6,2	7,2
Salmonella senftenberg 775 W D_2	0,73	8,13	9,51	5,7	4,7	4,7
D_M	0,59	5,00	6,34	5,5	5,4	5,5

D_2 = D-Wert des zweites Astes der gebrochenen Überlebenskurve
D_M = D-Wert der gesamten Überlebenskurve

Dabei zeigen die D-Werte für Eiweiss mit einem z-Wert von 4,7 °C sowie für Vollei und Eigelb mit z-Werten von 4,3 °C annähernd dieselbe Temperaturabhängigkeit auf.

Die Inaktivierung der α-Amylase in Vollei und Eigelb verlief zwischen 59 und 66 °C bei allen Temperaturen exponentiell (2, 3). Dagegen zeigten die Inaktivierungskurven in Eiweiss nur bei der höchsten untersuchten Temperatur von 60 °C einen exponentiellen, bei 57 und 58,5 °C bereits einen geringfügig von der Linearität abweichenden Verlauf. Bei 54 und 55,5 °C war ein ausgeprägtes Tailing festzustellen und damit eine sichere Inaktivierung der α-Amylase nicht mehr gewährleistet.

Die untere Nachweisgrenze für die Bestimmung der α-Amylase in Eiweiss mit dem Phadebas^R-Amylase-Test entspricht bei der angewandten Test-Charge No. LB 78299 und nach dem von *Jäckle* et al. (15) beschriebenen Bestimmungsansatz einem Wert von 3,08 U l^{-1}. In industriell hergestellten Eiweissmassen wurden vor der Pasteurisation Aktivitäten zwischen 52 und 112 U l^{-1} nachgewiesen bei einem Mittelwert von 76 U l^{-1} (Tabelle 2). Je nach Aktivität in der unbehandelten Masse können also bei Inaktivierung der α-Amylase unter die Nachweisgrenze von 3,08 U l^{-1} Aktivitätsverminderungen um 94,1 bis 97,3% nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Parameter der Regressionsgeraden in Abbildung 12 lassen sich dafür bei 57,2 °C Erhitzungszeiten von 2,08 bis 2,65 Minuten berechnen.

Diese Werte stimmen gut mit dem von *Monsey* und *Jones* (9) angegebenen Wert von 2,5 Minuten überein. Das in Grossbritannien empfohlene Pasteurisationsverfahren für Eiweiss mit Temperatur-Zeit-Bedingungen von 57,2 °C und 2,5 Minuten reicht also aus, um Aktivitäten von rund 90 U l^{-1} unter die Nachweisgrenze zu reduzieren.

Die Anwendung von schweizerischen Pasteurisationsbedingungen mit Haltezeiten von 6 Minuten bei 57 °C bietet ein sehr hohes Mass an Sicherheit für die

Inaktivierung der α-Amylase. Dies konnte auch bei der Kontrolle von 15 unpasteurisierten und pasteurisierten Eiweissmassen jeweils derselben Charge bestätigt werden (Tabelle 2). Nur bei einer Probe wurde bei einer Inaktivierung um 95,4% eine Restaktivität von 3,7 U l^{-1} festgestellt. Da auch die Koloniezahlen der Enterobacteriaceen nicht unter 10 KBE ml^{-1} reduziert wurden, war eine unzureichende Pasteurisation angezeigt. Mit Hilfe der Parameter der Regressionsgeraden in Abbildung 12 lässt sich für eine 95,4%ige Inaktivierung bei konstanter Pasteurisationstemperatur von 57 °C eine Haltezeit von 2,5 Minuten oder bei einer Erhitzungsdauer von 6 Minuten eine Temperatur von 55,2 °C bestimmen.

Hitzeinaktivierung von Bakterien in Eiweiss

Die Eiweissmasse in den Pasteurisationsbeuteln erreichte die eingestellte Temperatur nach etwa 20 Sekunden (2). Bei den beiden ATCC-Stämmen *S. aureus* und *P. aeruginosa* setzte sofort nach Ablauf dieser Aufheizzeit eine exponentielle Inaktivierung ein. Die Kurven von *E. coli, S. typhimurium* und *S. aureus* 150 zeigten dagegen erst nach einer mehr oder weniger ausgeprägten Schulterbildung einen exponentiellen Verlauf. Dies ist immer dann gegeben, wenn Bakterien in Klumpen von zwei oder mehr Zellen vorliegen oder unter Hitzeeinwirkung erst Klumpen bilden und als solche dann kultiviert werden (25, 26). Für die Berechnung der D-Werte wurden daher nur die Werte im exponentiellen Bereich berücksichtigt.

