

Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
der Technischen Universität München/Weihenstephan

Fachgebiet Haushalts- und Betriebshygiene

Verteilung und Inaktivierung von Mikroorganismen in binären Systemen (Öl-in-Wasser-Emulsionen)

Rita Josefa MILLER

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen
Grades eines

Doktors der Haushalts- und Ernährungswissenschaften
(Dr. oec. troph.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. habil. Antonio Delgado
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Cerny
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Siegfried Scherer

Die Dissertation wurde am 07.02.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und
Umwelt am 14.03.2006 angenommen.

„Ce sont les microbes, qui auront le dernier mot.“
„**Die Mikroben werden das letzte Wort haben.**“

Louis Pasteur (1822 – 1895)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen meiner wissenschaftlichen Tätigkeit am Fachgebiet Haushalts- und Betriebshygiene der Technischen Universität München/Weihenstephan unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Cerny und wäre ohne die Unterstützung von zahlreichen Helfern nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt daher:

- meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Cerny, der mir die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit gab, für seine Betreuung, vielseitige Förderung sowie für die entspannte Arbeitsatmosphäre,
 - Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Siegfried Scherer für sein Interesse an der Arbeit und die Übernahme des Korreferates sowie für die Möglichkeit der Gefriertrocknung der Mikroorganismen,
 - Prof. Dr.-Ing. habil. Antonio Delgado für die Übernahme des Prüfungsvorsitzenden und für die Kooperationsbereitschaft bei der Durchführung der Hochdruckversuche,
 - meinen Kolleginnen Frau Marianne Holzmann und Frau Hannelore Meckl, die mich bei der Durchführung der Versuche und beim Zusammenschreiben der Ergebnisse tatkräftig unterstützt und daher wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben,
 - den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Fluidmechanik und Prozessautomation der TU-München/Weihenstephan Dr.-Ing. Albert Baars, Dipl.-Ing. (FH) Matthias Werner und Dipl.-Ing. (FH) Natalie Pereyra für ihre fachkundige Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Hochdruckversuche und der Viskositätsmessungen,
 - den Mitarbeitern des Zentralinstituts für Ernährungs- und Lebensmittelforschung, Abteilung Mikrobiologie der TU-München/Weihenstephan Frau Gertrud Huith, Evi Lang Halter und Angela Felsl für die Herstellung der gefriergetrockneten Keime und fachkundige Hilfestellung,
 - Dr.-Ing. Patrick Engelhard, ehemals Mitarbeiter des Zentralinstituts für Ernährungs- und Lebensmittelforschung, Lehrstuhl Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie der TU-München/Weihenstephan, für die Unterstützung bei der Anfertigung der mikroskopischen Aufnahmen,
 - Herrn Dipl.-Ing. Wolfgang Teichmann vom Fraunhofer-Institut Freising für die Bereitstellung des Randwinkelmeßgerätes,
 - und bei den zahlreichen Korrekturlesern/innen für die unermüdliche Fehlersuche und die moralische Unterstützung, der Kaffee-Runde auf dem Stockwerk für die netten Gespräche und meiner Familie für ihre Unterstützung.
-

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....		IV
Abkürzungsverzeichnis.....		VIII
Tabellenverzeichnis.....		IX
Abbildungsverzeichnis.....		X
1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....	1
2	GRUNDLAGEN UND STAND DES WISSENS.....	3
2.1	Charakterisierung der Zelloberfläche von Mikroorganismen.....	3
2.1.1	Die Oberflächenstruktur von Bakterien.....	3
2.1.2	Die Oberflächenstruktur von Hefen und Schimmelpilzen.....	5
2.1.3	Bestimmung der Hydrophobizität der Zelloberfläche.....	6
	2.1.3.1 <i>Kontaktwinkelmessung</i>	8
	2.1.3.2 <i>MATH-TEST</i>	8
2.2	Mikrobiologie von Emulsionen.....	9
2.2.1	Verteilung von Mikroorganismen in Emulsionen und zwischen zwei nicht mischbaren Substanzen.....	9
2.2.2	Wachstum von Mikroorganismen in ölhaltigen Systemen.....	10
	2.2.2.1 <i>Öl-in-Wasser-Emulsionen</i>	10
	2.2.2.2 <i>Wasser-in-Öl-Emulsionen</i>	11
2.2.3	Mayonnaise.....	12
2.3	Verfahren zur Haltbarmachung von Lebensmitteln.....	13
2.3.1	Thermische Behandlung.....	13
2.3.2	Hochdruckbehandlung.....	15
2.3.3	Fettsäuren als natürliche Konservierungsstoffe.....	16
3	MATERIAL UND METHODIK.....	20
3.1	Mikroorganismen und Chemikalien.....	20
3.1.1	Testmikroorganismen.....	20
3.1.2	Nähr- und Verdünnungsmedien.....	21
3.1.3	Rohstoffe und Zusätze.....	23
3.2	Mikrobiologische Methoden.....	24
3.2.1	Stammhaltung der Testmikroorganismen.....	24
3.2.2	Kultivierung und Herstellung der Gebrauchssuspensionen.....	24
3.2.3	Bestimmung der Lebendkeimzahl.....	26
3.3	Bestimmung der Hydrophobizität von Mikroorganismen.....	27
3.3.1	Messung des Kontaktwinkels.....	27
3.3.2	Durchführung des MATH-Tests.....	29

3.4	Untersuchungen zur Verteilung von Mikroorganismen in Emulsionen.....	29
3.4.1	Herstellung der Emulsionen.....	29
3.4.2	Gewinnung der Öl- und Wasserphase.....	31
3.4.3	Charakterisierung der Emulsionen sowie der einzelnen Phasen nach der Trennung.....	31
3.4.3.1	<i>Bestimmung der Tröpfchengröße.....</i>	<i>31</i>
3.4.3.2	<i>Bestimmung des Restwassergehalts bzw. des Restölgehalts in den Phasen.....</i>	<i>31</i>
3.5	Vergleichende Untersuchungen mit Wasser, Öl und Mayonnaise.....	32
3.5.1	Vorbereitung der Testmikroorganismen und Proben.....	32
3.5.1.1	<i>Gefriertrocknung der Mikroorganismen.....</i>	<i>32</i>
3.5.1.2	<i>Animpfen der Proben.....</i>	<i>32</i>
3.5.1.3	<i>Herstellung der Mayonnaise.....</i>	<i>33</i>
3.5.2	Durchführung der Lagerversuche bei 7°C.....	33
3.5.3	Durchführung der Erhitzungsversuche.....	34
3.5.4	Durchführung der Hochdruckversuche.....	34
3.6	Bestimmung der antimikrobiellen Wirkung von Ölsäure, Caprinsäure und Monolaurin.....	35
3.7	Strukturelle Untersuchung der Mayonnaise.....	36
3.7.1	Bestimmung der Tröpfchengröße.....	36
3.7.2	Bestimmung der Viskosität.....	36
4	ERGEBNISSE.....	37
4.1	Bestimmung der Hydrophobizität der Testmikroorganismen.....	37
4.1.1	Kontaktwinkelmessungen.....	37
4.1.2	MATH-Test.....	38
4.2	Verteilung der Testmikroorganismen in Emulsionen.....	40
4.2.1	Bestimmung der Verteilung der Mikroorganismen in O/W- und W/O-Emulsionen ohne Emulgator.....	41
4.2.2	Bestimmung der Verteilung der Mikroorganismen in O/W-Emulsionen mit Emulgator-Zusatz.....	43
4.2.3	Bestimmung von Einflußfaktoren bei der Verteilung der Mikroorganismen in O/W-Emulsionen.....	44
4.2.3.1	<i>Ölart.....</i>	<i>44</i>
4.2.3.2	<i>Ionenkonzentration in der Wasserphase.....</i>	<i>45</i>
4.2.3.3	<i>Wachstumsphase.....</i>	<i>46</i>
4.3	Gefriertrocknung der Testmikroorganismen und Animpfen des Öls.....	47
4.4	Lagerung der Testmikroorganismen in Wasser, Mayonnaise und Sonnenblumenöl bei 7°C.....	48
4.5	Thermische Behandlung.....	50
4.5.1	Einfluß des Erhitzungsgefäßes auf die Abtötungskinetik von <i>E. coli</i>	50
4.5.2	Auswirkungen des Erhitzungsmediums (entionisiertes Wasser, Mayonnaise und Sonnenblumenöl) auf die Abtötung der Testmikroorganismen....	51
4.5.2.1	<i>L. innocua.....</i>	<i>51</i>
4.5.2.2	<i>Lc. lactis.....</i>	<i>53</i>
4.5.3	Erhitzung von <i>L. innocua</i> in verschiedenen Ölen.....	55

4.5.4	Einsatz von Fettsäuren und Monolaurin als natürliche Konservierungsstoffe.....	57
4.5.4.1	<i>Wirkung von Fettsäuren und Monolaurin in Nährbouillon bei 37°C.....</i>	<i>57</i>
4.5.4.2	<i>Wirkung von Fettsäuren und Monolaurin bei der Pasteurisation von Mayonnaise auf L. innocua, Lc. lactis und E. coli.....</i>	<i>59</i>
4.6	Hochdruckbehandlung.....	62
4.6.1	Auswirkungen des Umgebungsmediums (entionisiertes Wasser, Mayonnaise und Sonnenblumenöl) auf die Abtötung der Testmikroorganismen.....	62
4.6.1.1	<i>L. innocua.....</i>	<i>62</i>
4.6.1.2	<i>Lc. lactis.....</i>	<i>65</i>
4.6.2	Abtötung von <i>L. innocua</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>P. anomala</i> und <i>Asp. niger</i> in Sonnenblumenöl durch Hochdruckbehandlung bei 600 und 800 MPa ohne Druckhaltezeit.....	67
4.6.3	Strukturelle Veränderungen in der Mayonnaise nach einer Hitze- bzw. einer Hochdruckbehandlung.....	68
4.6.3.1	<i>Mikroskopische Betrachtung.....</i>	<i>68</i>
4.6.3.2	<i>Messung der rheologischen Eigenschaften.....</i>	<i>70</i>
5.	DISKUSSION.....	71
5.1	Charakterisierung der Zelloberfläche von Mikroorganismen.....	71
5.2	Beurteilung der Verteilung von Mikroorganismen in Emulsionen.....	75
5.2.1	Einflußfaktoren auf die Verteilung in Emulsionen.....	77
5.2.2	Vergleich zwischen der Hydrophobizität und der Verteilung von Mikroorganismen in Emulsionen.....	79
5.3	Lagerstabilität von Mikroorganismen in Öl und Mayonnaise.....	80
5.4	Verfahren zur Haltbarmachung von Lebensmitteln im Vergleich.....	81
5.4.1	Thermische Inaktivierung von Mikroorganismen in Abhängigkeit vom Umgebungsmedium.....	81
5.4.2	Wirkung von Fettsäuren und Fettsäureestern bei der thermischen Inaktivierung.....	86
5.4.3	Druckinaktivierung von Mikroorganismen in Abhängigkeit vom Umgebungsmedium.....	87
5.4.4	Strukturelle Veränderungen durch Hochdruck.....	92
5.4.5	Vergleich zwischen der thermischen Behandlung und der Hochdruckbehandlung.....	93
6	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY.....	97
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	101

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Mikroorganismen (Gattungen)

<i>A.</i>	<i>Alicycobacillus</i>
<i>Asp.</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>P.</i>	<i>Pichia</i>
<i>Pen.</i>	<i>Penicillium</i>
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>

