

# **Hitzeinaktivierung von Alpha-Amylase, Salmonella typhimurium, Salmonella senftenberg 775 W, Pseudomonas aeruginosa und Staphylococcus aureus in Vollei = Thermal inactivation of alpha-amylase, salmonella typhimurium, salmonella senftenberg 775 W, pseudom...**

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

Objektyp: Article

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

Band (Jahr): **78 (1987)**

Heft 1

PDF erstellt am: **14.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982978>

## **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.

## Hitzeinaktivierung von Alpha-Amylase, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella senftenberg* 775 W, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* in Vollei

Thermal Inactivation of Alpha-Amylase, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella senftenberg* 775 W, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in whole Egg

Margrit Jäckle, O. Geiges und W. Schmidt-Lorenz

Institut für Lebensmittelwissenschaft, Eidg. Technische Hochschule, Zürich

### Einleitung

Hauptgrund für die Hitzebehandlung von flüssigen Eiprodukten ist die Erfüllung der Forderung nach gesundheitlich unbedenklichen Produkten. Möglicherweise auf oder in Schaleneiern vorhandene pathogene Bakterien, wie insbesondere Salmonellen, die beim Aufschlagen der Eier die Eimasse kontaminieren, müssen durch die Pasteurisation sicher eliminiert werden. Gleichzeitig wird damit die Zahl der vorhandenen saprophytischen Bakterien reduziert und dadurch die Haltbarkeit der Produkte verlängert.

Heller et al. (1) empfehlen für britische Pasteurisationsbetriebe die Erhitzung der Eimasse bei 64,4 °C während 2,5 Minuten. *Salmonella typhimurium*, eine in Hühnereiern häufiger vorkommende Salmonellenart, wird dabei zahlenmässig stark reduziert. Brooks (2) und Shrimpton et al. (3) konnten zeigen, dass die von Heller et al. (1) vorgeschlagenen Prozessbedingungen ausreichen, um die Alpha-Amylase-Aktivität in Vollei unter die Nachweisgrenze der von ihnen angewandten amyloklastischen Methode zu senken. Sie werten deshalb die Abwesenheit von Alpha-Amylase-Aktivität als Nachweis einer ausreichenden Erhitzung.

In den USA ist seit 1966 die Pasteurisation von Eiprodukten zwingend vorgeschrieben (Stadelman und Cotteril (4)). Nach den Vorschriften des U.S. Depart-

ment of Agriculture (5) muss flüssiges Vollei im Plattenpasteur während 3,5 Minuten bei 60 °C gehalten werden.

Nach Artikel 174 Absatz 3 der eidg. Lebensmittelverordnung (6) dürfen «Ei-produkte als pasteurisiert bezeichnet werden, wenn das angewandte Hitzeverfahren alle vegetativen pathogenen Keime abgetötet hat». Dies soll dann der Fall sein, wenn durch die Hitzebehandlung bei der Volleimasse die Alpha-Amylase inaktiviert wird. Die schweizerische Gesetzgebung stützt sich offensichtlich auf die Argumente von *Heller et al.* (1) sowie *Shrimpton et al.* (3), vermeidet es aber, die Pasteurisationsbedingungen näher zu spezifizieren.

Wenn von der allgemeinen Erfahrung ausgegangen wird, dass die Hitzeinaktivierung sowohl von Enzymen als auch von vegetativen Mikroorganismen in der Regel nach einer Reaktion erster Ordnung verläuft, so ergeben sich daraus folgende Konsequenzen:

1. Die zur Inaktivierung einer gegebenen Alpha-Amylase-Aktivität erforderlichen Pasteurisationsbedingungen werden zunächst von der Empfindlichkeit der Nachweismethode bestimmt. Das Schweizerische Lebensmittelbuch (7) hat die amyloklastische Methode von *Shrimpton et al.* (3) als Referenzmethode übernommen. Diese als relativ aufwendig geltende Methode wurde von *Jäckle und Geiges* (8) mit dem Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test verglichen. Dieser Test ist im Handel erhältlich und erlaubt die rasche und einfache Bestimmung der Alpha-Amylase-Aktivität in Vollei. Die untere Nachweisgrenze der Phadebas<sup>R</sup>-Methode liegt in derselben Grössenordnung wie die der amyloklastischen Referenzmethode.
2. Weil die Alpha-Amylase-Aktivität in Vollei natürlichen Schwankungen unterliegt, müssen die Temperatur-Zeit-Bedingungen so ausgelegt sein, dass die Alpha-Amylase auch bei erhöhten Aktivitäten bis unter die Nachweisgrenze der gewählten Messmethode inaktiviert wird.
3. Da die Hitzeinaktivierung von vegetativen Mikroorganismen in der Regel exponentiell verläuft, ist eine Forderung nach absoluter Abwesenheit von pathogenen Bakterien nach der Pasteurisation praktisch nicht erfüllbar. Es ist aber zu fordern, dass bei Pasteurisationsbedingungen, bei denen die Inaktivierung der Alpha-Amylase gesichert ist, eine grösstmögliche Keimzahlreduktion der vorhandenen pathogenen Bakterien erfolgt. Dabei wird der Pasteurisationseffekt vor allem von zwei Faktoren bestimmt: dem Kontaminationsgrad des Ausgangsmaterials einerseits und der spezifischen Hitzeresistenz der vorhandenen Mikroorganismen andererseits.

Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die Bestimmung der Parameter für die Hitzeinaktivierung der Alpha-Amylase in Vollei bis zur Nachweisgrenze des Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Tests in der Modifikation nach *Jäckle und Geiges* (8). Danach wurde die Kinetik der Hitzeinaktivierung und damit die spezifische Hitzeresistenz von vier potentiell pathogenen, vegetativen Bakterien in Vollei bestimmt.

Die Korrelation zwischen Hitzeinaktivierungswerten der Alpha-Amylase und der Testbakterien erlaubte dann eine kritische Beurteilung der Eignung des Alpha-Amylase-Tests als Nachweis für eine erfolgreiche Hitzepasteurisation von Vollei.

## 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 Eimasse durch manuelles Aufschlagen von je 5 Schaleneiern
- Homogenisation der Volleimasse mit Ultra-Turrax-Stabmixer während 20 Sekunden bis 20 000 rpm.

### *Testbakterien*

- *Salmonella typhimurium* ATCC 13311
- *Salmonella senftenberg* 775 W NCTC 9959
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25442
- *Staphylococcus aureus* No. 120 (Labor für Lebensmittelmikrobiologie ETH-Zürich; isoliert aus Teigwaren)

### *Pasteurisationsverfahren*

Hitzebehandlung der Eimassen in Pasteurisationsbeuteln nach der Methode von *Erdsieck* und *Beumer* (9):

- Herstellung von Pasteurisationsbeuteln der Innenmasse 35 × 70 mm aus sterilisierfähigem Aluminiumverbundmaterial (Robert Victor Neher AG, Kreuzlingen) mit folgendem Aufbau:  
Aussenseite: 19 µm Polyesterfolie  
                  4 gm<sup>-2</sup> Kaschierkleber  
                  10 µm Alu-Folie  
                  4 gm<sup>-2</sup> Kaschierkleber  
                  12 µm Polyesterfolie  
                  4 gm<sup>-2</sup> Kaschierkleber  
Innenseite: 75 µm Polypropylenfolie
- Sterilisation der Beutel im Autoklaven während 15 Minuten bei 121 °C
- Abfüllung von 2 ml Eimasse pro Beutel
- Verschweissung der Beutel mit Impulsschweissgerät (Henri Haffner, Zürich, Typ KS 200)
- Pasteurisation der Eimassen durch Eintauchen der zugeschweissten Beutel mittels speziellen Haltevorrichtungen ins Wasserbad eines Ultrathermostaten bei konstanten Temperaturen (+/– 0,1 °C) zwischen 58,5 °C und 66 °C
- Überwachung der Temperatureinstellung mit Eichthermometer

- Hin- und Herbewegen der Beutel im Wasser während der ersten 20 Sekunden der Hitzebehandlung
- Entnahme der Pasteurisationsbeutel aus dem Wasserbad nach unterschiedlich langen Haltezeiten und sofortige Kühlung in Eiswasser.

#### *Temperaturmessungen zur Ermittlung der Aufheizzeit*

- Fixierung von je einem Thermoelement, «Thermocoax» (Typ ABAC 10, Durchmesser = 1 mm, Sodern AG) in der Mitte des Wasserbades und der mit Eimasse gefüllten Pasteurisationsbeutel
- Registrierung des Temperaturverlaufes nach Einbringen der Pasteurisationsbeutel ins Wasserbad mit Kompensations-Punktdrucker (Philips, Typ PM 9832) mit einem Messbereich von 0 °C bis 100 °C; vor jeder Messreihe Eichung bei 20 °C und 60 °C.

#### *Bestimmung der Alpha-Amylase-Aktivität in Vollei*

- Vor und nach Hitzebehandlung Überführung des Beutelinhaltes in Reagenzgläser
- Bestimmung der Alpha-Amylase-Aktivität in Vollei mit dem Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test (Pharmacia, Batch No IH 75740) nach *Jäckle* und *Geiges* (8).