Bei *S. senftenberg* 775 W wurden in Eiweiss ebenso wie früher in Vollei (2) und Eigelb (3) gebrochene Überlebenskurven mit jeweils einem steiler und einem flacher verlaufenden Ast erhalten. Auch bei *S. aureus* 148 verlief die Inaktivierung der Zellen gebrochen exponentiell. Für diese beiden Keime wurden zwei D-Werte, D_2 für den zweiten flacher verlaufenden Ast und D_M für die gesamte Überlebenskurve, bestimmt. Die D_2-Werte waren bei den Temperaturen zwischen 54 und 60 °C mit einem Faktor von 1,1 bis 1,2 nur wenig höher als die entsprechenden D_M-Werte. Damit war in Eiweiss der Unterschied der Hitzeresistenz zwischen resistenten und weniger resistenten Zellen der Gesamtpopulation deutlich geringer als in Vollei und Eigelb, wo die D_2-Werte für *S. senftenberg* 775 W bis 1,7fach höher waren als die D_M-Werte.

S. typhimurium, E. coli, P. aeruginosa

Die beiden ATCC-Stämme von *E. coli* und *S. aureus* hatten in Eiweiss annähernd die gleiche Hitzeresistenz wie *S. typhimurium.*

Corry und *Barnes* (27) und *Garibaldi* et al. (28) ermittelten für *S. typhimurium* in Eiweiss (pH 9,1 bis 9,2) D-Werte von 0,13 Minuten bei 57,8 °C bis 0,64 Minuten bei 54,8 °C. Dies entspricht weitgehend den hier bestimmten Werten von 0,14 bis 0,47 Minuten. Mehr als doppelt so hohe D-Werte lassen sich dagegen aus den experimentellen Angaben von *Kline* et al. (29) bzw. *Cotterill* (12) berechnen.

Während *P. aeruginosa* in Eigelb deutlich empfindlicher war als *S. typhimurium* und *S. aureus* (3), zeigt derselbe Stamm in Eiweiss eine etwas grössere Hitzeresistenz.

S. senftenberg

In den zahlreichen bereits vorliegenden Untersuchungen von Eiprodukten (2, 3, 27, 30–33) wurden für den hitzeresistenten Stamm 775 W von *S. senftenberg* bis zu 20fach höhere D-Werte als für *S. typhimurium* ermittelt. Die vorliegenden Resultate ergaben in Eiweiss ohne Triethylcitratzusatz 10fach, bei Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat bis 20fach höhere D-Werte.

S. aureus

S. aureus ATCC 25923 hatte eine ähnlich geringe Hitzeresistenz wie der aus Teigwaren isolierte Stamm No. 120, dessen Hitzeinaktivierungskinetik in Vollei (2) und Eigelb (3) bestimmt wurde. Ausserordentlich viel höher war die Hitzeresistenz der Stämme 148 und 150, die beide ebenfalls aus Teigwaren isoliert waren. Für ihre Inaktivierung um eine Zehnerpotenz waren 4- bis 15fach bzw. 10- bis 30fach längere Erhitzungszeiten erforderlich als bei dem ATCC-Stamm 25923.

Einfluss des Triethylcitratzusatzes

Die gram-negativen Testbakterien waren in Eiweiss mit Triethylcitratzusatz insgesamt, das heisst zwischen 1,2- bis 2,7fach weniger hitzeresistent als in Eiweiss ohne diesen Zusatz. Offenbar bewirken bei gram-negativen Bakterien bereits so relativ niedrige Triethylcitrat-Konzentrationen von nur 250 ppm eine Verstärkung der thermischen Schädigungen. Im Gegensatz dazu war die Hitzeresistenz von zwei Stämmen von *S. aureus* in Eiweiss ohne und mit Triethylcitrat praktisch gleich. Vorerst nicht erklärbar ist allerdings, warum beim hitzeresistenten Stamm 150 von *S. aureus* in Eiweiss mit Triethylcitratzusatz eine 1,1- bis 1,4fach höhere Hitzeresistenz als in Eiweiss ohne Triethylcitrat gegeben war. Möglicherweise bewirkt hier das Triethylcitrat sogar eine partielle Stabilisierung von Zellstrukturen.