Sonstiges

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection, Rockville/Maryland, USA
a_w -Wert	Wasseraktivität
BAM	<i>Bacillus acidocaldarius</i> Medium
BATH-Test	bacterial adhesion to hydrocarbons Test
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff(atom)
ca.	circa
CaSo-Bouillon	Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon
cm	Zentimeter
CPB	Cetylpyridiniumbromid
d	Tag(e)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
d. h.	das heißt
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig Deutschland
ention.	entionisiert(es)
g	Gramm
GC-Agar	Glucose-Caseinpepton-Agar
Gew.-%	Gewichtsprozent
GKZ	Gesamtkeimzahl
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HPG-Agar	Hefeextrakt-Pepton-Glucose-Agar
K	Kelvin
Kap.	Kapitel
KbE	Koloniebildende Einheiten
l	Liter
M	Molar (mol/l)
MATH-Test	microbial adhesion to hydrocarbons Test
max.	maximal
Max	Maximum

mg, ml, mm,	Milligramm, Milliliter, Millimeter,
mM	Milli-Mol
min	Minute(n)
Min	Minimum
MPa	MegaPascal
MRS-Agar	<i>Lactobacillus</i> Nährboden nach de Man, Rogosa und Sharpe
NaCl	Natriumchlorid
O/W	Öl in Wasser
OD	optische Dichte
org.	organisch
PC-Agar	Plate-Count-Agar
pH	pondus Hydrogeni
ppm	part per million
sec	Sekunde
SLS	sodiumlaurylsulfate (englisch) = Natriumdodecylsulfat
sp.	Species
spp.	Species (plural)
ssp.	Subspecies
Tab.	Tabelle
TU	Technische Universität
U/min	Umdrehungen pro Minute
V/V	Volumen/Volumen
vgl.	vergleiche
Vol.-%	Volumenprozent
W/O	Wasser in Öl
WS	Weihenstephaner Stammsammlung, Freising, Deutschland
WSMC	Weihenstephaner Stammsammlung mould culture
WSYC	Weihenstephaner Stammsammlung yeast culture
z. B.	zum Beispiel
µm, µM	Mikrometer, Mikro-Mol
Ø	Durchschnitt
%	Prozent
°C	Grad Celsius

TABELLENVERZEICHNIS

Beschriftung	Seite
Tab. 2-1: Zusammenstellung der unterschiedlichen Oberflächenstrukturen gram-positiver und gram-negativer Bakterien (zum Teil mit Mengenangaben) [KABARA, 1978; MARTIENSSEN, 2001; MÜLLER UND WEBER, 1996]	4
Tab. 2-2: Bestandteile der Bakteriensporenwand und deren Zusammensetzung	5
Tab. 2-3: Charakteristische Komponenten der Zellwand von Hefen und Schimmelpilzen zum Teil mit Mengenangaben in % des Zellwandtrockengewichts [nach KABARA, 1978; KOCKOVA-KRATOCHVILOVA, 1990; RUIZ-HERRERA, 1992]	6
Tab. 2-4: Methoden zur Bestimmung der Hydrophobizität von Mikroorganismen	7
Tab. 2-5: Wirkung von Fettsäuren auf verschiedene Mikroorganismen	18
Tab. 3-1: Zusammenstellung der verwendeten Testkeime	20
Tab. 3-2: Zusammenstellung der verwendeten Nährmedien und Lösungen	21
Tab. 3-3: Zusammenstellung der verwendeten Pflanzenöle	23
Tab. 3-4: Zutaten für die Herstellung der Mayonnaise	23
Tab. 3-5: Zusätze zu der Mayonnaise	23
Tab. 3-6: Anzuchtbedingungen der Testkeime	24
Tab. 3-7: Verwendete Nährböden und Nachweisverfahren für die Lebendkeimzahlbestimmung	26
Tab. 3-8: Übersicht über die Herstellung der unterschiedlichen Emulsionen zur Bestimmung der Verteilung der Testkeime in Emulsionen	30
Tab. 3-9: Zutaten für die Herstellung von 100 g Mayonnaise (Rezept nach CERNY ET AL., 1983)	33
Tab. 4-1: Die errechneten Kontaktwinkel aus der Höhe und Breite eines Wassertropfens (bidestilliert) auf einer Bakterien- oder Schimmelpilzschicht zur Bestimmung der Hydrophobizität der Zelloberfläche von Mikroorganismen	37
Tab. 4-2: Prozentualer Anteil an Mikroorganismen, die in der Wasserphase (entionisiertes Wasser oder 0,9 %ige Kochsalzlösung pH 4) verblieben sind, bei Durchführung des MATH-Tests zur Bestimmung der Hydrophobizität der Zelloberfläche	38
Tab. 4-3: Prozentuale Wiederfindung der Mikroorganismen in der Wasserphase in O/W- und W/O-Emulsionen (Sonnenblumenöl/entionisiertes Wasser) ohne Zugabe von Emulgatoren	41
Tab. 4-4: Prozentuale Wiederfindung der Mikroorganismen in der Wasserphase in O/W-Emulsionen (Sonnenblumenöl/entionisiertes Wasser) mit Zugabe des Emulgators Natriumdodecylsulfat	42

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Beschriftung	Seite
Abb. 3-1: Wassertropfen auf einer Schicht von <i>Asp. niger</i> -Konidien zur Bestimmung des Randwinkels nach der Parametermethode	27
Abb. 3-2: Liegender Wassertropfen mit Scheitelhöhe <i>h</i> und Basisdurchmesser <i>d</i>	28
Abb. 4-1: Mikroskopische Aufnahme einer O/W-Emulsion ohne Emulgator, einer W/O-Emulsion ohne Emulgator und einer O/W-Emulsion mit Natriumdodecylsulfat als Emulgator in 1000-facher Vergrößerung	39
Abb. 4-2: Einfluß der Ölart auf die Verteilung der Testkeime in der Wasser- und Ölphase von O/W-Emulsionen	43
Abb. 4-3: Einfluß der Ionenkonzentration auf die Verteilung von <i>E. coli</i> in der Wasser- und Ölphase von O/W-Emulsionen (Sonnenblumenöl/entionisiertes Wasser)	44
Abb. 4-4: Einfluß der Wachstumsphase auf die Verteilung von <i>E. coli</i> in der Wasser- und Ölphase von O/W-Emulsionen (Sonnenblumenöl/entionisiertes Wasser)	45
Abb. 4-5: Keimzahlreduktion von <i>L. innocua</i> , <i>Lc. lactis</i> und <i>Asp. niger</i> in Phosphatpuffer, entionisiertem Wasser, Leitungswasser, Sonnenblumenöl und Mayonnaise während einer Kühlagerung bei 7°C (Keimzahlen für Mayonnaise in KbE/g, für wäßrige Lösungen und für Öl in KbE/ml)	48
Abb. 4-6: Einfluß des Erhitzungsgefäßes (Duran®- oder Fiolax®-Reagenzgläser der Firma Schott) sowie eine Ultraschall- oder Ultraturrxbehandlung auf die thermische Abtötung von <i>E. coli</i> bei 60°C in entionisiertem Wasser	49
Abb. 4-7: Thermische Abtötung von <i>L. innocua</i> in entionisiertem Wasser, Mayonnaise und Sonnenblumenöl bei 55 und 60°C (Keimzahlen für Mayonnaise in KbE/g, für wäßrige Lösungen und Öl in KbE/ml)	51
Abb. 4-8: Thermische Abtötung von <i>Lc. lactis</i> in entionisiertem Wasser, Mayonnaise und Sonnenblumenöl bei 50, 55 und 60°C (Keimzahlen für Mayonnaise in KbE/g, für wäßrige Lösungen und Öl in KbE/ml)	53
Abb. 4-9: Thermische Abtötung von <i>L. innocua</i> in Sonnenblumenöl bei 70 und 80°C (N/N ₀ = Endkeimzahl/Ausgangskeimzahl)	54
Abb. 4-10: Einfluß der Ölart und -eigenschaften (Lagerzeit) auf die thermische Abtötung von <i>L. innocua</i> bei 70°C (N/N ₀ = Endkeimzahl/Ausgangskeimzahl)	55
Abb. 4-11: Wirkung von Fettsäuren, zusätzlich für <i>L. innocua</i> und <i>Lc. lactis</i> die Wirkung von Monolaurin, gelöst in Alkohol auf verschiedene Mikroorganismen in CaSo-Bouillon bei 37°C nach 10 min (Kon. = Kontrolle: Bouillon ohne Fettsäure oder Fettsäurederivat)	57
Abb. 4-12: Wirkung von Fettsäuren bei der thermischen Abtötung von <i>L. innocua</i> in Mayonnaise bei 55°C	58
Abb. 4-13: Wirkung von Fettsäuren bei der thermischen Abtötung von <i>Lc. lactis</i> in Mayonnaise bei 50°C	59
Abb. 4-14: Wirkung von Fettsäuren bei der thermischen Abtötung von <i>E. coli</i> in Mayonnaise bei 50°C	59
Abb. 4-15: Wirkung von Monolaurin bei der thermischen Abtötung von <i>L. innocua</i> in Mayonnaise bei 55°C	60
Abb. 4-16: Abtötung von <i>L. innocua</i> durch Hochdruck in verschiedenen Medien, bei unterschiedlichen Drücken	62
Abb. 4-17: Abtötung von <i>L. innocua</i> durch eine Hochdruckbehandlung bei 500 MPa in Mayonnaise mit und ohne 0,2 % Natriumbenzoat	63
Abb. 4-18: Keimzahlveränderung von <i>L. innocua</i> nach einer Hochdruckbehandlung bei 500 MPa ohne Haltezeit nach einer Lagerung bei 7°C für 24 h	63

Abb. 4-19: Abtötung von <i>Lc. lactis</i> durch Hochdruck in verschiedenen Medien, bei unterschiedlichen Drücken	65
Abb. 4-20: Abtötung der Testmikroorganismen durch Hochdruck bei 600 und 800 MPa in Sonnenblumenöl ohne Druckhaltezeit	66
Abb. 4-21: Mikroskopische Aufnahmen der Mayonnaise vor und nach einer Hitzebehandlung bei 60°C für 30 min in 1000-facher Vergrößerung	67
Abb. 4-22: Mikroskopische Aufnahmen der Mayonnaise vor und nach einer Hochdruckbehandlung bei 500 MPa für 15 min in 1000-facher Vergrößerung	68
Abb. 4-23: Viskosität von unterschiedlich behandelte Mayonnaise: unbehandelt, erhitzt bei 60°C für 30 min und hochdruckbehandelt bei 500 MPa für 15 min	69

Anmerkung: Vorliegende Dissertation wurde auf Wunsch der Verfasserin mit Zustimmung beider Gutachter gemäß der alten Rechtschreibung angefertigt.

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Die meisten Lebensmittel bieten aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung gute Bedingungen für das Wachstum und die Vermehrung von Mikroorganismen. Daher wird versucht, durch unterschiedliche physikalische, chemische und biologische Verfahren die Haltbarkeit von Lebensmitteln zu verlängern. Die Wirkung dieser Verfahren ist zum einen von der Resistenz der Mikroorganismen, zum anderen von der Zusammensetzung des Lebensmittels abhängig. Der pH-Wert, der a_w -Wert, das Redoxpotential, die Verfügbarkeit von Nähr- und Wuchsstoffen einschließlich Spurenelementen, die Anwesenheit von antimikrobiellen Substanzen, der Zucker-, Salz-, Protein- und Fettgehalt des Lebensmittels spielen dabei eine Rolle. Vielfach nachgewiesen ist die schützende Eigenschaft von Fetten und Ölen bei der Hitzeinaktivierung von Mikroorganismen [CERNY UND HENNLICH, 1983; JENSEN, 1942; ZUCCARO ET AL., 1951]. Dies gilt vor allem für Bakteriensporen [SENHAJI, 1977; SENHAJI UND LONCIN, 1977; ABABOUC ET AL., 1995; MOLIN UND SNYGG, 1967] aber auch für vegetative Bakterien [SENHAJI UND LONCIN, 1977], Schimmelpilze [BRÖKER ET AL., 1987] und Hefen [ZUCCARO ET AL., 1951]. Aufgrund der Schutzwirkung von Fett ist es möglich, daß bei üblichen Sterilisations- und Pasteurisationsbedingungen saprophytäre und eventuell pathogene Keime überleben können [MOLIN UND SNYGG, 1967]. Sie stellen, solange sie in der Ölphase verbleiben, kein Problem dar, weil in dieser Phase kein Wachstum und keine Vermehrung stattfindet. Bei ungünstigen Bedingungen, z. B. bei kräftigem Schütteln, durch Scherkräfte beim Abfüllen oder durch Transporterschütterungen, können sie aus dem Fett in die Wasserphase übergehen [RODENBECK, 1933]. Dieser Phasenwechsel ist bei Konservenwaren kaum zu befürchten, kann aber in Aluminium-Weichpackungen, die im Gegendruckautoklaven zum Schutz der Siegelnähte sterilisiert werden müssen, auftreten. Vor allem bei der anschließenden Dichtigkeitsprüfung werden unter Umständen große Scherkräfte durch starke Druckunterschiede ausgeübt, die einen Phasenübergang der Bakteriensporen von der Öl- in die Wasserphase bewirken können und wodurch es dann zum Verderb des Lebensmittels kommen kann.