#### *Beimpfung der Eimasse und Koloniezahlbestimmung*

- Beimpfung von 100 g Vollei mit 1 ml Kulturlösung nach zweimaliger 24 h Vorkultur bei 37 °C in Brain-Heart-Infusion (BHI) (Difco 0037-01-6)
- Abfüllung von je 2 ml beimpfter Eimasse in sterile Pasteurisationsbeutel
- Vor und nach Hitzebehandlung Auswaage von 1 g Eimasse aus den Pasteurisationsbeuteln in Reagenzgläser
- Zugabe von 1 ml Verdünnungslösung (0,9% NaCl, 0,1% Tryptone) und gute Durchmischung während 1 Minute auf dem Reagenzglasschüttler (Vortex-Genie) (= Verdünnungsstufe  $5 \times 10^{-1}$ )
- Ansatz von dezimalen Verdünnungsreihen
- Beimpfung von zwei parallelen BHI-Agarplatten im Oberflächenausstrichverfahren
- Auswertung nach 24 h Bebrütung bei 37 °C und Bestimmung des gewogenen Mittelwertes der koloniebildenden Einheiten pro g (= KBE g<sup>-1</sup>).

#### *Auswertung der ermittelten Daten*

- Vor und nach Erhitzung der Eimassen bei konstanter Temperatur und unterschiedlich langen Pasteurisationszeiten Bestimmung der noch vorhandenen Enzymrestaktivitäten und der Koloniezahlen pro Gramm Vollei

- Auftragung der Enzymrestaktivitäten bzw. der Zahl KBE g<sup>-1</sup> in logarithmischem Massstab gegen die Zeit
- Ermittlung der *D-Werte* (dezimale Reduktionszeiten, d. h. die Zeit in Minuten bei einer gegebenen Temperatur, in welcher 90% der Enzymaktivität bzw. der Testbakterien inaktiviert werden) und der *z-Werte* (Temperaturerhöhung in °C, die notwendig ist, um die dezimalen Reduktionszeiten [D-Werte] um 90% zu reduzieren) mittels linearer Regression.

Ansatz der Regressionsgeraden:

$$y = a + b x$$

- *D-Wert*:  $y = \log [\text{Alpha-Amylase-Aktivität}]$  bzw.  $\log (\text{KBE g}^{-1})$   
 $x = \text{Pasteurisationszeit (min)}$
- *z-Wert*:  $y = \log (\text{D-Wert})$   
 $x = \text{Pasteurisationstemperatur (}^\circ\text{C)}$

Parameter der Regressionsgeraden:

- $a =$  Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse
- $b =$  Steigung der Regressionsgeraden
- $r(n) =$  Korrelationskoeffizient  
 ( $n =$  Anzahl der Merkmalspaare); gibt den linearen Zusammenhang zwischen den ermittelten Merkmalspaaren ( $x/y$ ) an

## Resultate

### *Aufheizzeit der Eimasse in den Pasteurisationsbeuteln*

In Abbildung 1 sind die beim Beutelverfahren ermittelten Aufheizkurven für 2 ml Volleimasse im Pasteurisationsbeutel nach Eintauchen ins Wasserbad des Ultrathermostaten bei den Pasteurisationstemperaturen von 58,5 °C und 66 °C dargestellt. Es sind Mittelwertkurven von jeweils 5 Parallelbestimmungen. Bei den übrigen Pasteurisationstemperaturen von 60 °C, 61,5 °C, 63 °C und 64,5 °C zeigten die Aufheizkurven den entsprechenden, zunächst steilen, dann langsamer angeglichenen Verlauf.

Bei allen geprüften Pasteurisationstemperaturen erreichte die Eimasse in den Pasteurisationsbeuteln die Endtemperatur nach 18 bis 20 Sekunden. Die um ein Grad niedrigere Temperatur wurde bereits nach 11 bis 13 Sekunden erreicht.

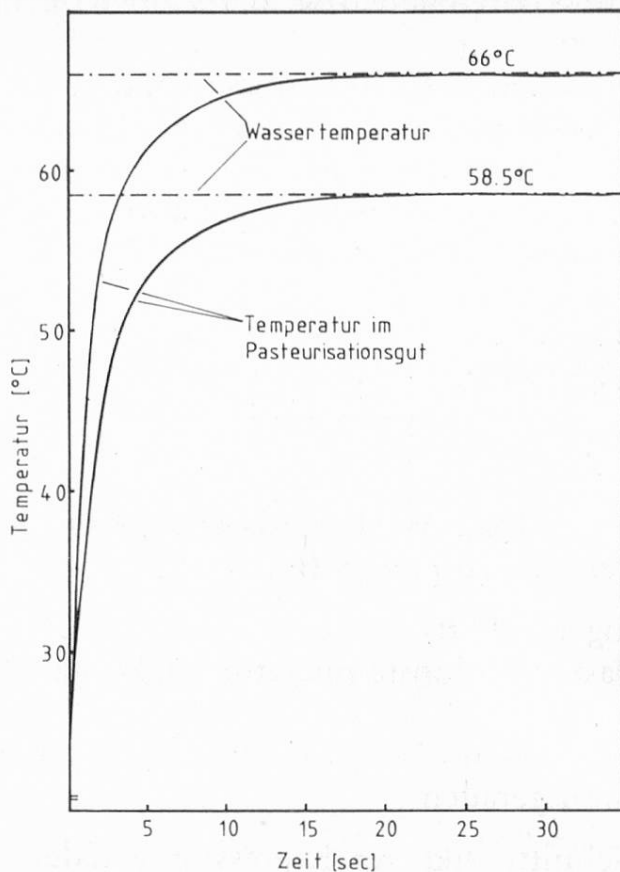


Abb. 1. Aufheizkurven für 2 ml Vollmilch in Pasteurisationsbeuteln für die beiden Pasteurisations-Temperaturen von 58,5 °C und 66 °C

### *Temperatur-Zeit-Bedingungen zur Hitzeinaktivierung der Alpha-Amylase in Vollei*

Die Hitzeinaktivierung der Alpha-Amylase in Vollei in Abhängigkeit von der Erhitzungszeit wurde bei den sechs Temperaturen von 58,5 °C, 60 °C, 61,5 °C, 63 °C, 64,5 °C und 66 °C jeweils im Doppel bei drei Vollmilchmassen unterschiedlicher Aktivität bestimmt. In Tabelle 1 sind als Beispiel die ermittelten Enzymrestaktivitäten nach Erhitzung bei 60 °C für 2 bis 18 Minuten und bei 63 °C für 0,5 bis 4,5 Minuten angegeben.

Die halblogarithmische Auftragung der Restaktivitäten gegen die Zeit ergab bei allen geprüften Erhitzungstemperaturen eine Gerade, aus deren Steigung dann die D-Werte ermittelt wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse der drei Versuchsreihen mit jeweils unterschiedlichen Alpha-Amylase-Aktivitäten der Vollmilchmassen wurde für jede Bestimmung die Restaktivität als Prozent der Ausgangsaktivität (= 100%) berechnet und diese dann in den Abbildungen 2 und 3 in logarithmischem Masstab ( $\log$  %-Aktivität [U l<sup>-1</sup>]) gegen die Zeit aufgetragen.

*Tabelle 1.* Restaktivitäten der Alpha-Amylase in Vollei nach der Hitzebehandlung bei unterschiedlichen Temperatur-Zeit-Bedingungen

Pasteurisationstemperatur: 60 °C										
Versuch No.	Aktivität der Alpha-Amylase vor Behandlung in U l <sup>-1</sup>	Restaktivitäten der Alpha-Amylase in U l <sup>-1</sup> nach folgenden Pasteurisationszeiten (min)								
		2	4	6	8	10	12	14	16	18
1	353	233	186	151	116	93	61	46	43	nb
		226	154	168	115	80	68	61	41	nb
2	340	237	199	167	118	100	74	61	46	37
		262	210	159	129	90	68	66	51	34
3	322	209	175	131	102	79	67	54	42	35
		203	184	141	112	91	72	56	47	39
Pasteurisationstemperatur: 63 °C										
Versuch No.	Aktivität der Alpha-Amylase vor Behandlung in U l <sup>-1</sup>	Restaktivitäten der Alpha-Amylase in U l <sup>-1</sup> nach folgenden Pasteurisationszeiten (min)								
		0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5
1	305	211	168	116	93	57	50	45	*	*
		236	167	124	71	81	64	30	26	*
2	318	231	172	122	77	64	42	25	*	*
		253	167	119	76	62	50	24	*	*
3	308	226	179	119	99	57	53	28	*	*
		237	185	124	102	58	54	30	33	*

nb = nicht bestimmt

\* unter der Nachweisgrenze von 21 U l<sup>-1</sup>.

In Abbildung 2 sind für die Temperaturen von 60 °C und 63 °C die Mittelwerte wie auch die Extremwerte der prozentualen Restaktivitäten aus den drei Einzelbestimmungen angegeben. Abbildung 3 zeigt die entsprechenden Inaktivierungskurven für die insgesamt 6 geprüften Erhitzungstemperaturen zwischen 58,5 °C und 66 °C.



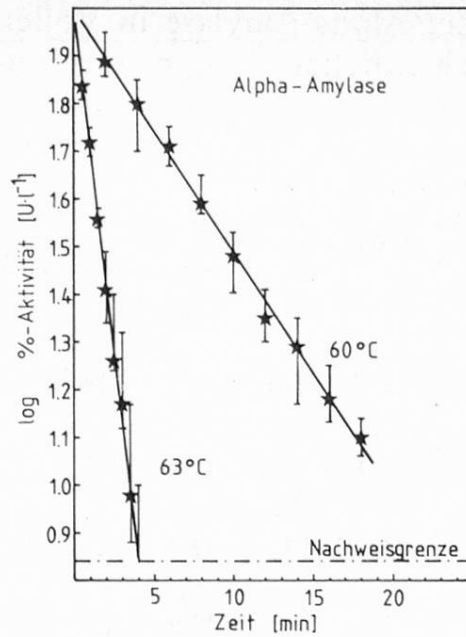


Abb. 2. Inaktivierung der Alpha-Amylase in Vollei bei den Pasteurisationstemperaturen von 60 °C und 63 °C in Abhängigkeit von der Pasteurisationszeit (Restaktivitäten berechnet als Prozent der Ausgangsaktivität [= 100%]); Mittel- und Extremwerte von 3 Versuchsreihen

### Temperatur-Zeit-Bedingungen zur Hitzeinaktivierung der Testkeime

In den Abbildungen 4 und 5 sind die Überlebenskurven der vier Testkeime in halblogarithmischem Massstab wiedergegeben. Die dabei aufgeführten Koloniezahlen ( $\text{KBE g}^{-1}$ ) sind jeweils Mittelwerte von zwei unabhängigen Versuchsreihen, bei denen alle fünf bzw. sechs Erhitzungstemperaturen jeweils mit der gleichen beimpften Volleimasse (pH 7,5 bis 7,6) geprüft wurden.