Substrat-Einfluss

Die Gegenüberstellung der $D_{60\,°C}$-Werte von *P. aeruginosa, S. typhimurium* und *S. senftenberg* 775 W in Eiweiss, Vollei und Eigelb in Tabelle 3 lässt eine wesentlich geringere Hitzeresistenz der Keime in Eiweiss erkennen. Dafür dürfte vor allem der hohe pH-Wert von 9,3 in Eiweiss gegenüber 6,1 und 7,6 in Eigelb bzw. Vollei verantwortlich sein. *Cotterill* (12) hat gezeigt, dass bei einer 3,75 Minuten langen Erhitzung für die Reduktion der Koloniezahlen von Salmonellen normaler Hitzeresistenz um vier Zehnerpotenzen in Eiweiss mit einem pH-Wert von 9,3 eine Temperatur von 54,4 °C, bei Eiweiss mit einem pH-Wert von 7,0 dagegen eine Temperatur von 58,3 °C erforderlich war. Neben dem Einfluss des pH-Wertes dürften auch die mit 12% deutlich geringere Trockenmasse gegenüber 45

bis 48% in Eigelb sowie der in Eiweiss sehr geringe Fettgehalt von 0,03% im Vergleich zu 32 bis 36% in Eigelb für die hohe Hitzeempfindlichkeit der Testkeime in Eiweiss eine Rolle spielen.

Bakterien-Inaktivierungen in industriell hergestellten Eiweissprodukten

Industriell hergestellte Eiweissmassen enthalten in der Regel eine artenreiche Mischflora, die je nach Kontamination der Schaleneier und Aufschlagmaschinen sehr unterschiedlich aus gram-negativen und -positiven Bakterienarten zusammengesetzt sein kann. In den hier untersuchten Proben waren nach drei Minuten Erhitzung bei 57 °C, wodurch eine Reduktion der aeroben mesophilen Keime um 2,2 Zehnerpotenzen erreicht wurde, zu 90% gram-positive Bakterien, vor allem hitzeresistentere Streptokokken, als noch vermehrungsfähige Bakterien nachzuweisen. Die stark sigmoiden Überlebenskurven werden zweifellos durch den anfangs offenbar relativ geringen Anteil der hitzeresistenten gram-positiven Bakterien bestimmt, während die zunächst in sehr hohen Koloniezahlen vorhandenen gram-negativen Bakterien sehr rasch inaktiviert wurden.

Nach Artikel 2 Absatz 2 der eidg. Hygieneverordnung vom 1. Juli 1987 (16) gelten für Eier und Eierkonserven für aerobe und mesophile Keime und *Escherichia coli* Toleranzwerte von 100 000 KBE g^{-1} bzw. 10 KBE g^{-1}. Diese Anforderungen wurden von hier geprüften Pasteurisations-Bedingungen einschliesslich der praxisnahen Erhitzung im Plattenpasteur (Tabelle 2) in allen Fällen erfüllt.

Vergleichbare Resultate liegen von *Wilkin* und *Winter* (34) sowie *Barnes* und *Corry* (35) vor. Nach Erhitzung der Eiweissmassen bei 56,7 °C während 1,6 Minuten wurde dort die Gesamtkeimzahl um mehr als 3 Zehnerpotenzen und die Zahl von Coliformen um mehr als 4 Zehnerpotenzen von $1{,}6 \times 10^4$ auf unter 1 KBE ml^{-1} reduziert. Die Pasteurisation von zwei unterschiedlichen Eiweissmassen bei 57,2 °C während 2,5 Minuten führte zu einer Reduktion der Gesamtkeimzahl um 2,0 bzw. 2,7 Zehnerpotenzen und zur Inaktivierung der Coliformen um mehr als 4,6 bzw. 5,9 Zehnerpotenzen.

Korrelation der Hitzeinaktivierung von Enzymen und Bakterien in Eiweiss

N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase

Die Inaktivierung der N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase um 90% erfordert bei 57 °C je nach pH-Wert (9,1 bis 9,3) und Aktivität in der unbehandelten Masse Erhitzungszeiten von 0,24 bis 0,78 Minuten. Bei diesen Bedingungen werden die hitzeempfindlichen Testkeime *E. coli, S. aureus, S. typhimurium* und *P. aeruginosa* um durchschnittlich 1,4 bis 4,6 Zehnerpotenzen reduziert. Für die resistenteren Stämme 148 und 150 von *S. aureus* und *S. senftenberg* 775 W ist damit lediglich eine Verminderung von 0,1 bis 0,5 Zehnerpotenzen möglich.

Lysozym und Katalase

Bei den Temperaturen zwischen 54 und 60 °C sind für die 90%ige Inaktivierung von Lysozym Erhitzungszeiten von 38 bis 3000 Minuten erforderlich. Diese extremen Bedingungen bewirken selbst bei den hitzeresistenteren Testbakterien ausserordentlich grosse Keimzahlreduktionen von mehr als 50 Zehnerpotenzen.