Worauf die verringerte thermische Abtötung in Fetten, Ölen und fetthaltigen Lebensmitteln zurückzuführen ist, wurde noch nicht genau geklärt. Man nimmt an, daß unterschiedliche Faktoren eine Rolle spielen: So besitzen Fette und Öle eine geringe Wärmeleitfähigkeit. Diese Tatsache ist jedoch nach SLESAREWSKI [1931] von untergeordneter Bedeutung. Ausschlaggebender sei, daß in Fetten und Ölen aufgrund des geringen Wassergehaltes trockenthermische Bedingungen vorherrschen. Speisefette zum Backen haben z. B. einen maximalen Wassergehalt von 0,2 % [MÜLLER ET AL., 1997]. Die Mikroorganismen kommen eingeschlossen im Fett oder Öl nicht direkt mit dem Wasserdampf in Kontakt, und befinden sich dadurch unter ähnlichen

physikalischen Verhältnissen, wie beim Erhitzen mit trockener Wärme. Auch trocknen Mikroorganismen, die mit Fett oder Öl umhüllt sind, aus. Durch den geringen Wassergehalt in der Zelle und der Zellmembran denaturieren die vorhandenen Eiweißstrukturen erst bei höheren Temperaturen. Indirekte Schutzfaktoren bei der Hitzeabtötung in fetthaltigen Emulsionen sind nach PRÄNDL [1976] die freien Fettsäuren sowie die Mono- und Diglyceride. Sie können insofern das Überleben der Mikroorganismen fördern, indem sie das Eindringen der Mikroorganismen in die Ölphase durch ein Herabsetzen der Grenzflächenspannung erleichtern.

Die erhöhte Widerstandsfähigkeit von Mikroorganismen in Fetten und Ölen muß bei der Sterilisation und Pasteurisation von fettreichen Lebensmitteln in Betracht gezogen werden, auch wenn sich eine erschwerte Inaktivierung nicht immer nachweisen läßt. So konnte SMITH ET AL. [1976] keine veränderte Hitzeabtötung durch die Erhöhung des Fettgehalts von Brühwürsten feststellen. Dies zeigt, daß Lebensmittel sehr komplexe Systeme sind, und sich Einzelergebnisse nur schwer übertragen lassen.

Das Bestreben der vorliegenden Arbeit war, durch weitere Untersuchungen ein besseres Verständnis für die schützende Funktion von Fetten und Ölen zu liefern. Es wurde das Verteilungsverhältnis von ausgewählten Mikroorganismen in Emulsionen bestimmt und mögliche Einflußfaktoren (Emulsionstyp, Ölart, Ionenkonzentration oder Wachstumsphase der Mikroorganismen) auf die Verteilung ermittelt. Auch wurde überprüft, ob über die Bestimmung der Hydrophobizität von Mikroorganismen mittels Randwinkelmessungen und MATH-Tests Rückschlüsse auf die tatsächliche Verteilung in einer Emulsion gezogen werden können.

Des weiteren sollten im zweiten Teil der Arbeit durch praxisorientierte Versuche weitere Möglichkeiten aufgezeigt werden, wie die mikrobiologische Stabilität von Mayonnaiseprodukten erhöht werden kann. Normalerweise treten bei den im Handel erhältlichen Mayonnaisen kaum mikrobiologische Probleme auf, da es sich bei Mayonnaise durch den niedrigen pH- und a_w -Wert, den hohen Ölanteil und den zugegebenen Konservierungsstoffen um ein mikrobiologisch relativ sicheres Produkt handelt. Um jedoch der Verbrauchererwartung nach kalorienarmen und naturbelassenen Lebensmitteln gerecht zu werden, versucht man den Anteil an Öl und chemischen Konservierungsstoffen zu senken, wodurch der mikrobielle Verderb begünstigt wird. Ein weiteres Problem bei fettreichen Emulsionen ist die geringe thermische Beständigkeit. Bei zu starker Erhitzung kann es zu Emulsionsbruch (Phasentrennung) und abiotischen Veränderungen (z. B. Fettoxidationen) kommen [CERNY UND HENNLICH, 1983]. Daher wurde untersucht, ob die Hochdruckbehandlung eine Alternative zur Pasteurisation von Mayonnaise ist und ob durch den Zusatz von Fettsäuren im Sinne von „natürlichen Konservierungsstoffen“ die Hitzeabtötung bei niedrigeren Temperaturen verbessert werden kann.

2 GRUNDLAGEN UND STAND DES WISSENS

2.1 Charakterisierung der Zelloberfläche von Mikroorganismen

Die Zelloberflächen von Bakterien, Schimmelpilzen und Hefen sind sehr komplex aufgebaut. Sie bestehen aus heterogenen, dreidimensionalen Strukturen unterschiedlicher Zusammensetzung. Dabei finden sich einerseits Strukturelemente, die für eine große Gruppe von Organismen charakteristisch sind, andererseits sind einige Bestandteile auf wenige Arten oder gar nur auf einzelne Stämme begrenzt.

2.1.1 Die Oberflächenstruktur von Bakterien

Bakterien sind von einer Zellwand umgeben, die der Zelle Form und Stabilität verleiht. Ein typischer Bestandteil für Bakterien ist eine starre Schicht aus Murein (= Peptidoglycan). Die Mureinschicht ist aus Polysaccharidketten aufgebaut (Bausteine: N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure, alternierend β -1,4-glucosidisch verknüpft). Die Ketten sind über Oligopeptide quervernetzt. Je nach Bakterium variieren die Aminosäuren innerhalb der Oligopeptide.

Aufgrund der Dicke und chemischen Zusammensetzung der Mureinschicht unterteilt man Bakterien in zwei große Gruppen. Diese Einteilung basiert auf der Gramfärbung.

Die **gram-positiven Bakterien** sind blau/violett anfärbbar und besitzen eine dicke Mureinmatrix, die 30 bis 50 % der Trockenmasse der Zellwand ausmacht [MÜLLER UND WEBER, 1996].

Die **gram-negativen Bakterien**, die mit Fuchsin rot gegengefärbt werden können, haben ein einschichtiges, maximal zweischichtiges Mureinnetz, das lediglich 5 bis 10 % des Zellwandtrockengewichts ausmacht. Dafür besitzen sie zusätzlich noch eine äußere Membran, die aus Lipopolysacchariden, Phospholipiden und Proteinen besteht [MÜLLER UND WEBER, 1996]. Aufgebaut ist diese äußere Membran als Lipid-Doppelschicht (aus Phospholipiden), an denen Lipopolysaccharide angelagert sind. Diese sind dreigeteilt: Über die Lipid A-Zone ist das Lipopolysaccharid in der äußeren Membran verankert. Darauf folgt die Kernzone (Polysaccharid) und eine hydrophile, O-spezifische Heteropolysaccharidseitenkette. Die chemische Struktur der Lipopolysaccharide ist äußerst vielfältig und stammspezifisch. Einige Lipopolysaccharide sind toxisch für den Menschen (Endotoxine der Salmonellen oder Shigellen) und werden bei der Lyse der Zellen im Darm freigesetzt.

Tab. 2-1: Zusammenstellung der unterschiedlichen Oberflächenstrukturen gram-positiver und gram-negativer Bakterien (zum Teil mit Mengenangaben) [KABARA, 1978; MARTIENSSSEN, 2001; MÜLLER UND WEBER, 1996]

Bestandteil	gram-positive Bakterien	gram-negative Bakterien
Mureinnetz	20 – 80 nm dick bis zu 40 Schichten (entspricht 30 – 50 % des Zellwand- trockengewichts)	10 - 15 nm dick 1 - 2 Schichten (entspricht 5 - 10 % des Zellwand- trockengewichts)
Proteine	nur in geringen Mengen vorhanden	mehr als bei gram-positiven Bakterien
Aminosäuren	4 – 5 unterschiedliche Aminosäuren	viele verschiedene Aminosäuren
Polysaccharide	nur in sehr geringen Mengen vorhanden	mehr als bei gram-positiven Bakterien
Lipide, (Lipopolysaccharide, Lipoproteine)	Gehalt sehr niedrig; Ausnahmen sind Mycobakterien oder Corynebakterien	mehr als bei gram-positiven Bakterien (ca. 15 % der Zellwand besteht aus Lipiden); Lipoproteine in der Mureinschicht, Lipopolysaccharide in der äußeren Membran
Teichonsäuren	vorhanden, gebunden an die Mureinschicht	kein Bestandteil der Zellwand
Teichuronsäuren	vorhanden, gebunden an die Mureinschicht	kein Bestandteil der Zellwand
Lipoteichonsäuren	vorhanden	kein Bestandteil der Zellwand
äußere Membran	keine	vorhanden, besteht aus einer Lipiddoppelschicht (Lipopolysaccharide, Phospholipide und Proteine)

Weitere wichtige Strukturelemente, wodurch sich die gram-positiven und gram-negativen Bakterien unterscheiden sind in Tabelle 2-1 zusammengefaßt. Je nach Zusammensetzung der Zellhülle sind die Bakterien mehr oder minder hydrophob. Zusätzlich werden die Eigenschaften der Zellen durch verschiedene Kapseln, Schleime, Fimbrien und Flagellen, die sich auf der Zelloberfläche befinden, beeinflußt [MARTIENSSSEN, 2001].

Durch Proteine mit vielen hydrophoben Seitenketten, Lipide und Fimbrien wird die Hydrophobizität von Bakterien erhöht [KOHLEWEYER, 2000; KORHONEN ET AL., 1980]. Unter den Polysacchariden verstärken die Teichonsäuren [ARCHIBALD ET AL., 1993], die häufig eng mit Lipiden verbunden sind (= Lipoteichonsäuren), die hydrophoben Eigenschaften der Zellwände [KOHLEWEYER, 2000; MARTIENSSSEN, 2001]. Allgemein verleihen jedoch Polysaccharide und Proteine den Bakterien hydrophilen Charakter [DAFFONCHIO ET AL., 1995].

Bestimmte Mikroorganismen, so z. B. Bakterien, die sich auf den Abbau von aliphatischen Kohlenwasserstoffen zur Energiegewinnung spezialisiert haben, sind in der Lage, sogenannte Biotenside zu produzieren z. B. *Alicanivorax borkumensis*. Dieses aerobe, gram-negative Meeresbakterium produziert ein Glucoselipid-Tensid, welches in zwei Formen vorkommt. Als Biotensidvorläufer ist es mit der Zelloberfläche verbunden und erhöht dadurch die Hydrophobizität der Zelle und ihre Affinität zu den in der Wasserphase gelösten Öltröpfchen, als ausgereiftes, extrazelluläres Biotensid bildet es mit den nicht wasserlöslichen Ölfractionen Mizellen, wodurch die Bioverfügbarkeit erhöht wird [ABRAHAM ET AL., 1998].

Zur Bildung von Bakteriosporen sind nur wenige Gattungen fähig z. B. *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*, *Desulfotomaculum* und *Oscillospira* [MÜLLER UND WEBER, 1996]. Die Endosporen stellen ein Ruhestadium dar. Sie sind durch ihre spezielle Struktur sehr widerstandsfähig gegen ungünstige Umwelteinflüsse wie Hitze, Kälte, Strahlung, Trockenheit und chemische Einflüsse. Außen sind sie von einer mehrschichtigen Sporenhülle umgeben, darauf folgen die Sporenzellwand und die Sporenrinde (Cortex). Bei einigen *Bacillus*-Species (*B. cereus*) kommt es zur Bildung einer weiteren Sporenhülle dem Exosporium (= dünne Proteinschicht). Cortex und die äußeren Sporenhüllen nehmen etwa die Hälfte des Volumens von reifen Sporen ein. Der Aufbau der einzelnen Schichten ist in Tabelle 2-2 beschrieben.