Im Temperaturbereich zwischen 58,5 °C und 66 °C wurden die Koloniezahlen von *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Salmonella typhimurium* innerhalb von 1 bis 2 Minuten um über 4 Zehnerpotenzen reduziert. Bei allen drei Arten war ein eindeutig exponentieller Verlauf der Überlebenskurven gegeben. Die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden  $r$  ( $n$  3 bis 6) lagen mit einem Mittelwert von 0,988 zwischen 0,955 und 0,995.

Bei *Salmonella senftenberg* Stamm 775 W wurde eine entsprechende Keimzahlreduktion um 4 Zehnerpotenzen erst durch eine Pasteurisationszeit von fast zwei Minuten bei 66 °C erreicht. Bei 58,5 °C wurden dafür über 35 Minuten benötigt. Dabei zeigte dieser Stamm bei den Temperaturen von 58,5 °C bis 64 °C zu Beginn der Erhitzung anfangs einen steileren Abfall der Koloniezahlen um eine bis über zwei Zehnerpotenzen und nach einem mehr oder weniger deutlich ausgeprägten Knickpunkt einen flacheren Verlauf der Überlebenskurven. Beide Äste der gebrochenen Kurven verliefen offensichtlich weitgehend exponentiell. Die Korrelationskoeffizienten  $r$  ( $n$  5) der Regressionsgeraden lagen bei den flachen

Ästen der Überlebenskurven mit einem Mittelwert von 0,986 zwischen 0,977 und 0,996, für den gesamten Bereich der Überlebenskurven dagegen mit einem deutlich tieferen Mittelwert von 0,951 zwischen 0,933 und 0,977.

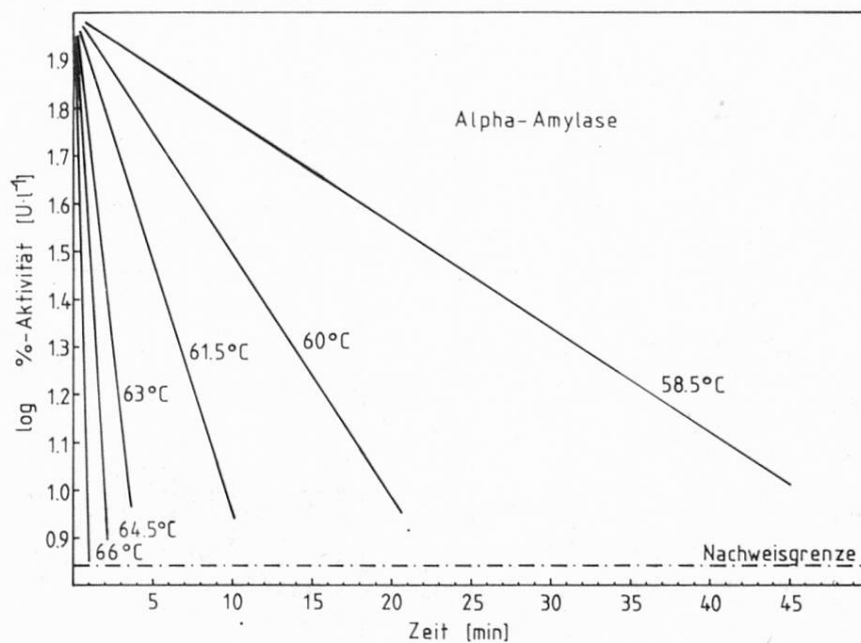


Abb. 3. Inaktivierung der Alpha-Amylase in Vollei bei 6 Pasteurisations-Temperaturen zwischen 58,5 °C und 66 °C in Abhängigkeit von der Pasteurisationszeit

Parameter der ermittelten Regressionsgeraden:

Pasteurisations-Temperatur	Parameter der Regressionsgeraden	
	<i>b</i>	<i>r</i> ( <i>n</i> )
58,5 °C	- 0,022	- 0,999 (9)
60, °C	- 0,051	- 0,998 (9)
61,5 °C	- 0,105	- 0,996 (9)
63, °C	- 0,291	- 0,997 (7)
64,5 °C	- 0,522	- 0,998 (6)
66, °C	- 1,166	- 0,987 (5)

#### *D- und z-Werte für die Alpha-Amylase-Aktivität und die Testkeime*

Die reziproken Werte der Steigungen der Inaktivierungskurven (Abb. 3–5) entsprechen den D-Werten für die Alpha-Amylase-Aktivität und die Testkeime. Die Auftragung der D-Werte in logarithmischem Masstab gegen die Temperatur ergibt die D-Kurven (Decimal Reduction Time Curve) (Abb. 6), aus deren Steigungen die z-Werte ermittelt wurden.

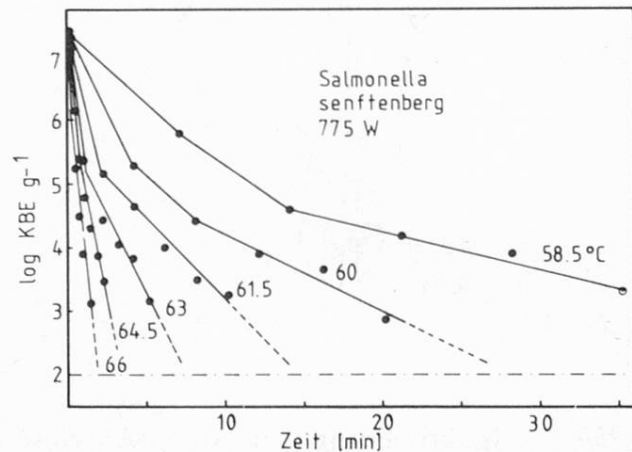
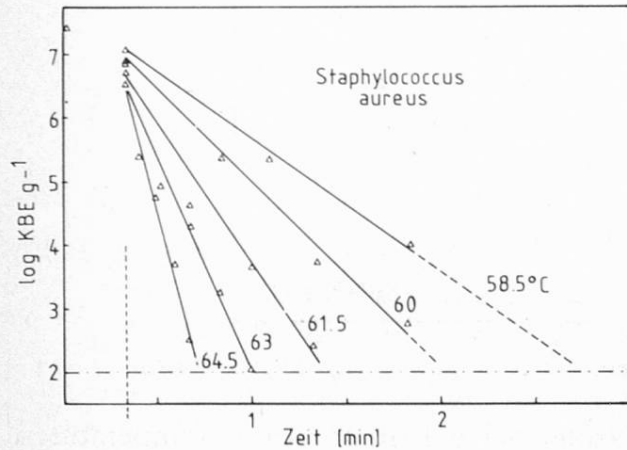
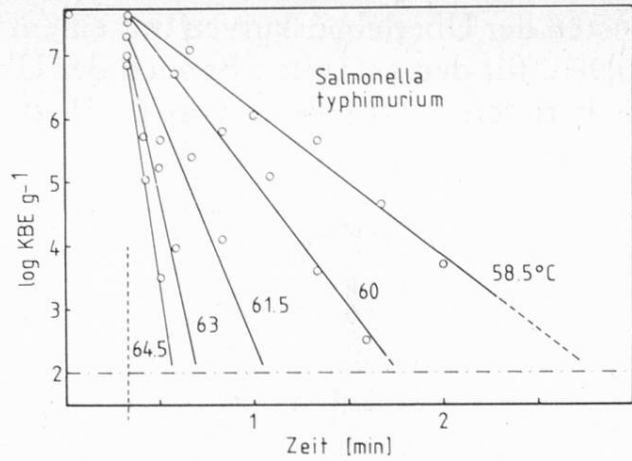
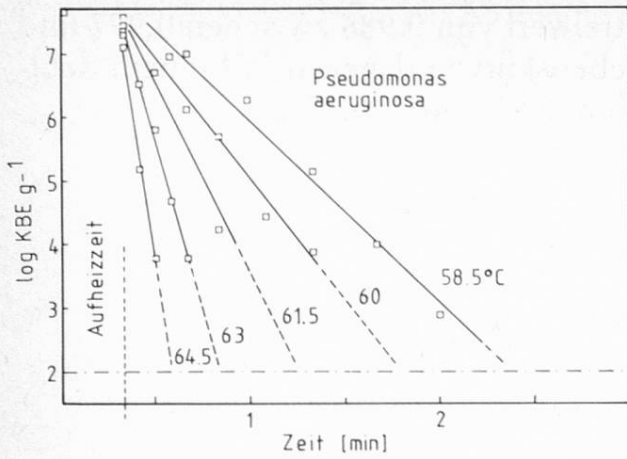


Abb. 4. Inaktivierung von *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* in Vollei bei 5 Pasteurisationstemperaturen zwischen 58,5 °C und 64,5 °C in Abhängigkeit von der Pasteurisationszeit

Abb. 5. Inaktivierung von *Salmonella typhimurium* und *Salmonella senftenberg* 775 W in Vollei bei 5 bzw. 6 Pasteurisationstemperaturen zwischen 58,5 °C und 64,5 °C bzw. 66 °C in Abhängigkeit von der Pasteurisationszeit

Die mittels linearer Regression aufgrund der experimentell bestimmten Werte (Abb. 4 und 5) berechneten D-Werte der Alpha-Amylase-Aktivität und der Testkeime sind in Tabelle 2 gegenübergestellt.