Für die Reduktion der Katalase-Aktivität auf 10% werden 3,3 bis 50 Minuten benötigt. Bei diesen Bedingungen werden die Zellzahlen der hitzeempfindlichen Testkeime um mehr als 30 bis 100 Zehnerpotenzen reduziert. Für *S. aureus* 148 und *S. senftenberg* 775 W sind dabei Keimzahlreduktionen von 10 Zehnerpotenzen und für *S. aureus* 150 solche von 2 bis 5 Zehnerpotenzen erreichbar. Wie aus Abbildung 12 ersichtlich ist, wird durch derart extreme Hitzebehandlung die Produktequalität infolge Koagulation der Eiweissmasse stark beeinträchtigt.

α-Amylase

Die D-Werte der α-Amylase waren in Eiweiss ohne Triethylcitrat im Durchschnitt 5- bis 15fach und in Eiweiss mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat 9- bis 25fach höher als die entsprechenden D-Werte der hitzeempfindlichen Keime und 1,2fach höher als die D_M-Werte von *S. aureus* 148. Wie der Verlauf der D-Kurven der α-Amylase und des hitzeresistenten Stammes 775 W von *S. senftenberg* in Abbildung 12 B zeigt, wird die Zahl überlebender Bakterien dieses Testkeims in Eiweiss mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat bei Pasteurisationsbedingungen, die eine Inaktivierung der α-Amylase um 90% bewirken, um etwa 1,2 Zehnerpotenzen reduziert. Dagegen ist in Eiweiss ohne Triethylcitrat, worin *S. senftenberg* 775 W eine grössere Hitzeresistenz hatte, nur bei Temperaturen von unter 56 °C eine Keimzahlreduktion von mehr als 90% bzw. einer Zehnerpotenz erreichbar. Bei höheren Temperaturen ist die α-Amylase empfindlicher, so dass nur noch geringere Reduktionen möglich sind. Nur die Zellen von *S. aureus* 150 hatten in Eiweiss sowohl ohne als auch mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat eine grössere Hitzeresistenz als die α-Amylase. Bei Erhitzung der Eiweissmassen für 0,44 Minuten bei 60 °C bis 8,25 Minuten bei 54 °C wurde die α-Amylase zu 90% inaktiviert, die Zellzahl jedoch lediglich um 0,5 bis 0,7 Zehnerpotenzen bzw. zu 70 bis 80% reduziert.

Konsequenzen für die Praxis

Infolge der relativ raschen Hitzedenaturierung der Eiweissproteine bei pH-Werten von mehr als 9,0 ist eine effektive Pasteurisation nur in einem engen Bereich von Temperatur und Zeit-Kombinationen möglich. Bei in der Praxis empfohlenen und angewandten Pasteurisationsbedingungen (Tabelle 4) sind in der hitzebehandelten Eiweissmasse noch Restaktivitäten der Katalase von 32 bis 69% und von Lysozym von 96 bis 98% nachweisbar.

Unter normalen Temperatur-Zeit-Bedingungen, die das Produkt thermisch nicht zu stark belasten, ist die Überprüfung der ausreichenden Pasteurisation durch Kontrolle der Lysozym-Aktivität nicht geeignet. Ebensowenig ist mit der

Bestimmung der Katalase-Aktivität allein im pasteurisierten Produkt eine zuverlässige Aussage über eine erfolgte Pasteurisation möglich. Hierzu wären Aktivitätsmessungen vor und nach der Hitzebehandlung der Eiweissmassen notwendig, was aber in der Praxis zu arbeitsaufwendig ist. Damit ist auch der Katalase-Test für die routinemässige Kontrolle der Pasteurisation wenig geeignet.

Dagegen ist die Bestimmung der α-Amylase-Aktivität mit dem Phadebas^R-Amylase-Test für den Pasteurisationsnachweis auch bei Eiweiss geeignet. Allerdings ist seine Anwendung auf höhere Temperaturen beschränkt, da bei Temperaturen von 54 und 55,5 °C der Verlauf der Inaktivierungskurven bei längerer Erhitzung stark von der Linearität abweicht. Nach Erhitzen der Eiweissmasse bei in der Praxis üblichen Temperaturen zwischen 56,7 und 57,2 °C (Tabelle 4) erfolgt eine sichere Inaktivierung der α-Amylase unter die für Eiweiss methodisch festgesetzte Nachweisgrenze des Phadebas^R-Amylase-Tests (15) von 3,08 U l^{-1}. Bei einer durchschnittlichen Aktivität von 76 U l^{-1} in industriellen Eiweissmassen (15) wird die einer Restaktivität von 4,1% entsprechende Nachweisgrenze bei 57 °C nach 2,6 Minuten Erhitzung erreicht. Diese Temperatur-Zeit-Bedingungen führen zu einer Reduktion der Keimzahl von Salmonellen normaler Hitzeresistenz, hier am Beispiel von *S. typhimurium* gezeigt, um 13 Zehnerpotenzen in Eiweiss ohne Triethylcitrat und um mehr als 30 Zehnerpotenzen in Eiweiss mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat. Unter der Voraussetzung, dass ein Produkt mit 10^5 Keimen ml^{-1} von Salmonellen gewöhnlicher Hitzeresistenz, also ohne *S. senftenberg* 775 W, kontaminiert ist (2), genügen diese Heisshalteverfahren bei weitem zur Erfüllung der von der eidg. Hygieneverordnung (16) gestellten Anforderungen, wonach Salmonellen «in 20 Gramm nicht nachweisbar» sein dürfen, sowie dem von der FAO/WHO (36) vorgeschlagenen 2-Klassen-Plan, nachdem bei insgesamt 30 Proben einer Charge in jeweils 20 bis 25 Gramm keine Salmonellen nachweisbar sein dürfen.