Tab. 2-2: Bestandteile der Bakteriosporenwand und deren Zusammensetzung

Schicht	Zusammensetzung
Exosporium	dünne, zarte Proteinschicht; nur bei speziellen Bakterien
Sporenhülle (Coat)	mehrere Schichten aus sporenspezifischen Proteinen
Sporenrinde (Cortex)	aus locker quervernetzten Peptidoglykan ähnlich dem Murein
Sporenzellwand (Core-Wand)	übliche Zellwand

Die hohe Widerstandsfähigkeit der Bakteriosporen wird zum einen auf den niedrigen Wassergehalt 15 bis 20 %, zum anderen auf den Gehalt an Ca^{++} -Ionen und Dipicolinsäure (bis zu 15 % in der Trockenmasse von Bakteriosporen) zurückgeführt [MÜLLER UND WEBER, 1996].

2.1.2 Die Oberflächenstruktur von Hefen und Schimmelpilzen

Hefen und Schimmelpilze gehören zur großen Gruppe der Eukaryonten. Sie besitzen einen echten Zellkern. Alle Pilze, die ein sichtbares Mycel bilden, werden unabhängig von ihrer systematischen Zugehörigkeit als Schimmelpilze bezeichnet. Diese benötigen für ihr Wachstum normalerweise Sauerstoff. Bei den Hefen oder Sproßpilzen (Protoascomyceten oder Endomyceten) handelt es sich um überwiegend einzellig wachsende Pilze mit einem Durchmesser von 5 bis 10 μm , die kein Mycel bilden, normalerweise unter anaeroben Bedingungen auf Gärung umstellen (Ausnahmen z. B. *Rhodotorula*) und bei stark gehemmten Wachstum Ethanol und Kohlendioxid produzieren [KRÄMER, 2002].

Die Zellwand von Hefen und Schimmelpilzen setzt sich aus mindestens zwei oder mehr Proteinpolysacchariden, die über kovalente Bindungen miteinander verbunden sind, zusammen. Zu den art- oder zell-linientypischen Zellwandstrukturen gehören einige Saccharide und Proteinstrukturen, die hochspezifisch sind.

Hefen sind je nach Aufbau der Zellwandbestandteile hydrophil bis leicht hydrophob. Einige Pilze, vor allem aber die Konidien sporen sind sehr hydrophob, weil sie große Anteile an Lipiden und Wachse in der äußeren Schicht aufweisen [RUIZ-HERRERA, 1992].

Tab. 2-3: Charakteristische Komponenten der Zellwand von Hefen und Schimmelpilzen zum Teil mit Mengenangaben in % des Zellwandtrockengewichts [nach KABARA, 1978; KOCKOVA-KRATOCHVILOVA, 1990; RUIZ-HERRERA, 1992]

Verbindung	Hefen	Schimmelpilze
Polysaccharide (ca. 80 %)		
<ul style="list-style-type: none"> Mannan aus Mannose und anderen Einfachzuckern 	bis zu 30 %, oft mit Proteinen und Lipiden verbunden	kein Bestandteil
<ul style="list-style-type: none"> Glucan aus Glucose 	bis zu 30 %	Bestandteil
<ul style="list-style-type: none"> Chitin aus N-Acetylglucosamine 	geringe Mengen	charakteristisches Polysaccharid der Membran, zum Teil Hauptbestandteil
<ul style="list-style-type: none"> Cellulose aus Glucose 	kein Bestandteil	charakteristisch für <i>Oomycetes</i> und <i>Chithridiomycetes</i>
<ul style="list-style-type: none"> Chitosan aus Glucosamine 	kein Bestandteil	charakteristisch für <i>Zygomycetes</i>
Proteine (3 – 20 %)	ca. 13 %	Bestandteil, Ausnahmen mit hohem Gehalt z. B. <i>Pen. notatum</i> 30 %
Lipide (1 – 10 %)	ca. 8,5 %	hohe Gehalte bei <i>Aspergillus spp.</i> (18,9 %) hohe Anteile in Konidien sporen, auch Wachse → hydrophob
Pigmente z. B. Melanin	Bestandteil	Spezielle Schimmelpilze, vor allem bei Sporen
Anorganische Salze Kationen oder Anionen Ca ⁺⁺ , K ⁺ , Fe ⁺⁺ , Cl ⁻ , Cu ⁺⁺	geringe Mengen	geringe Mengen
Sterole z. B. Ergosterole	geringe Anteile	wichtige Membranbestandteile; <i>Oomycetes</i> enthalten keine Sterole

2.1.3 Bestimmung der Hydrophobizität der Zelloberfläche

Es existiert keine allgemeingültige Definition für die Hydrophobizität von Mikroorganismen, jedoch gibt es zahlreiche Methoden (vgl. Tab. 2-4), um Mikroorganismen in mehr oder weniger hydrophobe Stämme einzuteilen. Es handelt sich dabei immer um indirekte Bestimmungsmethoden, die zum Teil sehr unterschiedliche Ergebnisse liefern [vgl. MOZES UND ROUXHET, 1987; DONLON UND COLLERAN, 1993]. Daher ist es wichtig, die verwendete Methode anzugeben [KOHLEWEYER, 2000].

Tab. 2-4: Methoden zur Bestimmung der Hydrophobizität von Mikroorganismen

Methoden	Charakterisierung	Quelle
Phasenverteilungstest	Verteilung von Mikroorganismen in zwei nicht mischbare Phasen: Nach Mischen der Substanzen wird photometrisch die Verteilung bestimmt	ROSENBERG ET AL., 1980
<ul style="list-style-type: none"> MATH-Test (microbial adhesion to hydrocarbons) BATH-Test (bacterial adhesion to hydrocarbons) Weiterentwicklung: „kinetik BATH“-Test 	1. Phase: Wasser/Puffer 2. Phase: Kohlenwasserstoffverbindungen: Hexadekan, n-Oktan, Dextran,	MOZES ET AL., 1991
<ul style="list-style-type: none"> MATS-Test (microbial adhesion to solvents) 	1. Phase: Wasser/Puffer 2. Phase: Lösungsmittel wie Chloroform, Ethyl-Acetat	PELLETIER ET AL., 1997 BELLON-FONTAINE ET AL., 1996
<ul style="list-style-type: none"> TPP-Test (two-phase partitioning) 	Zwei nicht mischbare Wasserphasen, die z. B. Dextran oder Polyethylen-Glykol enthalten	DOYLE UND ROSENBERG, 1995
Hydrophobe Chromatographie HIC-Test (hydrophobic interaction chromatography)	Bestimmung der angehefteten Zellmenge an Phenyl-Sepharose oder Oktyl-Sepharose	MOZES UND ROUXHET, 1987; DONLAN UND COLLERAN, 1993
Salzaggregationstest SAT (salt aggregation test)	Hydrophobe Mikroorganismen bilden Aggregate, wenn sie mit Ammoniumsulfaten gemischt werden; Die Aggregationsbildung kann dann visuell oder durch Trübungsmessung bestimmt werden.	LINDAHL ET AL., 1981
Kontaktwinkelmessung = Randwinkelmessung	Messen des Kontaktwinkels eines Flüssigkeitstropfens (z. B. dest. H ₂ O) auf einer Mikroorganismenschicht	VAN OSS, 1995
Adhäsionstest	Anlagerung von Zellen an hydrophobe Substanzen (bzw. an nichtionische und ionische Substanzen) oder an hydrophobe Oberflächen	FIEDLER UND SATTLER, 1992 VAN LOOSDRECHT ET AL., 1987a
<ul style="list-style-type: none"> direkte Anlagerung 	Kleine Moleküle, wie Dodekansäure, binden an hydrophobe Zellen; Messung erfolgt z. B. durch Markierung der Partikel (radioaktiv)	DOYLE UND ROSENBERG, 1995
<ul style="list-style-type: none"> „hydrophobicity microsphere assay“ 	Anlagerung an „polystyrene latex microspheres“	HAZEN UND HAZEN, 1987
<ul style="list-style-type: none"> Anlagerung an <i>Fusobacterium nucleatum</i> 	Anlagerung an das orale anaerobe Bakterium <i>Fusobacterium nucleatum</i>	JABARA-RIZK ET AL., 2001
Nitrosecellulose-Filter-Test	Durch einen Nitrosecellulose-Filter wird eine Bakteriensuspension mit bekannter optischer Dichte gefiltert und in bezug zu dem Filtrat gesetzt	LEE UND YII, 1996

Einen guten Überblick über die Vor- und Nachteile der meisten genannten Methoden findet man bei MOZES ET AL. [1991] und MARTIENSEN [2001]. In der vorliegenden Arbeit wurden zur indirekten Bestimmung der Hydrophobizität die Kontaktwinkelmessung und der MATH-Test eingesetzt.

2.1.3.1 Kontaktwinkelmessung

Bei der Kontaktwinkelmessung wird der Randwinkel (= Kontaktwinkel) eines Flüssigkeitstropfens auf einem geschlossenen Bakterienfilm bestimmt (vgl. Zeichnung in Kap. 3.3.1).

Für die Messung ist eine möglichst glatte Oberfläche erforderlich, da die Oberflächenrauheit die Ausbreitung des Flüssigkeitstropfens behindern kann und es somit zu einer Verfälschung des Meßergebnisses kommt. Eine Möglichkeit, eine geschlossene Bakterien-schicht zu erhalten, ist die direkte Anzucht eines einheitlichen Mikroorganismenrasens auf einer Agarplatte [DYNESEN UND NIELSEN, 2003], eine andere das Aufziehen von Bakterien auf einen Membranfilter [FIEDLER UND SATTLER, 1992; KOHLWEYER, 2000].

Neben Wasser werden auch andere Verbindungen zur Kontaktwinkelmessung eingesetzt: Formamid, Diethylether, Ethylacetat, Methylenjodid, 1-Bromnaphthalen, Hexadekan oder Chloroform [VAN DER MEI ET AL., 1998].

2.1.3.2 MATH-Test

Das Prinzip des MATH-Tests (microbial adhesion to hydrocarbons) ist die Bestimmung des Verteilungsquotienten von Mikroorganismen zwischen Wasser und einer organischen Phase (z. B. Hexadekan). Dazu wird die Extinktion einer wäßrigen Mikroorganismensuspension gemessen, eine bestimmte Menge an organischem Lösungsmittel dazugegeben und für eine festgelegte Zeit gemischt. Nach der Phasentrennung wird die Extinktion der wäßrigen Phase erneut gemessen und in Bezug zur Ausgangsextinktion gesetzt [FIEDLER UND SATTLER, 1992].

Häufig wird dieser Test auch als BATH-Test (bacterial adhesion to hydrocarbons) bezeichnet. Der BATH-Test wurde von ROSENBERG ET AL. [1980] entwickelt und wird von zahlreichen Forschergruppen teilweise in abgewandelter Form herangezogen, um die Hydrophobizität von Mikroorganismen zu bestimmen. In der ursprünglichen Form bei ROSENBERG ET AL. [1980] wurde die Keimsuspension mit Puffer pH 7,1 hergestellt. Zu 1,2 ml wäßriger Phase wurden unterschiedliche Mengen von Kohlenwasserstoff (n-Hexadekan, n-Oktan, p-Xylen) zugegeben und bei 30°C für 10 min temperiert. Die Durchmischungszeit betrug 120 sec, die Entmischungszeit 15 min und die photometrischen Messungen wurden bei 400 nm durchgeführt. Bei anderen Autoren werden als wäßrige Phase entionisiertes Wasser oder andere Pufferlösungen eingesetzt. Die Menge an Lösungsmittel variiert zwischen ca. 0,8 – 25 % [BUNT ET AL., 1993; FIEDLER UND SATTLER, 1992]. Die Durchmischungszeit beträgt zwischen 10 sec bis 5 min [VAN DER MEI ET AL., 1995; BUNT ET AL., 1993]. Zum Trennen der Phasen werden Zeiten zwischen 10 bis 30 min angesetzt [VAN DER MEI ET AL., 1995; KOHLWEYER, 2000; ROSENBERG ET AL., 1980]. Die photometrischen Messungen erfolgen in einem Bereich zwischen 400 und 700 nm [ROSENBERG ET AL., 1980; KOHLWEYER, 2000; FIEDLER UND SATTLER, 1992]. Auch ist nicht genau festgelegt, ob man als

Verteilungsquotienten den prozentualen Anteil der Mikroorganismen wiedergibt, die im Wasser verblieben sind [DICKSEN UND KOOHMARAIE, 1989] oder den Anteil der vom Hexadekan aufgenommen worden ist [FIEDLER UND SATTLER, 1992].