*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Salmonella typhimurium* zeigten in Vollei eine annähernd gleiche, insgesamt relativ geringe Hitzeresistenz. Selbst bei der niedrigsten geprüften Pasteurisationstemperatur von 58,5 °C lagen die D-Werte unter 0,5 Minuten.

Die Zellen des Stammes 775 W von *Salmonella senftenberg* waren erheblich hitzeresistenter. Die D-Werte waren durchschnittlich 10- bis 20fach höher. Da die Überlebenskurven bei allen geprüften Temperaturen ausser bei 66 °C aus zwei exponentiell verlaufenden Ästen unterschiedlicher Steigung zusammengesetzt waren, waren theoretisch drei verschiedene D-Werte abzuleiten.  $D_1$  für den ersten steilen Ast,  $D_2$  für den zweiten flacher verlaufenden Ast der Überlebens-

kurven und  $D_M$  für die gesamten Überlebenskurven. Im Hinblick auf die Anwendbarkeit in der Praxis sind in Abbildung 6 und Tabelle 2 nur die beiden letzten Werte, d. h.  $D_2$  und  $D_M$  dargestellt.

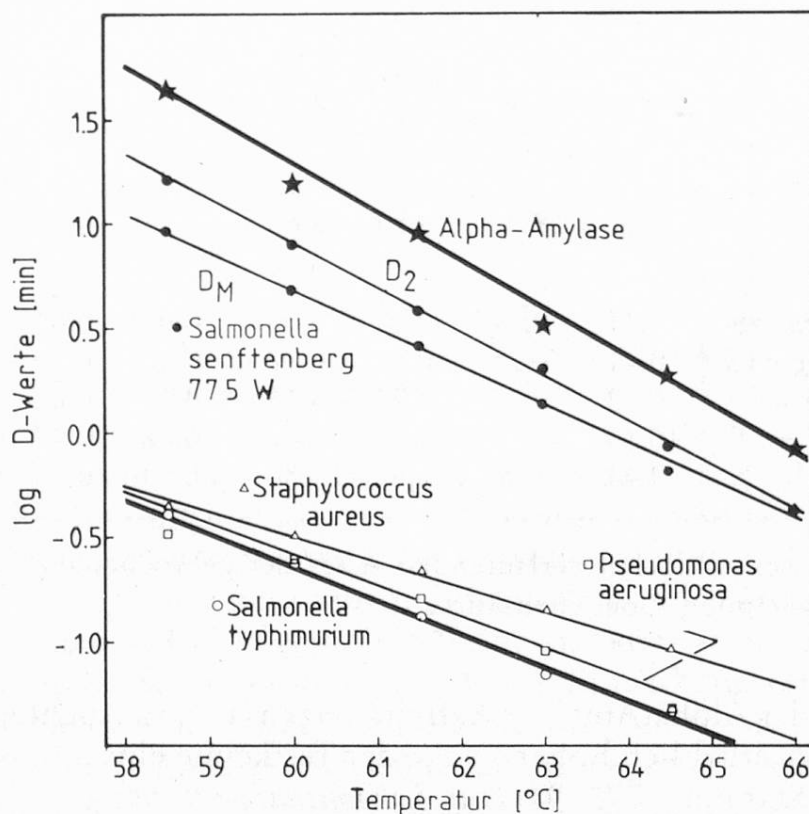


Abb. 6. D-Kurven (Decimal Reduction Time Curve) für die Aktivität der Alpha-Amylase, für *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Salmonella senftenberg* 775 W in Vollei

Parameter der ermittelten Regressionsgeraden:

Enzymaktivität bzw. Testkeime	Parameter der Regressionsgeraden		
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r(n)</i>
Enzymaktivität Alpha-Amylase	15,138	-0,231	-0,998 (6)
Testkeime <i>Salmonella typhimurium</i>	9,095	-0,162	-0,997 (5)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,865	-0,141	-0,990 (5)
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,854	-0,122	-0,995 (5)
<i>Salmonella senftenberg</i> $D_2$	13,553	-0,211	-0,999 (6)
775 W $D_M$	11,742	-0,184	-0,998 (6)

$D_2$  = D-Wert des zweiten flacher verlaufenden Astes der gebrochenen Überlebenskurve.

$D_M$  = D-Wert der gesamten Überlebenskurve.

Tabelle 2. D- und z-Werte für die Alpha-Amylase-Aktivität und *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Salmonella senftenberg* 775 W in Vollei

Enzymaktivität bzw. Testkeime	D-Werte in Minuten bei						z-Werte in °C
	58,5 °C	60 °C	61,5 °C	63 °C	64,5 °C	66 °C	
Enzymaktivität Alpha-Amylase	42,12	18,97	8,54	3,85	1,73	0,78	4,3
Testkeime							
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,41	0,24	0,14	0,08	0,04	0,03	6,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,41	0,25	0,16	0,10	0,06	0,04	7,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,52	0,34	0,22	0,15	0,10	0,06	8,2
<i>Salmonella senftenberg</i> D <sub>2</sub>	16,83	8,13	3,93	1,82	0,88	0,42	4,7
775W D <sub>M</sub>	9,44	5,00	2,65	1,40	0,74	0,39	5,4

D<sub>2</sub> = D-Wert des zweiten flacher verlaufenden Astes der gebrochenen Überlebenskurve.  
D<sub>M</sub> = D-Wert der gesamten Überlebenskurve.

Die D-Werte der Alpha-Amylase-Aktivität lagen im untersuchten Temperaturbereich durchwegs erheblich höher als die der Testkeime einschliesslich des hoch hitzeresistenten Stammes 775 W von *Salmonella senftenberg*.

Entsprechend den unterschiedlichen Steigungen der D-Kurven waren die z-Werte bei *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* in der Grössenordnung von 6 °C bis 8 °C relativ hoch, bei der Alpha-Amylase und von *Salmonella senftenberg* dagegen mit 4 °C bis 5 °C deutlich niedriger.

## Diskussion

### *Erhitzung der Eimasse in den Pasteurisationsbeuteln*

Exakte und gut reproduzierbare D-Wert-Bestimmungen erfordern Verfahren mit möglichst kurzen Aufheizzeiten bei der Erhitzung der Testsubstrate. Diese Forderung konnte durch die Anwendung des Pasteurisationsbeutel-Verfahrens nach *Erdsieck* und *Beumer* (9) weitgehend erfüllt werden. Nach deren Angaben beträgt die Aufheizzeit für Produkte in Pasteurisationsbeuteln nur  $\frac{1}{4}$  bis  $\frac{1}{20}$  der Zeit, die beim Erhitzen in Röhrchen benötigt wird. Die Aufheizzeit wird dann zum limitierenden Faktor, wenn ihre Dauer im Vergleich zur Heisshaltezeit zu stark ins Gewicht fällt. Ausserdem können sich bei den sehr kurzen Intervallen der Probenahmen bei hohen Temperaturen zeitliche Fehler bei der Überführung der Probebeutel stärker auswirken. Das war in vorliegenden Untersuchungen bei

den sehr kurzen Expositionszeiten von nur einer Minute und darunter vor allem bei den höheren Pasteurisationstemperaturen der Fall. Dies zeigt sich darin, dass die Werte der Korrelationskoeffizienten mit Zunahme der Pasteurisationstemperaturen, insbesondere bei der höchsten Temperatur von 66 °C etwas zurückgingen (Abb. 3).

### *Temperatur-Zeit-Bedingungen zur Inaktivierung der Alpha-Amylase in Vollei*

Die untere Nachweisgrenze für die Bestimmung der Alpha-Amylase-Aktivität mit dem Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test wird von der *Pharmacia-Diagnostic* (10) mit einer Extinktion von 0,04 angegeben. Dieser Wert entspricht nach der von *Jäckle* und *Geiges* (8) beschriebenen Testvorschrift einer Enzymaktivität von 21 U l<sup>-1</sup>. Die untersuchten Volleimassen wiesen vor der Pasteurisation Alpha-Amylase-Aktivitäten von durchschnittlich 320 U l<sup>-1</sup> auf. Von *Jäckle* und *Geiges* (8) wurden bei einzelnen Schaleneiern unterschiedlicher Provenienzen Alpha-Amylase-Aktivitäten zwischen 180 U l<sup>-1</sup> und bei industriell hergestellten Volleimassen Werte zwischen 220 U l<sup>-1</sup> und 410 U l<sup>-1</sup> gemessen. Je nach Aktivität der Eiprobe vor der Pasteurisation sind also unterschiedlich lange Einwirkungszeiten erforderlich, um die Alpha-Amylase-Aktivität unter die Nachweisgrenze des Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Tests zu senken. Andererseits kann die Anwendung gleicher Temperatur-Zeit-Bedingungen bei unterschiedlichen Amylase-Ausgangsaktivitäten der Eimassen in Grenzfällen zu einer falschen Beurteilung des Pasteurisationseffektes führen.