Die Verminderung der Keimzahlen von *S. typhimurium* und *S. senftenberg* 775 W bei 57 °C während 2,6 Minuten ist ähnlich wie diejenige bei Anwendung von amerikanischen und britischen Pasteurisationsverfahren mit Temperatur-Zeit-Bedingungen von 56,7 °C und 3,5 Minuten bzw. 57,2 °C und 2,5 Minuten (11).

Dagegen bewirkt die Eiweisspasteurisation bei 57 °C während 6 Minuten, wie sie in der Schweiz durchgeführt wird, eine bis zweifach so hohe Zellzahlverminderung der geprüften Salmonellenstämme. Diese Bedingungen sind für die Erhitzung von Eiweiss als extrem zu beurteilen, weil infolge Koagulation die Produktequalität beeinträchtigt wird. Zudem werden dadurch die aeroben mesophilen Keime im Vergleich zu den wesentlich kürzeren Haltezeiten von 2,6 und 3,5 Minuten um lediglich 0,6 bzw. 0,4 Zehnerpotenzen mehr reduziert. Die Pasteurisation von Eiweiss bei 57 °C während 3 bis höchstens 3,5 Minuten bewirkt eine genügend grosse Inaktivierung von Salmonellen normaler Hitzeresistenz und Enterobacteriaceen und gibt damit ein ausreichendes Mass an hygienischer Sicherheit.

Im Hinblick auf die Erhaltung der funktionellen Eigenschaften von Eiweiss sollte deshalb bei Erhitzung der Eiweissmasse bei 57 °C die Heisshaltezeit von 3,5 Minuten nicht überschritten werden. Dies würde sich auch positiv auf den

zeitlichen Ablauf im Betrieb auswirken. Bei einer Tagesproduktion von mehr als einer Tonne Eiweiss kann die bei der Pasteurisation eingesparte Zeit für häufigere Zwischenreinigungen der Pasteurisationsanlage genutzt werden. Dadurch wird die Beschichtung der Pasteurisationsplatten mit koaguliertem Eiweiss vermindert und somit die Wärmeübertragung verbessert. Da bei dieser Temperatur-Zeit-Kombination die α-Amylase sicher unter die festgelegte Nachweisgrenze inaktiviert wird, ist der Phadebas^{R}-Amylase-Test – bei gleicher Inkubationstemperatur, aber unterschiedlichen Testvorschriften – zum Nachweis der ausreichenden Erhitzung ebenso wie bei Vollei und Eigelb auch bei Eiweiss anwendbar.

Tabelle 4. Theoretische Reduktionswerte der Keimzahlen (in Zehnerpotenzen) von *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Salmonella senftenberg* 775 W (Berechnungsgrundlage: D_M-Werte), aeroben mesophilen Keimen und Enterobacteriaceen sowie Restaktivitäten von Lysozym, Katalase und α-Amylase (in %) bei in der Praxis angewandten Pasteurisationsbedingungen

	TEC	In der Praxis angewandte und empfohlene Temperatur-Zeit-Bedingungen zur Pasteurisation von Eiweiss				
	250 ppm	56,7 °C 3,5 min USA a)	57 °C 2,6 min b)	57 °C 3,5 min c)	57 °C 6,0 min CH	57,2 °C 2,5 min GB a)
Enzym-Restaktivitäten in %						
α-Amylase	+/–	2,4	4,1	1,3	0,1	3,4
Katalase	+/–	56,3	61,3	51,8	32,4	59,8
Lysozym	+/–	98,0	98,2	97,6	95,9	98,0
Reduktion der vermehrungsfähigen Zellen in Zehnerpotenzen von						
Salmonella typhimurium	–	15,9	13,3	17,9	30,7	13,9
ATCC 13311	+	39,3	33,0	44,6	76,4	34,6
Salmonella senftenberg 775 W	–	1,58	1,33	1,79	3,06	1,39
	+	2,08	1,77	2,39	4,09	1,87
aerobe mesophile Keime *)	+		2,2	2,4	2,8	
Enterobacteriaceen *)	+		3,3	>3,3	>3,3	