2.2 Mikrobiologie von Emulsionen

Emulsionen sind disperse Systeme von zwei nicht oder nur schlecht ineinander löslichen Flüssigkeiten. Die innere Phase (disperse Phase) liegt dabei in kleinen Tröpfchen verteilt in der äußeren Phase (Dispersionsmittel) vor. Je nach Phasenlage spricht man von einer „Wasser-in-Öl-Emulsion“ (W/O), z. B. Butter, Margarine, oder einer „Öl-in-Wasser-Emulsion“ (O/W), z. B. Mayonnaise, Milch [BELITZ UND GROSCH, 1992].

2.2.1 Verteilung von Mikroorganismen in Emulsionen und zwischen zwei nicht-mischbaren Substanzen

Über die Verteilung von Mikroorganismen in Emulsionen oder zwei nicht mischbaren Substanzen finden sich in der Literatur wenig Angaben. In den meisten Untersuchungen wurde anhand von mikroskopischen Beobachtungen die Verteilung bestimmt [MUDD UND MUDD, 1924a und 1924b; PARKER, 1995].

ZUCCARO ET AL. [1951] untersuchten mikroskopisch die Migration von Zellen der Gattung *Saccharomyces* zwischen Wasser und Öl. Dazu wurde bei einer Versuchsreihe Wasser, bei einer anderen Öl beimpft und mit Öl bzw. Wasser 1:1 gemischt. Bei beiden Versuchen kam es zum Übergang von der einen in die andere Phase. Wurde das Wasser angeimpft, sind ungefähr 20 % der Hefe-Zellen ins Öl übergegangen. Ein Großteil der Hefen lagerte sich in der Grenzfläche zwischen Wasser und Öl an.

PARKER ET AL. [1995] beobachteten in Hexadekan/Wasser-Emulsionen eine Anreicherung der Bakterien in der oberen Emulsionsschicht, die sich über dem Hexadekan nach dem Aufrahmen gebildet hat. Ähnliches beschrieben BROCKLEHURST ET AL. [1993] (gleiche Arbeitsgruppe wie PARKER) für aufgerahmte O/W-Emulsionen. Auch hier kam es in der aufgerahmten Schicht (d. h. in der Schicht mit dem höchsten Ölanteil) zu einer signifikanten Erhöhung der Bakterienkonzentration. Diese aufgerahmte Schicht bestand aus dicht gepackten Öltröpfchen in einer Wasserphase. Eine mögliche Erklärung ist laut den Autoren, daß beim Aufrahmen der Emulsion durch

die Aggregation der Öltröpfchen die Bakterien passiv an die Öltröpfchen adsorbiert werden und mit dem Öl nach oben steigen, eine andere, daß die Mikroorganismen relativ stark an die Öltröpfchen gebunden sind. Als Begründung für den zweiten Erklärungsversuch führten die Autoren folgende Beobachtung an: Bei Verdünnung der Emulsion konnte mikroskopisch festgestellt werden, daß die Bakterien an den Öltröpfchen anhafteten und nicht mehr frei in der kontinuierlichen Wasserphase vorkamen [BROCKLEHURST ET AL., 1993].

MUDD UND MUDD [1924a und 1924b], die sich verstärkt mit dem Verhalten von Bakterien an der Grenzfläche beschäftigt haben, untersuchten mit einem Schwarz-Feld-Mikroskop, welche Bedingungen den Übergang von Bakterien aus der Grenzfläche in die Wasserphase bzw. organische Phase fördern. Ein Faktor ist hierbei Natrium-Oleat. Als oberflächenaktive Substanz begünstigt es den Übergang von Wasser in die Ölphase [MUDD UND MUDD, 1924b].

Neben Seifen begünstigen auch Fettsäuren und starke Laugen den Übergang von der Wasserphase in die Ölphase [HANSEN UND RIEMANN, 1963]. Die Wirkung dieser Stoffe beruht auf der Senkung der Grenzflächenspannung. Dabei bilden freie Fettsäuren in Gegenwart von Alkalionen grenzflächenaktive Substanzen. Polare Verbindungen, wie Citrate oder Nitrate, behindern dagegen den Übertritt in die Ölphase [HANSEN UND RIEMANN, 1963].

2.2.2 Wachstum von Mikroorganismen in ölhaltigen Systemen

Der Ölanteil in einer Emulsion schützt die Mikroorganismen weitgehend vor physikalischer und chemischer Inaktivierung, isoliert sie aber auch gleichzeitig von Wasser und Nährstoffen. Daher kommt es zu keiner Vermehrung in der Ölphase. Mikroorganismen sind jedoch in der Lage in dieser Phase über einen längeren Zeitraum zu überleben.

Das Wachstum in der Wasserphase wird durch die physikalische Struktur der Emulsion bedingt, d. h. die Wassertropfen müssen eine Mindestgröße aufweisen. Das Wachstum ist jedoch unabhängig vom Typ der Emulsion [BROCKLEHURST ET AL., 1993; BROCKLEHURST ET AL., 1995].

2.2.2.1 Öl-in-Wasser-Emulsionen

Bei diesem Emulsionstyp bildet das Wasser die kontinuierliche Phase in der die Öltröpfchen verteilt sind. Die Größe der Zwischenräume ist abhängig vom Dispersionsgrad der Emulsion und der Ölmenge. Sie liegt häufig im selben Dimensionsbereich wie die Bakteriengröße. Bei Mayonnaise und Salatdressings mit hohem Ölanteil haben die Öltröpfchen und die wäßrigen Zwischenräume einen Durchmesser von ca. 4 – 5 µm, die durchschnittliche Größe von Stäbchenbakterien bewegt sich zwischen 0,04 – 1,5 x 0,5 – 5 µm und für Kokken gilt als

Durchmesser 0,5 – 2 μm [BROCKLEHURST ET AL., 1993]. Bei Emulsionen mit niedrigerem Ölanteil sind die Zwischenräume entsprechend größer.

Die Tropfenzahl/-dichte in der Wasserphase (abhängig vom Gehalt an Öl) beeinflusst dann das Mikroorganismenwachstum wie folgt: Bei einer niedrigen Ölkonzentration (30 % V/V) wachsen die Mikroorganismen frei („planktonic“), bei höheren Konzentrationen (83 % V/V) sind die Bakterien zwischen den Öltröpfchen fixiert und wachsen als einzelne Kolonien. Zum Teil verdrängen die Bakterien durch ihr Wachstum die Öltröpfchen oder wachsen um die Tröpfchen herum [BROCKLEHURST ET AL., 1993]. Das Wachstumsverhalten ist nach BROCKLEHURST ET AL. [1993] aus zwei Gründen interessant. Zum einen haben Mikroorganismen, die als Kolonien wachsen, eine niedrigere Wachstumsrate als Bakterien, die frei in Flüssignährmedien wachsen können, zum anderen sind freiwachsende Bakterien gleichmäßiger im Lebensmittel verteilt. Zum Wachstum in Kolonieform kommt es nur, wenn sich die Bakterien nicht frei bewegen können. Daher besitzen Lebensmittelemlusionen, die einen hohen Ölanteil haben, große Bereiche, die weitgehend frei von Bakterien sind, aber kleine Abschnitte mit sehr hohen Keimdichten.

2.2.2.2 Wasser-in-Öl-Emulsionen

Bei den W/O-Emulsionen sind die Wassertropfen in einer zusammenhängenden Ölschicht verteilt. Nach VERRIPS UND ZAALBERG [1980] wachsen Mikroorganismen nur schwach in diesen Emulsionen im Vergleich zu wäßrigen Lösungen und zwar in einzelnen isolierten, nicht zusammenhängenden Wassertropfen. Eingeschränkt wird das Wachstum durch die geringe Größe der Wassertropfen, durch vorhandene Hemmsubstanzen (wie NaCl) oder durch das begrenzte Angebot an Nährstoffen.

BROCKLEHURST ET AL. [1993] konnten jedoch zeigen, daß es durch Koaleszenz der einzelnen Wassertropfen zu Raum-, Wasser- und Nährstoffweiterung kommt, und daß das Wachstum nicht auf die ursprünglich kontaminierten Tropfen beschränkt bleibt. Des weiteren wurde nachgewiesen, daß es innerhalb der Wassertropfen, entgegen der ursprünglichen Annahme, zu einem extremen Anstieg der Keimzahl kommen kann. Begründet wird diese Beobachtung folgendermaßen: Das Wachstum von Mikroorganismen wird entweder begrenzt durch die Endprodukte des Metabolismus, die als Hemmstoffe wirken (z. B. organische Säuren), oder durch Mangel an Substanzen, die zum Wachstum notwendig sind (z. B. Nährstoffe, Wasser, Sauerstoff). Die Ölphase einer Emulsion kann nun die Konzentration an organischen Säuren verringern und damit ein verstärktes Wachstum begünstigen. Des weiteren haben Öle, die in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden, ein gutes Sauerstoffbindungsvermögen (im Vergleich zu Wasser ist es 20 bis 30 mal größer), daher neigen Öle zur Autoxidation („Ranzigkeit“). Nun besteht die Möglichkeit, daß aerobe Mikroorganismen den eingelagerten

Sauerstoff für ihre Versorgung nutzen können und besser mit Sauerstoff versorgt werden als in wäßrigen Medien.

Auf das Gesamtvolumen bezogen sind die Keimzahlen in W/O-Emulsionen allerdings relativ gering, weil die Mikroorganismen nur auf kleinstem Raum stark wachsen.

2.2.3 Mayonnaise

Der Begriff Mayonnaise leitet sich von der auf den Balearen gelegenen spanischen Stadt Pórt Mahón ab. Dort wurde zum ersten Mal aus pflanzlichem Öl und Eiern die „Sauce á la Mahón“ von einem französischen Koch nach Einnahme der Stadt durch Marschall Richelieu kreiert [FLÜCKINGER, 1966]. Mayonnaise ist eine O/W-Emulsion, die aus Speiseöl (50 – 85 %), Hühnereigelb (5 – 10 %), Essig und anderen Genußsäuren, Kochsalz und Gewürzen hergestellt wird. Stabilisiert wird die Emulsion durch die Phospholipide, Lipoproteine und Proteine des Eigelbs. Der Tröpfchendurchmesser beträgt ca. 4 – 5 µm. Der pH-Wert liegt normalerweise zwischen 3,6 – 4,6. Mayonnaise-ähnliche Produkte mit niedrigem Fettgehalt (< 50 %), wie Salatsoßen, werden durch Dickungsmittel wie Stärke, Pektin, Agar-Agar, Alginate, Carboxymethylcellulose, Milcheiweiß oder Gelatine stabilisiert. Zur Konservierung werden Sorbinsäure, Benzoesäure oder p-Hydroxybenzoesäureethylester eingesetzt [BELITZ UND GROSCH, 1992; BAUMGART, 1997].