Als Beispiel dafür sind in Tabelle 3 bei drei bekannten, in der Praxis angewandten Pasteurisationstemperaturen für fünf verschiedene Alpha-Amylase-Aktivitäten in Vollei zwischen 180 U l<sup>-1</sup> und 560 U l<sup>-1</sup> die Pasteurisationszeiten berechnet, die zur Erreichung der Nachweisgrenze von 21 U l<sup>-1</sup> notwendig sind.

Die dabei für die drei Temperaturen eingesetzten D-Werte wurden aus den Daten der Regressionsgeraden (Abb. 6) ermittelt.

Die vom U.S. Department of Agriculture 1966 empfohlenen Temperatur-Zeit-Bedingungen von 60 °C und 3,5 Minuten (5) zur Pasteurisation von Vollei führen nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen zu einer Inaktivierung der Alpha-Amylase um 35%. *Murthy* (11), der die thermische Inaktivierung der Alpha-Amylase in verschiedenen Flüssigeiprodukten untersuchte, fand für Vollei bei einer Temperatur von 60 °C einen D-Wert von 19,6 Minuten und berechnete das Ausmass der Inaktivierung der Alpha-Amylase nach 3,5 Minuten Haltezeit mit 41% ± 5%. Die in den USA vorgeschriebenen Pasteurisationsbedingungen für Vollei genügen auch bei tiefen Werten der Alpha-Amylase-Aktivität bei weitem nicht, um die Alpha-Amylase bis unter die Nachweisgrenze von 21 U l<sup>-1</sup> zu inaktivieren. Der Alpha-Amylase-Test eignet sich also nicht für den Nachweis einer Pasteurisation von Volleimasse nach U.S.-Vorschriften.

Bei einer Pasteurisationstemperatur von 64,4 °C sind zur Inaktivierung der Alpha-Amylase in Vollei bis zur Nachweisgrenze von 21 U l<sup>-1</sup> je nach Ausgangsakti-

vität in der Eimasse Haltezeiten von 1,7 bis 2,6 Minuten erforderlich. Diese Werte stimmen recht gut mit dem von *Shrimpton* et al. (3) angegebenen Wert von 2,5 Minuten überein. Die in Grossbritannien empfohlenen Pasteurisationsbedingungen für flüssiges Vollei reichen also aus, um niedrige Alpha-Amylase-Aktivitäten unter die Nachweisgrenze zu reduzieren. Bei höheren Aktivitätswerten der Eimasse von über 450 U l<sup>-1</sup> ist allerdings die Wahrscheinlichkeit gross, dass korrekt erhitzte Eimassen als ungenügend pasteurisiert befunden werden.

Das in schweizerischen Betrieben durchgeführte Pasteurisationsverfahren bietet mit einer Haltezeit von 6 Minuten bei 64,7 °C ein sehr hohes Mass an Sicherheit für die Inaktivierung der Alpha-Amylase.

*Tabelle 3.* Einfluss von unterschiedlichen Alpha-Amylase-Aktivitäten in der unbehandelten Volleimasse auf die Pasteurisationszeit bis zum Erreichen der Nachweisgrenze von 21 U l<sup>-1</sup>

Aktivität der Alpha-Amylase vor Behandlung in U l <sup>-1</sup>	Zeit zur Inaktivierung der Alpha-Amylase bis zur Nachweisgrenze von 21 U l <sup>-1</sup> bei		
	60 °C <sup>a</sup> D = 18,97 (min)	64,4 °C <sup>b</sup> D = 1,83 (min)	64,7 °C <sup>c</sup> D = 1,56 (min)
180	17,70*	1,70	1,44
220	19,35*	1,86	1,59
320	22,44*	2,16	1,84
410	24,48*	2,36	2,01
560	27,05*	2,60*	2,22

Pasteurisationsbedingungen: a = USA 60 °C / 3,5 Minuten  
 b = England 64,4 °C / 2,5 Minuten  
 c = Schweiz 64,7 °C / 6 Minuten

\* Inaktivierung der Alpha-Amylase unter die Nachweisgrenze durch angewandtes Pasteurisationsverfahren nicht gewährleistet.

### *Temperatur-Zeit-Bedingungen zur Inaktivierung der Testkeime*

#### *Salmonella typhimurium*

Hauptgrund für die Pasteurisation von Eiprodukten ist die sichere Eliminierung potentiell pathogener Bakterien. Im Vordergrund steht dabei die Inaktivierung von Salmonellen. Die meisten Salmonellen sind relativ hitzeempfindlich (12–14). Nach *Stadelman* und *Cotterill* (4) wurden 14 Salmonellen-Serotypen, die in Eiprodukten häufig vorkommen, in Vollei unter folgenden Pasteurisationsbedingungen inaktiviert: 59 °C/3,7 min; 60 °C/2,6 min; 61 °C/2 min; 62 °C/1,2 min; 63 °C/0,8 min; 64 °C/0,6 min; 65 °C/0,3 min. Aussagekräftiger ist ein Ver-

gleich der D-Werte. *Solowey et al.* (12) bestimmten für 10 Stämme von *Salmonella typhimurium* in Vollei (pH 7,4 bis 7,6)  $D_{58^{\circ}\text{C}}$ -Werte zwischen 0,61 und 0,84 Minuten. Im Egg Pasteurization Manual des U.S. Department of Agriculture (16) wird für Salmonellen normaler Hitzeresistenz bei einer Temperatur von 60 °C ein D-Wert von durchschnittlich 0,4 Minuten angegeben. *Anellis et al.* (13) ermittelten für *Salmonella typhimurium* in Vollei (pH 8,0) einen  $D_{60^{\circ}\text{C}}$ -Wert von 0,55 Minuten, *Garibaldi et al.* (17) für den Stamm Tm-1 von 0,27 Minuten. Letzterer Wert stimmt sehr gut mit den hier für den ATCC-Stamm 13311 von *Salmonella typhimurium* bestimmten Wert von 0,25 Minuten überein.

#### *Pseudomonas aeruginosa und Staphylococcus aureus*

Der hier geprüfte ATCC-Stamm 25442 von *Pseudomonas aeruginosa* zeigte mit weitgehend ähnlichen D-Werten praktisch die gleiche Hitzeresistenz wie der untersuchte Stamm von *Salmonella typhimurium*. Die von *Solowey et al.* (12) für 4 *Pseudomonas spec.* in Vollei bestimmten  $D_{58^{\circ}\text{C}}$ -Werte von 0,49 bis 0,51 Minuten liegen in gleicher Grössenordnung.

Der als Vertreter grampositiver, potentiell toxigener Bakterien untersuchte Stamm von *Staphylococcus aureus* hatte mit einem  $D_{60^{\circ}\text{C}}$ -Wert von 0,34 Minuten eine nur wenig höhere Hitzeresistenz als *Pseudomonas aeruginosa* und *Salmonella typhimurium*. Nach vergleichbaren Hitzeresistenzbestimmungen, allerdings in anderen Substraten, ist die Hitzeresistenz von *Staphylococcus aureus* allgemein grösser. So wurden in Milch  $D_{60^{\circ}\text{C}}$ -Werte von 0,5 bis 0,75 Minuten (18), in P-Puffer bei pH 6,5 von 2,5 Minuten und bei pH 7,5 von 1,1 Minuten (19) bestimmt. *Thomas et al.* (20) fanden für zwei Stämme von *Staphylococcus aureus* bei 60 °C in 0,5% NaCl-Lösung D-Werte von 2,0 bis 2,3 Minuten und in Grünerbssuppe von 6,7 bis 7,9 Minuten. Offensichtlich war der hier aus Lebensmitteln isolierte Stamm zufällig relativ wenig resistent.

#### *Salmonella senftenberg 775 W*

Der extrem hitzeresistente Stamm 775 W von *Salmonella senftenberg*, 1946 von *Winter et al.* (21) aus Trockenvollei isoliert, wurde seitdem oft als Standardtestkeim bei Untersuchungen über die Pasteurisationsbedingungen für Eiprodukte mitgeprüft. Überlebenskurven in flüssigem Vollei wurden bisher nur von *Dabbah et al.* (22) ausschliesslich bei 60 °C bestimmt.

Sie zeigten nach zunächst exponentiellem Verlauf über 8 Zehnerpotenzen langanhaltendes Tailing mit Restkeimzahlen von  $10^1 \text{ ml}^{-1}$  noch nach über 150 Minuten langer Erhitzung. Entsprechendes Tailing wurde auch bei *Salmonella typhimurium* und zwei anderen Serotypen gefunden. Ähnliche Überlebenskurven mit starkem Tailing fanden bisher nur *Milone und Watson* (23) nach Erhitzung des Stammes 775 W bei 60 °C in einer 33,3%igen Suspension von zerkleinerter Truthahnbrustmuskulatur. Zusätzlich erfolgte zu Beginn der Erhitzung eine rasche Abnahme der Keimzahlen um über eine Zehnerpotenz wie in den vorliegenden Untersuchungen. Im Phosphatpuffer verlief die Inaktivierung rein exponentiell. Die Autoren warnen daher vor einer kritiklosen Anwendung der D-Werte



insbesondere bei Suspension der Testkeime in komplexen Substraten und empfehlen eine zusätzliche Prüfung längerer Erhitzungszeiten, konnten aber keine Erklärung für das bisher nur bei Endosporen bekannte Tailing-Phänomen geben. In eigenen Versuchen mit dem Beutelsystem wurden Zellen dieses Stammes 775 W in Vollei suspendiert und bei 60 °C bis zu 300 Minuten erhitzt. In mehrfachen Parallelversuchen wurde dabei ausschliesslich eine rasche exponentielle Inaktivierung innerhalb der ersten 40 Minuten der Hitzebehandlung, aber kein Tailing, d. h. kein Überleben von Zellen nach langanhaltender Hitzeexposition gefunden. Die Befunde von *Dabbah* et al. (22) waren also nicht zu bestätigen.