+/– Eiweiss mit (+) bzw. ohne (–) Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat (TEC).
a) *Elliott* und *Hobbs* (11)
b) Temperatur-Zeit-Bedingungen zur Reduktion der α-Amylase-Aktivität von 76 U l^{-1} bis zur Nachweisgrenze von 3,08 U l^{-1}
c) für die Schweiz hier empfohlene Pasteurisationsbedingungen
*) aus den Abbildungen 13 und 14

Zusammenfassung

Es wurde die Kinetik der Hitzeinaktivierung von vier Enzymen und sieben Testkeimen in Hühner-Eiweiss ohne und mit Zusatz von 250 ppm Triethylcitrat sowie der Bakterien in industriellen Eiweissmassen vergleichend bestimmt.

Die N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase wurde bei 57 °C innerhalb von weniger als einer Minute um mehr als 90% inaktiviert ($D_{57\,°C}$ = 0,24 – 0,78 min). Die Aktivitäten von Lysozym ($D_{57\,°C}$ = 336 min) und Katalase ($D_{57\,°C}$ = 12,9 min) waren ohne Schädigung des Produktes nicht ausreichend zu verringern. Bei 57 °C wurde die α-Amylase in Eiweissmassen ($D_{57\,°C}$ = 1,9 min) mit Aktivitäten von durchschnittlich 76 U l^{-1} in 2,6 Minuten auf die festgelegte Nachweisgrenze des Phadebas^R-Amylase-Tests von 3,08 U l^{-1} vermindert. Bei diesen Pasteurisationsbedingungen werden *Salmonella senftenberg* 775 W ($D_{57\,°C}$ = 1,4–2,08), *Staphylococcus aureus* 148 und 150 ($D_{57\,°C}$ = 1,57 bzw. 3,06) um 1 bis 2 Zehnerpotenzen und *S. typhimurium* ATCC 13311 ($D_{57\,°C}$ = 0,1–0,19 min), *S. aureus* ATCC 25923 ($D_{57\,°C}$ = 0,2 min), *Pseudomonas aeruginosa,* ATCC 15442 ($D_{57\,°C}$ = 0,14–0,26 min) und *Escherichia coli* (ATCC 25992 ($D_{57\,°C}$ = 0,17 min) um mehr als 10 Zehnerpotenzen reduziert.

Die Pasteurisation von Eiweiss bei 57 °C während 3,5 Minuten bietet ein hohes Mass an hygienischer Sicherheit und ist durch Bestimmung der α-Amylase-Aktivität mit der Phadebas^R-Methode gut kontrollierbar.

Résumé

La cinétique de l'inactivation thermique des enzymes N-acétyle-ß-D-glucosaminidase, lysozyme, catalase, α-amylase et de 7 micro-organismes dans le blanc d'œuf de poule avec et sans addition de 250 ppm de citrate de triéthyle, a été déterminée par comparaison avec celle des bactéries présentes dans les masses de blanc d'œuf industrielles.

A 57 °C, l'activité de la N-acétyl-ß-D-glucosaminidase ($D_{57\,°C}$ = 0,24–0,78 min) a diminué en moins d'une minute de plus de 90%. Celle de la lysozyme ($D_{57\,°C}$ = 336 min) et celle de la catalase ($D_{57\,°C}$ = 12,9 min) n'ont pu être réduites sans détérioration du produit. A une température de 57 °C, l'α-amylase dans les masses de blanc d'œuf ($D_{57\,°C}$ = 1,9 min) avec une activité moyenne de 76 U l^{-1} a été réduite en 2,6 minutes à la limite de détection du Phadebas^R-amylase test de 3,08 U l^{-1}. Dans ces conditions de pasteurisation, *Salmonella senftenberg* 775 W ($D_{57\,°C}$ = 1,4–2,08), *Staphylococcus aureus* 148 et 150 ($D_{57\,°C}$ = 1,57 et 3,06 min) ont été réduits d'une à deux puissances de dix, *S. typhimurium* ATCC 13311 ($D_{57\,°C}$ = 0,1–0,19 min), *S. aureus* ATCC 25923 ($D_{57\,°C}$ = 0,2 min) *Pseudomonas aeruginosa,* ATCC 15442 ($D_{57\,°C}$ = 0,14–0,26 min) et *Escherichia coli* ATCC 25992 ($D_{57\,°C}$ = 0,17 min) de plus de dix puissances de dix.