Generell handelt es sich bei Feinkostprodukten, wie Mayonnaise und Salatdressings, um mikrobiologisch gering anfällige Produkte aufgrund des hohen Ölanteils und des oft niedrigen pH-Wertes. Probleme können jedoch bei fettreduzierten, mild gesäuerten Produkten auftreten, vor allem wenn sie noch größere Mengen an Gemüse- und Fleischanteilen besitzen. Diese Rohstoffe können unter Umständen recht stark kontaminiert sein. Salatdressings sind aufgrund ihres geringen Ölanteils mikrobiologisch anfälliger als Mayonnaisen. Mikrobieller Verderb von Mayonnaisen und Dressings wird hauptsächlich durch eine geringe Anzahl von Milchsäurebakterien (*Lactobacillus*, *Leuconostoc* und *Pediococcus*), säuretoleranten Hefen und zum Teil von Schimmelpilzen hervorgerufen [ICMSF, 1998]. Unter den Hefen dominieren *Saccharomyces exiguus*, *Candida vini*, *Zygosaccharomyces bailii* und *Pichia membranaefaciens* [BAUMGART ET AL., 1983; ICMSF, 1998]. Zu den vorkommenden essig-toleranten Schimmelpilzen zählen *Moniliella acetoabutans*, *Monascus ruber* oder *Penicillium glaucum* [ICMSF, 1998]. Diese gelangen durch verunreinigte Folienauflagen oder über die Luft in das Produkt [BAUMGART, 1997].

Mögliche pathogene Mikroorganismen sind *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* und enterohaemorrhagische *Escherichia coli*, wie *E. coli* O157:H7 [BAUMGART, 1997; ICMSF, 1998]. Dieser *E. coli*-Stamm ist sehr säuretolerant und überlebt noch bei pH-Werten bis zu 3,65 [ICMSF, 1998]. Werden Salatmayonnaisen als Ursache für Erkrankungen aufgeführt, sind es ausschließlich hausgemachte Produkte, bei denen rohe Hühnereier verwendet wurden [BAUMGART, 1997].

2.3 Verfahren zur Haltbarmachung von Lebensmitteln

Zur Haltbarmachung von Lebensmitteln stehen zahlreiche Verfahren zur Verfügung [vgl. MÜLLER UND WEBER, 1996; KRÄMER, 2002]. Zu den neueren zählen das Entkeimen durch elektrische Hochspannungsimpulse, die elektrothermischen Konservierungsverfahren (z. B. Ohm'sches oder induktives Erhitzen) oder die Hochdruckbehandlung.

Ein Aspekt dieser Arbeit ist die Gegenüberstellung der antimikrobiellen Wirkung der Hitzebehandlung gegenüber der Hochdruckbehandlung von Mayonnaise. Beide Verfahren gehören zu den physikalischen Haltbarmachungsverfahren.

2.3.1 Thermische Behandlung

Bei der thermischen Behandlung von Lebensmitteln geht man normalerweise von einer exponentiellen Abtötung der Mikroorganismen aus, d. h. das Absterbeverhalten verläuft nach der Reaktion 1. Ordnung. Es gibt zwar zahlreiche Publikationen [z. B. CERNY UND HENNLICH 1983; MOATS ET AL., 1971, STABEL ET AL., 1997], die eine abweichende Hitzeinaktivierung belegen, in der Praxis jedoch kommt man gut mit dieser Modellvorstellung zurecht. Für die nicht exponentiellen Kurven unterschiedlichster Ausprägung [vgl. GOULD, 1989] gibt es zahlreiche Erläuterungen. Einen guten Überblick über die Ursachen der abweichenden Abtötungskurven liefern z. B. MOATS ET AL. [1971] und HANSEN UND RIEMANN [1963].

Obwohl die Hitzeinaktivierung eine der häufigsten Methoden in der Lebensmittelkonservierung darstellt, ist der genaue Wirkungsmechanismus nicht bekannt. Denn durch die Temperaturerhöhung kommt es zu zahlreichen Veränderungen in der mikrobiellen Zelle, so daß

der Zelltod auf keinen einzelnen Mechanismus zurückgeführt werden kann. Die abtötende Wirkung wird durch das Zusammenspiel verschiedener Mechanismen verursacht [GOULD, 1989]:

Ein Angriffspunkt ist die Cytoplasmamembran, bei der die Semipermeabilität beeinflusst wird. Dadurch kommt es zu einem verstärkten Austritt von Ionen, Aminosäuren und verschiedenen niedermolekularen Komponenten (z. B. RNA-Fragmenten). Bei gram-negativen Bakterien wird auch die äußere Membran verändert.

Des Weiteren kommt es zur Degeneration von Ribosomen und an der RNA treten hydrolytische Veränderungen auf, die zum Teil reversibel sind. Der Verlust von Mg^{++} wird als eine mögliche Ursache für die Schädigung der Ribosomen diskutiert. Man nimmt aber an, daß die erhöhte Durchlässigkeit der Cytoplasmamembran und die Schädigung der Ribosomen eine untergeordnete Rolle beim Zelltod spielen.

Bei vegetativen Zellen und bei Bakteriosporen kommt es durch Hitzeeinwirkung zu Brüchen innerhalb der DNA-Stränge. Die DNA-Schädigung ist bei trockener Hitze größer als bei feuchter. Dadurch wird auch erklärt, daß bei trockener Hitzeeinwirkung die Zahl der Mutanten bei einer Sporenpopulation extrem hoch ist. Die Veränderungen an der DNA können direkt erfolgen oder können durch die erhöhte Aktivität der endogenen Nukleasen nach der Erhitzung hervorgerufen werden. DNA-Schädigungen können durch vorhandene Reparaturmechanismen zum Teil behoben werden. Die Schädigung der Erbsubstanz gilt neben der Denaturierung von lebenswichtigen Enzymen und anderen Proteinen als Hauptgrund für das Absterben der Mikroorganismen.

Durch milde Hitze werden Enzyme, wie die Katalase oder die Superoxiddismutase, die dem Schutz vor Sauerstoffradikalen dienen, oder bei Sporen Enzyme, die die Auskeimung fördern, inaktiviert. Die Denaturierung von Proteinen durch Hitze beruht auf der Veränderung der räumlichen Struktur. Bei subletaler Schädigung geht man davon aus, daß die Proteinmoleküle nur teilweise bzw. begrenzt in ihrer Struktur geschädigt werden, so daß die Vorgänge reversibel sind. Irreversible Schädigungen der Proteine, wie die irreparable Entfaltung der Peptidketten, führen zum Zelltod. Als bevorzugter Angriffspunkt gelten die intramolekularen kovalenten Disulfidbindungen, die die räumliche Struktur der Proteine fixieren.

Auch in der Membran finden sich Proteine, die durch Hitze verändert werden.

2.3.2 Hochdruckbehandlung

Bei einer Hochdruckbehandlung werden Drücke zwischen 100 bis zu 1000 MPa (= 1000 bis 10000 bar) angewandt. Für die unter dem hohen Druck eintretenden physikalischen und chemischen Veränderungen gilt das von Braun und Le Chatelier aufgestellte Prinzip, daß unter Druck Prozesse, die mit einer Volumenreduzierung verbunden sind, begünstigt werden, während Prozesse, bei denen sich das Volumen vergrößert, vermindert ablaufen [PFISTER ET AL., 2000]. Entscheidend hierbei ist die Gesamtvolumenänderung, die sich aus der Bildung oder dem Lösen von nicht-kovalenten Bindungen, einem veränderten Hydratationsgrad und Konformitätsänderungen der Proteine ergibt.

Auch bei der Hochdruckbehandlung existiert kein einheitlicher Angriffspunkt für die Inaktivierung von Mikroorganismen. Wie bei der Hitzeinaktivierung finden zahlreiche Prozesse statt, die ineinander übergreifen. GÄNZLE [2002] beschreibt die Inaktivierung als einen Zwei-Stufen-Prozeß: In der ersten Stufe kommt es zur reversiblen Veränderung der Permeabilität der Membran und zur Inaktivierung von membrangebundenen Transportproteinen, in der zweiten Stufe zum Verlust der Resistenz gegenüber negativen Umweltbedingungen. Allgemein werden folgende mögliche Mechanismen diskutiert:

Durch eine Hochdruckbehandlung kommt es zu morphologischen Veränderungen, zu Einschnürungen und Änderung des Zellvolumens (z. B. durch das Zusammenbrechen von intrazellulären Vakuolen) [CHEFTEL, 1992; OXEN-BODENHAUSEN, 1995].

Da die meisten biochemischen Reaktionen in einer Volumenänderung enden, werden durch Hochdruck biochemische und enzymatische Reaktionen dahingehend beeinflusst, daß biochemische Reaktionen, die zu einer Volumenabnahme führen, beschleunigt werden, und solche, die eine Volumenvergrößerung zur Folge haben, gehemmt werden [OXEN-BODENHAUSEN, 1995].

Der Hochdruckeinfluß auf die Erbanlagen kann vernachlässigt werden, da die DNA-Helix durch die Wasserstoffbrückenbindungen sehr gut stabilisiert wird. Die Konformation der Nucleinsäure wird durch Drücke bis 10 kbar (1000 MPa) kaum beeinflusst. Dagegen kommt es zur Beeinflussung der enzymatischen Schritte der DNA-Replikation, Transkription und Translation, wodurch die Proteinsynthese und damit die Zellteilung gestört ist [CHEFTEL, 1995]. Neben der Inaktivierung von Enzymen wird die Struktur der Ribosomen verändert sowie deren Verteilung in der Zelle. Druck führt dazu, daß die Ribosomen nicht mehr gleichmäßig in der Zelle verteilt sind, sondern sich zusammenlagern, da ribosomale Untereinheiten oder Cytoplasmaproteine aggregieren [CHILTON ET AL., 1997].

Die Cytoplasmamembran wird aufgrund ihrer vielfältigen Stoffwechselfunktionen von vielen Autoren [CHEFTEL, 1995; KNORR, 1995; GÄNZLE UND VOGEL, 2001] als Primärangriffspunkt angesehen.

Es kommt zu Permeabilitätsveränderungen durch Veränderungen an der Phospholipiddoppelschicht (Phasenübergang bei der Membran) und durch reversible bis irreversible Schädigungen von membrangebundenen Enzymen. Damit verbunden ist die Reduzierung des intrazellulären pH-Wertes und der Verlust des Kaliummembranpotentials. Durch die Einwirkung von Hochdruck kommt es zur Verschiebung des Phasengleichgewichts von der flüssig-kristallinen Phase („liquid-crystalline“) zur Gel-Phase („gel phase“). Die mit höherem Druck abnehmende Membranfluidität äußert sich in einer verstärkten Ordnung in der Membran. Die Acylketten der Lipid A-Einheit der Doppelschicht gram-negativer Bakterien („outer membran“) werden starrer und die intermolekularen Abstände zwischen den Ketten sind geringer [GÄNZLE, 2002; FRANKE ET AL., 1993]. Die passive Durchlässigkeit wird erhöht, wenn eine Phospholipiddoppelschicht auf ihre Phasenübergangstemperatur gebracht wird. Durch die reduzierte Membranfluidität kommt es auch zu einer geringeren Beweglichkeit der eingebetteten Moleküle, wodurch der Stoffaustausch beeinträchtigt wird. Die Funktionalität einiger Membrantransporter ist an den flüssig-kristallinen Membranzustand gebunden. Bei höheren Drücken kommt es zur Denaturierung der Membranproteine. Ein Enzym, das bei der Inaktivierung von Mikroorganismen eine wichtige Rolle spielt, ist die Na^+/K^+ -abhängige ATPase [CHEFTEL, 1995]. Durch den gestörten Transport von Ionen und anderen Molekülen sowie den ungünstig verschobenen Ionengradienten kommt es auch zum Verlust der Säureresistenz bei Milchsäurebakterien und *E. coli* [MOLINA-GUTIERREZ ET AL., 2002; KILIMANN, 2005]. Die Aminosäureaufnahme wird ebenfalls verringert [PAUL UND MORITA, 1971]. Die Beeinflussung der aktiven und passiven Transportmechanismen an der Zellmembran wird als eine Hauptursache für den Zelltod angesehen.

2.3.3 Fettsäuren als natürliche Konservierungsstoffe

Fettsäuren sind langkettige, gesättigte oder ungesättigte, aliphatische Monocarbonsäuren, die aus einer COOH-Gruppe (Carboxylgruppe) und einer unterschiedlich langen Kohlenwasserstoffkette bestehen. Die natürlich vorkommenden Fettsäuren sind in der Regel unverzweigt und besitzen eine gerade Anzahl an Kohlenstoffatomen. In unveresterter, freier Form kommen sie jedoch nur in geringen Konzentrationen in Geweben und Zellen von Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen und in Ölen und Fetten vor.