Die meisten Hitzeresistenzbestimmungen mit dem Stamm 775 W in flüssigem Vollei erfolgten nach der Endpunktmethod mit TDT-Röhrchen und rechnerischer Bestimmung der D-Werte, also ohne Ermittlung von Überlebenskurven (12, 13, 15). Bei genauerer Durchsicht der angegebenen Daten z. B. von *Solowey* et al. (12) ist zu erkennen, dass in einer ersten Phase der Erhitzung eine noch wesentlich stärkere Abnahme der Keimzahlen als in den vorliegenden Untersuchungen erfolgte. *Thomas* et al. (20) fanden bei der Hitzeinaktivierung des Stammes 775 W in anderen Substraten überwiegend exponentielle Inaktivierung. Sie geben aber auch an, dass in einigen Experimenten kurze Anfangsperioden mit rascher Abtötung zu beobachten waren. Ähnlich erwähnten *Liu* et al. (24), dass bei einer Subkultur des Stammes 775 W zu Beginn der Erhitzung in Phosphatpuffer regelmässig bei allen Temperaturen eine beschleunigte Inaktivierungsrate nachweisbar war. Die hier bei Stamm 775 W gefundene raschere Inaktivierung zu Beginn der Erhitzung ist also offensichtlich auch in anderen Untersuchungen aufgetreten, aber weitgehend unberücksichtigt geblieben.

Bei weiteren Hitzeresistenzbestimmungen wurden in Eiweiss weitgehend exponentielle Inaktivierungen, in Eigelb dagegen noch stärker ausgeprägte Knickkurven als im Vollei gefunden. Offenbar wird die Kinetik der Inaktivierung in hohem Masse vom Erhitzungssubstrat beeinflusst.

Bei gebrochenen Überlebenskurven, wie sie hier in Vollei bestimmt wurden, ist die korrekte Ableitung der D-Werte problematisch. Bei Berücksichtigung ausschliesslich der unteren flachen exponentiellen Äste der Überlebenskurven ergeben sich relativ hohe D-Werte, wie hier z. B. ein  $D_{60^{\circ}\text{C}}$ -Wert von 8,2 Minuten. Entsprechend hohe  $D_{60^{\circ}\text{C}}$ -Werte von 10 bis 11 Minuten wurden auch in anderen Substraten bestimmt, offensichtlich unter alleiniger Berücksichtigung der unteren exponentiellen Äste (15, 20). Allerdings wird damit die Hitzeresistenz nur eines relativ geringen Anteils der Gesamtpopulation in der Grössenordnung von etwa 1 bis 10% bezeichnet. Der weitaus grössere Anteil erheblich weniger resistenter Zellen bleibt damit unberücksichtigt. Für die Pasteurisation ist insbesondere bei relativ geringer Keimbelastung der Produkte die wesentlich raschere Inaktivierung der weniger resistenten Zellen von praktischer Bedeutung. Daher ist zur Ableitung der D-Werte besser der gesamte mittlere Verlauf der Überlebenskurven von der Ausgangskeimzahl über beide Äste zu berücksichtigen. Diese mittleren  $D_M$ -Werte liegen insgesamt deutlich tiefer, so z. B. bei 60 °C bei 4,3 Minuten. Sie dürften weitgehend den D-Werten, die aufgrund der Ergebnisse von TDT-Röhrchen-Verfahren berechnet wurden (12, 13, 15), entsprechen, weil dabei immer auch der Anfangsteil der Inaktivierungskurven mit erfasst wird.

Die bisher für den Stamm 775 W in Vollei angegebenen, überwiegend aufgrund von TDT-Bestimmungen berechneten D-Werte bei 60 °C variieren zwischen 1,1 Minuten (22) und 11,6 Minuten (15). *Anellis et al.* (13) weisen auf den grossen Einfluss des pH-Wertes und damit des Alters der Eier auf die Hitzeresistenz hin. So wurden für den Stamm 775 W in Vollei bei pH 8,0 ein  $D_{60^{\circ}\text{C}}$ -Wert von nur 1,5 Minuten, bei pH 7,35 dagegen von 4,6 Minuten bestimmt. Dies entspricht recht gut dem hier ermittelten  $D_M$ -Wert bei 60 °C von 4,4 Minuten. Ausserdem besteht der bei allen diesen Untersuchungen eingesetzte Sammlungsstamm 775 W offenbar aus einer Mischung von Zellen unterschiedlicher Hitzeresistenz (24) und hat auch das Erhitzungssubstrat einen erheblichen Einfluss (19).

### *Korrelation zwischen Hitzeinaktivierung der Alpha-Amylase und der Testkeime in Vollei*

Zur kritischen Beurteilung der Eignung des Alpha-Amylase-Tests als Nachweismethode einer ausreichenden Erhitzung von Vollei muss bekannt sein, welche Keimzahlreduktion von potentiell pathogenen Bakterien bei den Pasteurisationsbedingungen, die für die Inaktivierung der Alpha-Amylase notwendig sind, erreichbar ist. Für diese Überlegungen ist von folgenden Voraussetzungen auszugehen:

1. Bei Anwendung der im Schweizerischen Lebensmittelbuch (7) empfohlenen amyloklastischen Methode oder dem von *Jäckle* und *Geiges* (8) adaptierten Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test darf pasteurisiertes Vollei eine Alpha-Amylase-Aktivität von maximal 21 U l<sup>-1</sup>, der unteren Nachweisgrenze beider Methoden, aufweisen.
2. Es wird von 410 U l<sup>-1</sup> Alpha-Amylase in der unbehandelten Volleimasse als Maximalwert ausgegangen. Bei der Untersuchung von 15 industriell gefertigten Volleiprüben (*Jäckle* und *Geiges* (8)) war dies der höchste nachgewiesene Wert, während der Mittelwert mit 320 U l<sup>-1</sup> wesentlich niedriger lag. Noch höhere Werte bis zu 560 U l<sup>-1</sup> wurden in einzelnen Schaleneiern gefunden. Insgesamt lagen aber auch bei den Schaleneiern die Werte wesentlich niedriger, so dass nach dem Aufschlagen und Vermischen der Eimasse wahrscheinlich nur selten der Wert von 410 U l<sup>-1</sup> erreicht werden dürfte. Damit ist mit diesem Maximalwert bereits eine relativ hohe Sicherheitsspanne gegeben.

Die Temperatur-Zeit-Bedingungen für die Inaktivierung der Alpha-Amylase sind damit also derart festgelegt, dass mindestens eine Verringerung der Enzymaktivität von 410 auf 21 U l<sup>-1</sup>, d. h. auf rund 5% der Ausgangsaktivität, gewährleistet sein muss. Dieses Ausmass an Reduktion der katalytischen Enzymaktivität erfordert Pasteurisationszeiten, die annähernd den 1,3fachen D-Werten entsprechen. Wie die D-Kurven in Abbildung 6 zeigen, liegen die D-Werte für die Alpha-Amylase-Aktivität im Temperaturbereich zwischen 58 °C und 66 °C wesentlich höher als die D-Werte der vier geprüften Bakterienarten. Wird die Alpha-Amylase also in ihrer Aktivität um 90% reduziert, so liegt die dabei erreichbare Reduktion der Bakterien-Zahlen in jedem Fall weit über 90% bzw. einer Zehnerpotenz.

Tabelle 4. Theoretische Reduktionswerte der Keimzahlen (in Zehnerpotenzen) von *Salmonella typhimurium* und *Salmonella senftenberg* 775 W durch Hitzebehandlung bei Temperatur-Zeit-Bedingungen, welche die Inaktivierung der Alpha-Amylase in Vollei von 410 U l<sup>-1</sup> unter die Nachweisgrenze von 21 U l<sup>-1</sup> bewirken

Testkeime	Temperatur-Zeit-Bedingungen zur Inaktivierung der Alpha-Amylase in Vollei (= 1,3 D-Werte)									
	[°C] [min]	58 70,9	59 41,6	60 24,5	61 14,4	62 8,5	63 5,0	64 2,9	65 1,7	66 1,0
<i>Salmonella typhimurium</i>		>100	>100	>70	>50	>40	>30	>30	>20	>20
<i>Salmonella senftenberg</i>	D <sub>2</sub>	3,4	3,3	3,1	3,0	2,9	2,7	2,6	2,5	2,4
775 W	D <sub>M</sub>	6,0	5,4	4,9	4,4	3,9	3,5	3,2	2,8	2,5

D<sub>2</sub> = D-Wert des zweiten flacher verlaufenden Astes der gebrochenen Überlebenskurve.  
D<sub>M</sub> = D-Wert der gesamten Überlebenskurve.

In Tabelle 4 sind mit Hilfe der Parameter der Regressionsgeraden von Abbildung 6 für die Temperaturen von 58 °C bis 66 °C die Erhitzungszeiten berechnet, die entsprechend den 1,3fachen D-Werten zur Inaktivierung der Alpha-Amylase in Vollei von 410 U l<sup>-1</sup> unter die Nachweisgrenze von 21 U l<sup>-1</sup> notwendig sind. Ausserdem ist für die beiden Salmonellenstämme die unter diesen Bedingungen erreichbare Reduktion der Keimzahlen in Zehnerpotenzen berechnet. So würde eine 5 Minuten lange Erhitzung bei 63 °C bei *Salmonella typhimurium* zu einer theoretischen Keimzahlreduktion um 64 Zehnerpotenzen führen. Die entsprechenden Werte für *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* liegen in gleicher Grössenordnung. Bei dem hoch resistenten Stamm 775 W von *Salmonella senftenberg* ist die dezimale Keimzahlreduktion wesentlich geringer. Bei alleiniger Berücksichtigung der unteren flachen Äste der Überlebenskurven (D<sub>2</sub>-Werte) ist unter diesen Erhitzungsbedingungen eine Keimzahlreduktion lediglich um 2,4 bis 3,4, bei Anwendung der mittleren D<sub>M</sub>-Werte um 2,5 bis 6,0 Zehnerpotenzen möglich.