La pasteurisation du blanc d'œuf à 57 °C pendant 3,5 minutes offre une garantie sérieuse de sécurité hygiénique et se laisse bien contrôler par la détermination de l'activité de l'α-amylase au moyen du test Phadebas^R.

Summary

The kinetics of inactivation of N-acetyl-ß-D-glucosaminidase, lysozyme, catalase, α-amylase and seven test organisms in egg white, with and without addition of 250 ppm triethylcitrate, as well as bacteria in industrial bulk egg white, were determined.

At 57 °C the activity of N-acetyl-ß-D-glucosaminidase was reduced by more than 90% within less than a minute ($D_{57\,°C}$ = 0.24–0.75 min). The activities of lysozyme ($D_{57\,°C}$ =

336 min) and catalase ($D_{57\,°C}$ = 12.9 min) could not be effectively inactivated without adversely affecting the product. At 57 °C, the α-amylase in egg white ($D_{57\,°C}$ = 1.9 min) with activities of an average of 76 U l^{-1} could be reduced in 2.6 min to the lower detection limit of the Phadebas^R-amylase test of 3.08 U l^{-1}. Under these conditions, *Salmonella senftenberg* 775 W ($D_{57\,°C}$ = 1.4–2.08) and *Staphylococcus aureus* 148 and 150 ($D_{57\,°C}$ = 1.57 and 3.06) as well as *S. typhimurium* ATCC 13311 ($D_{57\,°C}$ = 0.1–0.19 min), *S. aureus* ATCC 25923 ($D_{57\,°C}$ = 0.2 min), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 ($D_{57\,°C}$ = 0.14–0.26 min) and *Escherichia coli* ATCC 25923 ($D_{57\,°C}$ = 0.17 min) were reduced by 1 to 2 or over 10 log cycles respectively.

Pasteurization of egg white at 57 °C for 3.5 minutes offers a reliable measure of hygienic safety, and is moreover easily checked by means of the simple and practical Phadebas^R-test.

Literatur

1. Eidg. Lebensmittelverordnung vom 26. Mai 1936 (Stand am 1. 1. 1983), Kapitel 16, Eier und verarbeitete Eier, Artikel 174, Absatz 3. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1982.
2. *Jäckle, M., Geiges, O.* und *Schmidt-Lorenz, W.:* Hitzeinaktivierung von Alpha-Amylase, *Salmonella typhimurium, Salmonella senftenberg* 775 W, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* in Vollei. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **78**, 83–105 (1987).
3. *Jäckle, M., Geiges, O.* und *Schmidt-Lorenz, W.:* Untersuchungen über die Hitzeinaktivierung von alkalischer Phosphatase, Alpha-Amylase, *Salmonella typhimurium, Salmonella senftenberg* 775 W, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* in Eigelb. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **79**, 69–89 (1988).
4. *Lineweaver, H., Morris, J., Kline, L.* and *Bean, R. S.:* Enzymes of fresh hen eggs. Arch. Biochem. **16**, 443–472 (1948).
5. *Lush, I. E.* and *Conchie, J.:* Glycosidases in the egg albumen of the hen, the turkey and the japanese quail. Biochim. Biophys. Acta **130**, 81–86 (1966).
6. *Henderson, A. E.* and *Robinson, D. S.:* Effect of heat pasteurization on some egg white enzymes. J. Sci. Food Agric. **20**, 755–760 (1969).
7. *Donovan, J. W.* and *Hansen, L. U.:* ß-N-Acetylglucosaminidase activity of egg white. 1. Kinetics of the reaction and determination of the factors affecting the stability of the enzyme in egg white. J. Food Sci. **36**, 174–177 (1971).
8. *Imai, C.:* Alpha-amylase test as a method for distinguishing umpasteurized egg products from pasteurized products. Poultry Sci. **58**, 815–823 (1979).
9. *Monsey, J. B.* and *Jones, J. B.:* A simple, enzymatic test for monitoring the efficient thermal pasteurization of chicken egg white. J. Food Technol. **14**, 381–388 (1979).
10. *Donovan, J. W.* and *Hansen, L. U.:* ß-N-Acetylglucosaminidase activity of egg white. 2. Heat inactivation of the enzyme in egg white and whole egg. J. Food Sci. **36**, 178–181 (1971).
11. *Elliott, R. P.* and *Hobbs, B. C.:* Egg and egg products. In: ICMSF – Microbial ecology of foods. Vol. II, Food commodities, p. 521–566. Academic Press, London 1980.
12. *Cotterill, O. J.:* Equivalent pasteurization temperatures to kill salmonellae in liquid egg white at various pH levels. Poultry Sci. **47**, 354–365 (1968).
13. *Stadelman, W.* and *Cotterill, O. J.:* Egg science and technology, 3rd ed. Avi Publ. Co., New York 1986.