Beispiele für Fettsäuren und Fettsäurederivate, die in dieser Arbeit auf ihre antimikrobielle Wirkung getestet wurden, sind:

Caprinsäure (Dekansäure): $\text{H}_3\text{C} - (\text{CH}_2)_8 - \text{COOH}$

Farblos, ranzig riechende Masse, Schmelzpunkt bei 31°C, in org. Lösungsmittel und in verdünnter Salpetersäure löslich, in Wasser unlöslich; Vorkommen: als Glycerinester in Kuh- und Ziegenbutter, in Kokosnußöl und anderen Fetten [RÖMPP, 1990];

Ölsäure ((Z) oder cis-9-Octadekansäure, Oleinsäure):

$\text{H}_3\text{C} - (\text{CH}_2)_7 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$

Farb- und geruchslose Flüssigkeit, Schmelzpunkt bei 16°C, unlöslich in Wasser, gut löslich in org. Lösungsmittel; Vorkommen: in pflanzlichen und tierischen Fetten [RÖMPP, 1990].

Monolaurin (Glycerin-1-laurat, DL- α -Laurin): $\text{H}_3\text{C} - (\text{CH}_2)_{10} - \text{COOCH}_2 - \text{OH} - \text{CH}_2\text{OH}$

Glycerinester der Laurinsäure; hochsiedend, in Wasser unlöslich, in Ethanol und Ether löslich, Vorkommen der Laurinsäure: in Lauricölen oder Muttermilch [RÖMPP, 1990].

Antimikrobielle Wirkung von Fettsäuren und ihren Estern

Zahlreiche Studien belegen eine wachstumshemmende, zum Teil auch eine abtötende Wirkung von bestimmten Fettsäuren und deren Estern auf Bakterien, Schimmelpilze und Hefen [KABARA, 1978; IKAWA, 1988; BERGSSON ET AL., 2001]. Die antimikrobiellen Effekte sind jedoch geringer als bei chemischen Konservierungsstoffen. Auch kommt es bei höheren Konzentrationen zu unerwünschten Geruchs- und Geschmacksveränderungen [SHIBASAKI UND KATO, 1978].

Von KABARA [1978] stammt eine umfangreiche Übersicht über die antibakterielle Wirkung von Fettsäuren und deren Derivaten. Aus den zusammengetragenen Ergebnissen der unterschiedlichen Studien und ergänzt durch eigene Versuche kommt KABARA [1978] zu nachfolgenden Schlußfolgerungen:

- Optimale Kettenlängen, um eine gute Wirksamkeit zu erzielen, sind: bei gesättigten Fettsäuren C_{12} , bei einfach ungesättigten Fettsäuren $\text{C}_{16:1}$, bei mehrfach ungesättigten Fettsäuren $\text{C}_{18:2}$.
- Cis-Isomere sind wirksamer als trans-Isomere.
- Die Position und die Anzahl der Doppelbindungen sind bei langkettigen Fettsäuren (C_{12}) entscheidender als bei den um drei C-Atomen verkürzten Ketten.
- Hefen werden durch kurzkettigere Fettsäuren beeinträchtigt als gram-positive Mikroorganismen.
- Gram-negative Mikroorganismen werden durch sehr kurze Fettsäuren (C_6 oder kürzer) beeinflusst.
- Fettsäuren, die mit monohydrischen (einwertigen) Alkoholen verestert sind, sind unwirksam.

- Die Wirkung der Laurinsäure kann durch Veresterung mit bestimmten mehrwertigen Alkoholen gesteigert werden.
- Der Glycerin-Monoester der Laurinsäure besitzt eine hohe Wirksamkeit. Di- und Triglyceride sind dagegen unwirksam.
- Acetylen-Derivate besitzen gegenüber Schimmelpilzen eine bessere Wirksamkeit als Ethylen-Fettsäuren.

Diese Schlußfolgerungen von KABARA [1978] treffen auch auf neuere Studien zu, wie aus der Tabelle 2-5 zu entnehmen ist.

Tab. 2-5: Wirkung von Fettsäuren auf verschiedene Mikroorganismen

Mikroorganismus	Fettsäure (Konz.)	Medium	Wirkung	Literatur
<i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella</i> Typhimurium <i>Salmonella</i> Enteritidis <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Escherichia coli</i>	Linolensäure kombiniert mit Monoglyceriden (10 – 1000 ppm)	Kulturmedium	gute Wachstumshemmung bei <i>B. subtilis</i> und <i>Staphylococcus aureus</i> , die durch die Zugabe der Monoglyceride verbessert werden konnte	JL-YOUNG, 2002
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Palmitinsäure Stearinsäure Ölsäure Linolsäure (10 – 500 µM)	„Brain-heart infusion“-Bouillon Sörensenphosphat- puffer	Wachstumshemmung besonders gut bei Linolensäure Verkürzung des D- Wertes abhängig von der Konz., gute Wirkung von Ölsäure schon bei niedriger Temperatur	TREMOULET ET AL., 2002
verschiedene Viren, <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus</i> der Gruppe B	Laurinsäure Caprinsäure Caprylinsäure Monocaprin Monocaprylin Octylglycerol	Humanmilch Kuhmilch Säuglings-Formula	Reduktion des Virentiters innerhalb von 30 min bei 37 °C Abtötung von Bakterien innerhalb 1 h bei 37 °C	ISAACS ET AL., 1995
<i>Candida albicans</i>	Laurinsäure Caprinsäure Caprylinsäure Monocaprin Monocaprylin Monomyristin Monopalmitolein Myristinsäure Monoolein Palmitoleinsäure Ölsäure (2,5 – 10 mM)	Nährlösung: „heart infusion broth“	Keimreduktion innerhalb von 10 min bei 37 °C durch Laurinsäure, Caprinsäure, Monocaprin, wobei die beste Abtötungsrate durch Caprinsäure erzielt wurde; Laurinsäure hatte auch bei niedriger Konzentration noch abtötende Wirkung	BERGSSON ET AL., 2001

Zu beachten ist jedoch, daß es sich dabei meist um in-vitro Experimente handelt, die vorwiegend mit Nährlösungen durchgeführt wurden. Für Lebensmittel liegen nur wenige Untersuchungen vor. Hier sind die Ergebnisse meist nicht so deutlich. Auch die synergistische Wirkung von Fettsäuren in Kombination mit thermischen Verfahren ist stark vom Erhitzungsmedium abhängig. Bei fetthaltigen Lebensmitteln können die freien Fettsäuren sogar indirekt das Überleben der Keime in Emulsionen fördern, da sie, wie schon erwähnt, als Emulgatoren wirken können und die Grenzflächenspannung zwischen den Phasen erniedrigen. Dadurch können die Mikroorganismen leichter von der wäßrigen Phase in die Fettphase wandern und sind somit vor der Hitzeeinwirkung geschützt [PRÄNDL, 1976]. Des weiteren wird vermutet, daß freie Fettsäuren in Ölen die Hitzeresistenz von Mikroorganismen erhöhen. So zeigten MOLIN UND SNYGG [1967], daß durch die Zugabe von Palmitinsäure zu Sojaöl die Hitzeresistenz von *Bacillus*-Sporen gesteigert wird. Auch erfolgt die Abtötung in flüssigem Paraffin, das keine freien Fettsäuren enthält, deutlich besser als in Soja- und Olivenöl [MOLIN UND SNYGG, 1967].

3 MATERIAL UND METHODIK

3.1 Mikroorganismen und Chemikalien

3.1.1 Testmikroorganismen

Durch die Auswahl der Testmikroorganismen wurden die mikrobiologischen Hauptgruppen gram-positive Bakterien (sporenbildend, nicht-sporenbildend), gram-negative Bakterien, Hefen und Schimmelpilze abgedeckt.

Alicyclobacillus acidoterrestris DSM 2498, *Escherichia coli* DSM 5695 und *Aspergillus niger* DSM 1957 stammen aus der Stammsammlung des Fachgebietes Haushalts- und Betriebshygiene der TU-München/Weihenstephan. Der Stamm *Lactococcus lactis ssp. lactis* L 201 wurde von der Firma Danisco Cultor (Niebüll) zur Verfügung gestellt. Die anderen in der Tabelle 3-1 aufgelisteten Mikroorganismen stammen aus der Weihenstephaner Stammsammlung der Abteilung Mikrobiologie des Zentralinstituts für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (TU-München/Weihenstephan).

Tab. 3-1: Zusammenstellung der verwendeten Testkeime

Testmikroorganismus (Species)	Stammnummer
gram-positive, sporenbildende Bakterien	
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	DSM 2498
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 10; WS 1525
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	DSM 22; WS 1529
gram-positive, nicht sporenbildende Bakterien	
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	L 201
<i>Listeria innocua</i>	WS 2257
gram-negatives Bakterium	
<i>Escherichia coli</i>	DSM 5695
Hefen	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 18029
<i>Pichia anomala</i>	WSYC 39
Schimmelpilze	
<i>Aspergillus niger</i>	DSM 1957
<i>Penicillium glabrum</i>	WSMC 85

3.1.2 Nähr- und Verdünnungsmedien

Die Nährmedien wurden, wenn nicht anders angegeben, in sterilem entionisiertem Wasser gelöst und anschließend bei 121°C für 15 min autoklaviert.

Tab. 3-2: Zusammenstellung der verwendeten Nährmedien und Lösungen

Medium	Verwendungszweck	Hersteller / Artikelnummer
1/15 M Sørensenphosphatpuffer	Verdünnungsmedium	1)
entionisiertes Wasser	Verdünnungs- und Suspensionsmedium	
<i>Bacillus acidocaldarius</i> Medium–Nährlösung, modifiziert (BAM-Bouillon)	zur Anreicherung von <i>A. acidoterrestris</i>	2)
<i>Bacillus acidocaldarius</i> Medium–Nährboden, modifiziert (BAM-Agar) ³⁾	zur Anreicherung und Koloniezahlbestimmung von <i>A. acidoterrestris</i>	2)
Bierwürze-Pepton-Nährlösung (Malzextrakt-Bouillon)	zur Anreicherung von Hefen und Schimmelpilzen	Merck / 5397
Bierwürze-Pepton-Nährboden (Malzextrakt-Agar)	zur Koloniezahlbestimmung von Schimmelpilzen	2)
Caseinpepton-Sojamehlpepton-Nährlösung (CaSo-Bouillon)	zur Anreicherung von verschiedenen Testkeimen	Oxoid / CM 129
Glucose-Caseinpepton-Nährboden ³⁾ (GC-Agar)	zur Anzucht und Koloniezahlbestimmung von <i>B. stearothermophilus</i>	Oxoid / CM 75
Hefeextrakt-Pepton-Glucose-Nährboden (HPG-Agar)	zur Anzucht von Hefen	2)
<i>Lactobacillus</i> -Nährboden nach de Man, Rogosa und Sharpe (MRS-Agar)	zur Koloniezahlbestimmung von <i>Lc. lactis</i>	Oxoid / CM 361
Plate-Count Nährboden ³⁾ (PC-Agar)	zur Koloniezahlbestimmung von verschiedenen Testkeimen	Oxoid / CM 325

- 1) Herstellung durch Mischen von einer 1/15 M KH₂PO₄-Lösung mit einer 1/15 M Na₂HPO₄-Lösung und Einstellen des pH-Wertes auf 7,0
- 2) Zusammensetzung ist gesondert aufgeführt im Anschluß
- 3) Zur Gewinnung der Sporensuspension mit Zusatz von 100 mg/l MnSO₄ (Merck, Artikelnummer 5959)

BAM-Agar

Die Herstellung des Agars erfolgte in zwei getrennten Lösungen.

Lösung 1

Calciumchlorid	CaCl ₂ 2 H ₂ O	0,22 g
Magnesiumsulfat	MgSO ₄ 7 H ₂ O	0,5 g
Ammoniumsulfat	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2 g
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	3,0 g
Hefeextrakt, granuliert		1,0 g
Glucose		5,0 g
Spurenelementlösung		1,0 ml
Aqua dest.		ad 500 ml

Zur Gewinnung der Sporensuspension wurde zusätzlich Mangansulfat zur Sporulationsförderung dem BAM-Agar zugesetzt.