In Abbildung 7 ist die Kurve für eine 95%ige Inaktivierung der Alpha-Amylase (entsprechend den 1,3fachen D-Werten) den Kurven der Keimzahlreduktionen um zwei, vier und sechs Zehnerpotenzen bei *Salmonella senftenberg* 775 W und um 10 Zehnerpotenzen bei *Salmonella typhimurium* gegenübergestellt. Die deutlich geringere Steigung der D-Kurven der beiden Salmonellenarten im Vergleich zur D-Wert-Kurve der Alpha-Amylase-Inaktivierung bedeutet, dass die Bakterieninaktivierung im unteren Temperaturbereich deutlich grösser ist als bei höheren Temperaturen. Ähnliche Beobachtungen liegen bereits von Shrimpton et al. (3) vor. Sie stellten fest, dass bei Temperaturen um 61 °C *Salmonella senftenberg* rascher inaktiviert wird als die Alpha-Amylase. Umgekehrt wurde bei 65,5 °C die Alpha-Amylase rascher als *Salmonella senftenberg* inaktiviert.

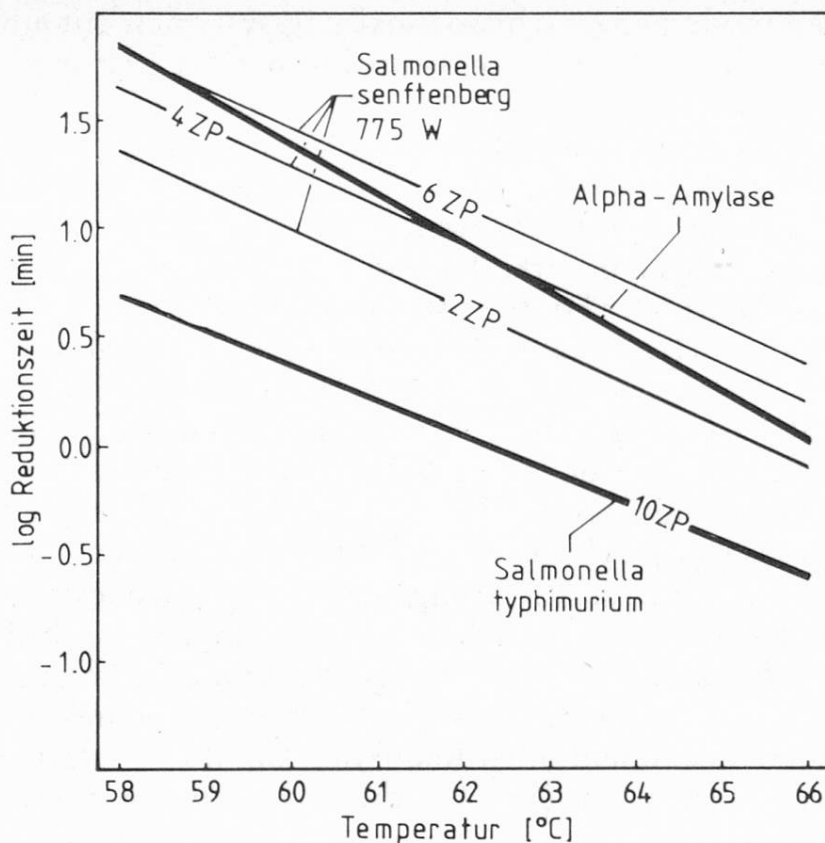


Abb. 7. Korrelation zwischen der Hitzeinaktivierung der Alpha-Amylase bis zur Nachweisgrenze (5,12%) und von *Salmonella typhimurium* um 10 Zehnerpotenzen sowie von *Salmonella senftenberg* 775 W um 2 bis 6 Zehnerpotenzen (Berechnungsgrundlage  $D_M$ -Werte) in Vollei bei unterschiedlichen Pasteurisationsbedingungen

### Konsequenzen für die Praxis

Nach der eidg. Verordnung über die hygienisch-mikrobiologischen Anforderungen an Lebensmittel, Gebrauchs- und Verbrauchsgegenstände (25) gilt für alle Lebensmittel und damit auch für Eiprodukte für Salmonellen ein Grenzwert von «in 20 Gramm nicht nachweisbar». Dies entspricht einer maximal tolerierbaren Zahl von weniger als  $5 \times 10^{-2}$  Salmonellen  $g^{-1}$  bzw.  $ml^{-1}$ . Die FAO/WHO hat 1975 (26) für pasteurisiertes und tiefgefrorenes Vollei einen 2-Klassen-Plan vorgeschlagen, nachdem bei insgesamt 30 Proben einer Charge in jeweils 20 bis 25 Gramm keine Salmonellen nachweisbar sein dürfen. Das sind weniger als  $1 \times 10^{-3}$  Salmonellen  $ml^{-1}$ .

Die Höhe der möglichen Salmonellenbelastung in unpasteurisiertem Vollei in der Praxis ist schwer abzuschätzen. Anellis et al. (13) hatten 1954 in kommerziell aufgeschlagenem Vollei noch etwa  $10^5$  Salmonellen  $ml^{-1}$  gefunden. Dagegen stellten Garibaldi et al. (27) 1969 nach Untersuchung von über 90 Proben aus Aufschlagbetrieben in den USA fest, dass bei über 93% der positiven Proben weniger als eine Salmonellenzelle  $ml^{-1}$  nachweisbar waren. Keine Probe enthielt mehr als

$1,1 \times 10^2 \text{ ml}^{-1}$ . Bei den modernen Legehennenhaltungssystemen mit erheblich verbesserter Stallhygiene dürfte die Salmonellenbelastung der Eier insgesamt noch wesentlich geringer sein. Allerdings sind Ausnahmefälle mit wesentlich höherer Belastung nie mit Sicherheit auszuschliessen. Wenn diese mit  $10^5 \text{ ml}^{-1}$  angenommen wird, so ist zur Unterschreitung der Grenzwerte von weniger als  $5 \times 10^{-2}$  bzw.  $1 \times 10^{-1}$  eine Hitzeinaktivierung notwendig, die eine Reduktion der Zellzahlen um 7 bis 8 Zehnerpotenzen bewirkt. Dies wird für *Salmonella typhimurium* und alle anderen Serotypen normaler Hitzeresistenz mit den zur Inaktivierung der Alpha-Amylase notwendigen Temperatur-Zeit-Bedingungen erreicht und weit überschritten. Dabei ist also eine sehr hohe Sicherheit auch bei aussergewöhnlich starker Salmonellenbelastung gegeben. Eine ausreichende Sicherheit ist aber auch schon bei den in den USA üblichen Pasteurisationsbedingungen von  $60^\circ\text{C}$  und 3,5 Minuten (5) gegeben, wobei die Alpha-Amylase nicht inaktiviert, das Produkt aber weniger stark hitzebelastet wird. Dies gilt allerdings nur unter der Voraussetzung, dass die Hitzeinaktivierung der Salmonellen exponentiell verläuft. Aber auch bei der nichtexponentiellen Inaktivierung, wie sie bisher nur von *Dabbah* et al. (22) beobachtet, von anderen Autoren und auch in eigenen Untersuchungen aber nicht bestätigt wurde, war ein Überleben hochresistenter Zellen erst nach einer primären exponentiellen Reduktion um 8 Zehnerpotenzen nachweisbar. Somit würde auch in diesem Falle die notwendige Keimzahlreduktion ohne Schwierigkeiten erreichbar sein.

Bei Annahme einer Kontamination ausschliesslich mit hochhitzeresistenten Zellen wie die des Stammes 775 W von *Salmonella senftenberg* wäre mit den zur Alpha-Amylase-Inaktivierung notwendigen Temperatur-Zeit-Bedingungen eine Keimzahlreduktion um lediglich drei Zehnerpotenzen möglich. Damit dürfte die Keimbelastung des unpasteurisierten Volleis nicht höher als 1 bis 5 Zellen  $\text{ml}^{-1}$  sein.

Nach allen Erfahrungen mit Hunderten von Salmonellenisolaten aus Lebensmitteln, die auf ihre Hitzeresistenz geprüft wurden, scheint das Vorkommen so hochresistenter Stämme aussergewöhnlich selten zu sein. Seit der Erstisolierung des Stammes 775 W von *Salmonella senftenberg* 1946 (21) wurde bisher nur noch einmal ein ähnlich resistenter Stamm aus hausgeschlachtetem Rindfleisch isoliert (28). *Solowey* et al. (12) fanden bei 95 Isolaten aus Vollei mit 24 Serotypen und NG (14) bei über 300 Isolaten mit 75 verschiedenen Serotypen weitgehend gleiche, relativ niedrige Hitzeresistenz. Lediglich ein Stamm von *Salmonella blockley* war 5fach und der Stamm 775 W von *Salmonella senftenberg* 30fach resistenter als *Salmonella typhimurium*. Allgemein hat sich daher heute die Auffassung durchgesetzt, dass die so selten vorkommenden hochhitzeresistenten Salmonellenstämme bei Beurteilung der Effektivität von Pasteurisationsbedingungen unberücksichtigt bleiben können (29).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die in der eidg. Lebensmittelverordnung (6) enthaltene Vorschrift, wonach in pasteurisiertem Vollei keine Alpha-Amylase mehr nachweisbar sein darf, ein hohes Mass an hygienischer Sicherheit bietet.