14. Verordnung über die in Lebensmitteln zulässigen Zusatzstoffe (Zusatzstoffverordnung) vom 20. Januar 1982. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1982.
15. *Jäckle, M., Amado, R.* und *Schmidt-Lorenz, W.:* Bestimmung der Aktivitäten von N-Acetyl-ß-D-glucosaminidase, Lysozym, Katalase und α-Amylase in Hühnereier-Eiweiss. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **88**, 137–161 (1989).
16. Verordnung über die hygienisch-mikrobiologischen Anforderungen an Lebensmittel, Gebrauchs- und Verbrauchsgegenstände (Hygieneverordnung) vom 1. Juli 1987. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1987.
17. *Winn, S. E.* and *Ball, H. R.:* ß-N-Acetylglucosaminidase activity of the albumen layers and membranes of the chicken's egg. Poultry Sci. **54**, 799–805 (1975).
18. *Kiefer, H.:* Mikrobiologie der Eier und Eiprodukte. Arch. Lebensm. Hyg. **27**, 197–232 (1976).
19. *Müller, O.:* Grundlagen der Biochemie I. Biochemische Reaktionen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1977.
20. *Lehninger, A. L.:* Biochemie. Verlag Chemie, Weinheim – New York 1979.
21. *Cunningham, F. E.* and *Lineweaver, H.:* Stabilization of egg white proteins to pasteurizing temperatures above 60 °C. Food Technol. **19**, 1442–1447 (1965).
22. *Cunningham, F. E.* and *Lineweaver, H.:* Inactivation of lysozyme by native ovalbumin. Poultry Sci. **46**, 1471–1477 (1967).
23. *Kato, A., Wakinaga, T., Matsudomi, N.* and *Kobayashi, K.:* Changes in lysozym content during egg white thinning. Agric. Biol. Chem. **42**, 175–176 (1978).
24. *Jäckle, M.* und *Geiges, O.:* Bestimmung der Alpha-Amylase-Aktivität in Vollei und Eigelb mit dem Phadebas[R]-Amylase-Test. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **77**, 420–434 (1986).
25. *Stumbo, C. R.:* Thermobacteriology in food processing, 2nd ed. Academic Press, New York – London 1973.
26. *Frank, H. K.:* Mikrobiologische Unterlagen zur Hitzesterilisation. In: Fricker, A. und Eyer, H., Hitzesterilisierung und Werterhaltung von Lebensmitteln, Band 21, p. 73–89. Verlag Steinkopf, Darmstadt 1971.
27. *Corry, J. E. L.* and *Barnes, E. M.:* The heat resistance of salmonellae in egg albumen. British Poultry Sci. **9**, 253–260 (1968).
28. *Garibaldi, J. A., Straka, R. P.* and *Ijichi, K.:* Heat resistance of salmonella in various egg products. Appl. Microbiol. **17**, 491–496 (1969).
29. *Kline, L., Sugihara, T. F.* and *Ijichi, K.:* Further studies on heat pasteurization of raw liquid egg white. Food Technol. **20**, 98–100 (1966).
30. *Winter, A. R., Stewart, G. F., McFarlane, V. H.* and *Solowey, M.:* Pasteurization of liquid egg products. III. Destruction of salmonellae in liquid whole egg. Am J. Publ. Hlth. **36**, 451–460 (1946).
31. *Anellis, J., Lubas, J.* and *Rayman, M. M.:* Heat resistance in liquid eggs of some strains of the genus *Salmonella.* Food Res. **19**, 377–395 (1954).
32. *Osborne, W. W., Straka, R. P.* and *Lineweaver, H.:* Heat resistance of *Salmonella* in whole egg, egg yolk, and egg white. Food Res. **19**, 451–463 (1954).
33. *Davidson, S. M., Boothroyd, M.* and Georgala, D. L.: Thermal resistance of *Salmonella senftenberg.* Nature, London **212**, 1060–1061 (1966).
34. *Wilkin, M.* and *Winter, A. R.:* Pasteurization of egg yolk and white. Poultry Sci. **26**, 136–142 (1969).
35. *Barnes, E. M.* and *Corry, J. E. L.:* Microbal flora of raw and pasteurized egg albumen. J. Appl. Bact. **32**, 193–205 (1969).

36. *Food and Agriculture Organization / World Health Organization* (FAO/WHO): Microbiological specifications for foods. Expert Consultation, EC/Microbial/75/Report 1. FAO, Rome 1975.

Prof. Dr. W. Schmidt-Lorenz
Laboratorium für Lebensmittel-Mikrobiologie
Institut für Lebensmittelwissenschaft
ETH-Zentrum
CH-8092 Zürich