## Zusammenfassung

Die zur Inaktivierung der Alpha-Amylase in Vollei notwendigen Expositionszeiten wurden im Temperaturbereich zwischen 58,5 °C bis 66 °C bestimmt. Bei 60 °C erfolgte innerhalb von 19 Minuten (=  $D_{60\text{ °C}}$ ) eine 90%ige Inaktivierung. Der z-Wert betrug 4,3 °C.

Bei *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* lagen die  $D_{60\text{ °C}}$ -Werte in Vollei zwischen 0,24 Minuten und 0,34 Minuten, die z-Werte zwischen 6,2 °C und 8,2 °C. Im Vergleich dazu war *Salmonella senftenberg* 775 W bis 20fach resistenter.

Bei einer Amylase-Ausgangsaktivität in Vollei von 410 U l<sup>-1</sup> werden Pasteurisationszeiten von 1,3 D-Werten benötigt, um die Aktivität der Alpha-Amylase unter die Nachweisgrenze des Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Testes von 21 U l<sup>-1</sup> zu senken. Unter diesen Bedingungen wird *Salmonella senftenberg* 775 W um 3 bis 6, die übrigen Testkeime um mehr als 20 Zehnerpotenzen reduziert.

Die in der eidgenössischen Lebensmittelverordnung enthaltene Vorschrift, wonach in pasteurisiertem Vollei keine Alpha-Amylase mehr nachweisbar sein darf, garantiert ein hohes Mass an hygienischer Sicherheit.

## Résumé

La durée nécessaire pour l'inactivation de l' $\alpha$ -amylase dans les oeufs entiers a été déterminée pour des températures allant de 58,5 °C à 66 °C. Pour  $D_{60\text{ °C}}$ , une valeur de 19 minutes et pour z une valeur de 4,3 °C ont été calculées. Les valeurs de  $D_{60\text{ °C}}$  pour *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* sont comprises entre 0,24 et 0,34 minutes avec des valeurs de z se situant entre 6,2 °C et 8,2 °C. Face aux autres souches testées, la bactérie *Salmonella senftenberg* 775 W s'est montrée vingt fois plus résistante.

A condition de faire chuter l'activité de l'amylase de 410 U l<sup>-1</sup> à 21 U l<sup>-1</sup>, valeur inférieure au seuil perceptible par le test Phadebas<sup>R</sup>, ce qui nécessite des temps de pasteurisation de 1,3 valeurs de D, le nombre de bactéries chute exponentiellement par un facteur de plus de 10<sup>20</sup> pour *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et de 10<sup>3</sup> à 10<sup>6</sup> pour *Salmonella senftenberg*.

L'élimination de toute trace décelable d' $\alpha$ -amylase dans les oeufs entiers, mesure prescrite par l'Ordonnance suisse sur les denrées alimentaires, offre une sérieuse garantie de sécurité hygiénique au vu des résultats obtenus.

## Summary

The exposition times necessary for the inactivation of  $\alpha$ -amylase in whole egg were determined in the temperature range between 58.5 °C and 66 °C. At a temperature of 60 °C the D-value was 19 minutes, the z-value 4.3 °C.

The  $D_{60\text{ °C}}$ -values in whole egg for *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* lay between 0.24 and 0.34 minutes, the z-values between 6.2 °C and 8.2 °C. In comparison with the other three test strains, *Salmonella senftenberg* 775 W proved to be 20 times more heat resistant.

For an initial amylase activity of 410 U l<sup>-1</sup>, 1.3 D-values as pasteurisation times are necessary to reduce the activity of the  $\alpha$ -amylase-activity below the minimum detectable quantity of 21 U l<sup>-1</sup> of the Phadebas<sup>R</sup>-amylase test. Under these conditions *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* are reduced by more than 20 and *Salmonella senftenberg* 775 W by 3 to 6 log units.

According to these results it can be stated that the requirement by the Swiss food ordinance that no  $\alpha$ -amylase must be detected in pasteurised whole egg, offers a high degree of hygienical safety.

### Literatur

1. Heller, C. L., Roberts, B. C., Amos, A. J., Smith, M. E. and Hobbs, B. C.: The pasteurization of liquid whole egg and the evaluation of the baking properties of frozen whole egg. J. Hyg., Camb. **60**, 135–143 (1962).
2. Brooks, J.: Alpha-Amylase in whole egg and its sensitivity to pasteurization temperatures. J. Hyg., Camb. **60**, 145–151 (1962).
3. Shrimpton, B. H., Monsey, J. B., Hobbs, B. C. and Smith, M. E.: A laboratory determination of the destruction of Alpha-Amylase and salmonellae in whole egg by heat pasteurization. J. Hyg., Camb. **60**, 153–162 (1962).
4. Stadelman, W. and Cotterill, O. J.: Egg science and technology, 2nd ed. Avi Publ. Co., New York 1977.
5. U.S. Department of Agriculture (USDA): Regulations governing the inspection of eggs and egg products. 7 CFR, Part 59. U.S. Gov. Print. Off., Washington D.C. 1975.
6. 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.
7. Schweizerisches Lebensmittelbuch, 5. Auflage, 2. Band, Kapitel 21, Eier und Eikonserven. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1969.
8. Jäckle, M. und Geiges, O.: Bestimmung der Alpha-Amylase-Aktivität in Vollei und Eigelb mit dem Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **77**, 420–434 (1986).
9. Erdtsieck, B. and Beumer, R.: The T.D.T.-pouch – a new method for the determination of the heat-resistance of microorganisms. LWT **9** (3), 185–187 (1976).
10. Pharmacia Diagnostics: Phadebas<sup>R</sup>-Amylase-Test, Gebrauchsinformation, 1979.
11. Murthy, G. K.: Thermal inactivation of Alpha-Amylase in various egg products. J. Food. Sci. **35**, 352–356 (1970).
12. Solowey, M., Sutton, R. R. and Calensick, E. J.: Heat resistance of salmonella organisms isolated from spray-dried whole egg powder. Food Technol. **2**, 9–14 (1948).
13. Anellis, A., Lubas, J. and Rayman, M. R.: Heat resistance in liquid egg of some strains of the genus salmonella. Food Res. **19**, 377–395 (1954).
14. Ng, H., Bayne, H. G. and Garibaldi, J. A.: Heat resistance of salmonella: the uniqueness of *Salmonella senftenberg* 775 W. Appl. Microbiol. **17**, 78–82 (1969).
15. Osborne, W. W., Straka, R. P. and Lineweaver, H.: Heat resistance of salmonella in liquid whole egg, egg yolk, and egg white. Food Res. **19**, 451–463 (1954).
16. U.S. Department of Agriculture: Agricultural Research Service: Egg pasteurization manual. ARS 74–48. Albany, Calif. 94710, March, 1969.
17. Garibaldi, J. A., Straka, R. P. and Ijichi, K.: Heat resistance of salmonella in various egg products. Appl. Microbiol. **17**, 491–496 (1969).

18. Walker, G. C. and Harmon, L. G.: Thermal resistance of *Staphylococcus aureus* in milk, whey, and phosphate buffer. *Appl. Microbiol.* **14**, 584–590 (1966).
19. Stiles, M. E. and Witter, L. D.: Thermal inactivation, heat injury, and recovery of *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* **48**, 677–681 (1965).
20. Thomas, C. T., White, J. C. and Longree, K.: Thermal resistance of salmonellae and staphylococci in foods. *Appl. Microbiol.* **14**, 815–820 (1966).
21. Winter, A. R., Stewart, G. F., McFarlane, V. H. and Solowey, M.: Pasteurization of liquid egg products. III. Destruction of salmonella in liquid whole egg. *Am. J. Public Health* **36**, 451–460 (1946).
22. Dabbah, R., Moats, W. A. and Edwards, V. M.: Survivor curves of selected *Salmonella enteritidis* serotypes in liquid whole egg homogenates at 60 °C. *Poultry Sci.* **50**, 1772–1776 (1971).
23. Milone, N. A. and Watson, T. A.: Thermal inactivation of *Salmonella senftenberg* 775 W in poultry meat. *Healt Lab. Sci.* **7**, 213–225 (1970).
24. Liu, T. S., Carlson, V. L. and Snoeyenbos, G. H.: Thermal resistance of smooth and rough derivatives of *Salmonella senftenberg* 775 W. *Poultry Sci.* **47**, 1155–1162 (1968).
25. Verordnung über die hygienisch-mikrobiologischen Anforderungen an Lebensmittel, Gebrauchs- und Verbrauchsgegenstände vom 14. September 1981 (Stand am 1. 4. 1983). Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1983.
26. Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO): Microbiological specifications for foods. Expert Consultation, EC/Microbial/75/Report 1. FAO, Rome 1975.
27. Garibaldi, J. A., Lineweaver, H. and Ijichi, K.: Number of salmonellae in commercially broken eggs before pasteurization. *Poultry Sci.* **48**, 1096–1101 (1969).
28. Davidson, C. M., Boothroyd, M. and Georgala, D. L.: Thermal resistance of *Salmonella senftenberg*. *Nature* **212**, 1060–1061 (1966).
29. 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.

Prof. Dr. W. Schmidt-Lorenz  
 Dr. O. Geiges  
 Laboratorium für Lebensmittelmikrobiologie  
 Institut für Lebensmittelwissenschaft  
 ETH-Zentrum  
 CH-8092 Zürich