Lösung 2

Agar-Agar, granuliert	20 g
Aqua dest.	ad 500 ml

Spurenelementlösung

Calciumchlorid	CaCl ₂ 2 H ₂ O	0,66 g
Zinksulfat	ZnSO ₄ 7 H ₂ O	0,18 g
Kupfersulfat	CuSO ₄ 7 H ₂ O	0,16 g
Mangansulfat	MnSO ₄ 4 H ₂ O	0,15 g
Cobaltchlorid	CoCl ₂ 6 H ₂ O	0,18 g
Borsäure	H ₃ BO ₃	0,10 g
Natriummolybdat	Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0,03 g
Aqua dest.		1000 ml

Lösung 1 wurde mit 10 %iger Milchsäure auf pH 3,9 eingestellt, die Lösung 2 wurde auf einem beheizbaren Magnetrührer erwärmt. Nach dem Autoklavieren wurden beide Lösungen unter sterilen Bedingungen zusammengegossen und der pH-Wert kontrolliert und falls nötig auf pH 4,2 nachgestellt.

BAM-Bouillon

Die Herstellung der Bouillon erfolgte aus den gleichen Komponenten wie die Lösung 1, jedoch wurden 1000 ml Aqua dest. als Lösungsgrundlage verwendet und die Zugabe von Lösung 2 entfällt. Der pH-Wert wurde mit 10 %iger Milchsäure auf pH 4,0 eingestellt.

3.1.3 Rohstoffe und Zusätze

Für die Herstellung der Emulsionen wurden die in der Tabelle 3-3 aufgeführten Pflanzenöle verwendet. Des Weiteren wurde reine **Ölsäure** (Fluka, Artikelnummer 75093) eingesetzt. Alle Öle wurden bei Raumtemperatur, vor Lichteinstrahlung geschützt aufbewahrt.

Tab. 3-3: Zusammenstellung der verwendeten Pflanzenöle

Ölart		Hersteller	Handelsnamen	Bezug
Sonnenblumenöl		AOP Associated Oil Packers GmbH, Riesa	Bellasan, raffiniertes winterisiertes Öl	Aldi
Olivenöl		CLAMA GmbH, Mühlheim an der Ruhr	Cantielle®, natives Oliven Extra, kaltgepresst	Aldi
Rapsöl ¹⁾	Verteilungsversuche	Floreal GmbH, Saarbrücken	Eureal, feines Rapsöl	MiniMal
	Erhitzungsversuche	VOG AG, Linz	Rapso, 100% reines Rapsöl	Walmart
Sojaöl		Vandemoortele Deutschland GmbH, Dresden	Sojola	Walmart

¹⁾ Wechsel, da Rapsöl Floreal bei MiniMal nicht mehr erhältlich war

Als Emulgatoren für die Verteilungsversuche in Emulsionen wurde das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (= „Sodiumlaurylsulfate“, SLS) der Firma Merck (Artikelnummer 1.13760) und das kationische Tensid Cetylpyridiniumbromid (= „1-Hexadecylpyridiniumbromide“, CPB) der Firma Sigma (Artikelnummer C-5881) eingesetzt. Für die Erhitzungsversuche in Mayonnaise wurden die Zutaten und Zusätze aus Tabelle 3-4 und 3-5 verwendet.

Tab. 3-4: Zutaten für die Herstellung der Mayonnaise

Zutaten	Hersteller/Artikelnummer oder Bezeichnung
Eigelb aus frischen Eiern	Landwirt aus Vötting, Freilandhaltung
Essigessenz 25 %ig	Speyer & Grund GmbH / Surig
Haushaltszucker, fein	Südzucker
Kochsalz	Merck / 1.06400.1000
Sonnenblumenöl	AOP Associated Oil Packers GmbH, Riesa / Bellasan, raffiniertes winterisiertes Öl

Tab. 3-5: Zusätze zu der Mayonnaise

Zusätze (Reinheitsgrad)	Hersteller/Artikelnummer
Ölsäure ($\geq 99\%$)	Roth / 72131
Caprinsäure (99,5 %)	Roth / 87971
Monolaurin = DL- α -Laurin (puriss. p. a.)	Fluka / 61585
Natriumbenzoat ($\geq 99,5\%$)	Fluka / 71295

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Stammhaltung der Testmikroorganismen

Mit Ausnahme von *Lc. lactis* und *L. innocua* wurden die gefriergetrockneten Kulturen reaktiviert [BAST, 2001], auf Schrägagarröhrchen überimpft und im Kühlschrank bei 7°C gelagert. Für die Anzucht wurde aus der jeweiligen Stammkultur (Schrägagarröhrchen) eine Öse entnommen und ein Verdünnungsausstrich angelegt, der regelmäßig überimpft wurde.

Lc. lactis und *L. innocua* wurden als gefriergetrocknete Kultur im Tiefkühlfach bei -18°C aufbewahrt. Für die Anzucht wurde eine Spatelspitze der gefriergetrockneten Kultur in CaSo-Bouillon angezüchtet und regelmäßig überimpft. Die gut gewachsenen Kulturen wurden bei 7°C aufbewahrt.

Zur Herstellung der eigentlichen Gebrauchskulturen wurde die 2. bis 8. Passage eines Verdünnungsausstriches bzw. eine angeimpfte Nährbouillon, die nicht länger als zehn Tage gelagert wurde, verwendet.

3.2.2 Kultivierung und Herstellung der Gebrauchssuspensionen

Die Gebrauchssuspensionen der Hefen und vegetativen Bakterien wurden für jeden Versuch frisch hergestellt und innerhalb von 24 h eingesetzt. Die Konidien suspensionen der Schimmelpilze sowie die Sporensuspensionen von Bakterien sind gut lagerbar. Deshalb wurden diese über einen Zeitraum von vier Monaten verwendet. Die Anzuchsbedingungen für alle Mikroorganismen sind in Tabelle 3-6 aufgeführt. Sie wurden so gewählt, daß sich die vegetativen Bakterien in der stationären Wachstumsphase befanden.

Tab. 3-6: Anzuchsbedingungen der Testkeime

Keim	Nährmedium	Inkubationsbedingungen (Temperatur / Zeit)
<i>A. acidoterrestris</i>	BAM-Agar + Mangansulfat	46°C / 7 d
<i>Asp. niger</i>	Malzextrakt-Agar	30°C / ca. 14 d
<i>B. stearothermophilus</i>	PC-Agar + Mangansulfat	37°C / ca. 21 d
<i>B. subtilis</i>	PC-Agar + Mangansulfat	30°C / 7 d
<i>E. coli</i>	CaSo-Bouillon	37°C / 9 – 10 h
<i>L. innocua</i>	CaSo-Bouillon	30°C / 24 h
<i>Lc. lactis</i>	CaSo-Bouillon	30°C / 24 h
<i>P. anomala</i>	Malzextrakt-Bouillon	30°C / 24 h
<i>Pen. glabrum</i>	Malzextrakt-Agar	30°C / ca. 21 d
<i>S. cerevisiae</i>	Malzextrakt-Bouillon	30°C / 24 h

Nachfolgend ist die Herstellung der einzelnen Gebrauchssuspensionen beschrieben:

E. coli, *P. anomala* und *S. cerevisiae*:

Von einem Verdünnungsausstrich wurde eine Einzelkolonie in 100 ml Anzuchtsbouillon überimpft und bebrütet (vgl. Tabelle 3-6). Die Bouillon wurde durch dreimaliges Zentrifugieren und Waschen der Keime mit entionisiertem Wasser entfernt. *E. coli* wurde bei 9000 U/min für 15 min und *P. anomala* und *S. cerevisiae* bei 4000 U/min für 25 min zentrifugiert. Das erhaltene Keimsediment wurde in gleicher Menge Wasser aufgeschwemmt. Eine Ausnahme bildeten die Hefen, diese wurden nach dem letzten Zentrifugieren in weniger Wasser resuspendiert, um eine Keimdichte von ca. 10^8 KbE/ml zu erhalten.

Lc. lactis und *L. innocua*:

Zu 100 ml Anzuchtsbouillon wurden 0,1 ml Flüssigkultur gegeben und bei 30°C für 24 h bebrütet. Die Kulturen wurden zweimal 15 min bei 6000 U/min und einmal bei 9000 U/min zentrifugiert und in entionisiertem Wasser gewaschen. Von der erhaltenen Suspension wurde die Keimzahl bestimmt. Die Keimsuspensionen wurden auf die gewünschte Keimdichte (10^8 KbE/ml) verdünnt und innerhalb von 24 h eingesetzt. Für die Gefriertrocknung wurden höhere Keimichten von ca. 10^9 – 10^{10} KbE/ml angestrebt, daher wurden die Keime in entsprechend weniger Wasser resuspendiert.

Asp. niger und *Pen. glabrum*:

Zur Gewinnung der Konidiensuspension wurde von einem Reinausstrich eine geringe Menge Zellmaterial entnommen und in 3 ml sterilem, entionisiertem Wasser suspendiert. Jeweils 0,1 ml dieser Suspension wurden auf Malzagar nach dem Oberflächenspatelverfahren übertragen. Um eine massive Sporenbildung zu erreichen, wurden 10 – 15 Platten für ca. 14 Tage bei 30°C bebrütet. Für die Ernte der Konidiensporen wurde auf dem Schimmelrasen ein Teelöffel steriler Seesand verteilt, und die mit Parafilm abgedichteten Petrischalen wurden vorsichtig geschüttelt. Der mit Konidiensporen behaftete Seesand wurde in eine sterile Schottflasche überführt und mit sterilem entionisiertem Wasser überschichtet. Durch kräftiges Schütteln und durch eine zusätzliche Behandlung im Ultraschallbad (1 min), Sonorex Super RK 510 H (Bandelin, Berlin), lösten sich die Konidiensporen vom Seesand. Nachdem der Sand sich am Boden abgesetzt hatte, wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert.

Die Keimdichte von *Asp. niger* lag bei ca. 10^7 KbE/ml und bei *Pen. glabrum* zwischen 10^6 und 10^7 KbE/ml. Die Konidiensporen wurden bei 7°C bis zu vier Monate aufbewahrt.

B. subtilis, *B. stearothermophilus* und *A. acidoterrestris*:

Zur Herstellung der Sporensuspension wurde von einem Verdünnungsausstrich eine Kolonie in 3 ml sterilem, entionisiertem Wasser verteilt. Jeweils 0,1 ml dieser Verdünnung wurden auf ca. 12 Agarplatten ausgespatelt. Nach dem Bebrüten (vgl. Tab. 3-6) wurde der Bakterienrasen mit ca. 3 ml sterilem, entionisiertem Wasser überschichtet und vorsichtig mit einem sterilen Drigalski-Spatel vom Agar gelöst. Die erhaltene Bakteriensuspension wurde bei 9000 U/min für 15 min zentrifugiert, der Überstand abgegossen, und die Bakterien in sterilem, entionisiertem Wasser resuspendiert, um Agarreste zu entfernen. Die vegetativen Zellen wurden durch Pasteurisieren bei 80°C für 20 min abgetötet, um dadurch eine reine Sporensuspension zu erzielen.

3.2.3 Bestimmung der Lebendkeimzahl

Die Lebendkeimzahl wurde als mesophile aerobe Keimzahl (kurz als „Keimzahl“ bezeichnet) mit dem Plattenverfahren nach Robert Koch bestimmt. In Tabelle 3-7 sind die verwendeten Nährböden und Nachweisverfahren für die Keimzahlbestimmung aufgeführt. Es wurden dezimale Verdünnungsreihen mit Sørensenphosphatpuffer hergestellt und jeweils zwei Platten pro Verdünnungsstufe angesetzt. Es wurden immer Doppelansätze durchgeführt. Für die Keimzahlbestimmung in Mayonnaise und Öl enthielt das erste Verdünnungsröhrchen 1 % des Emulgators Tween 80, damit sich die Proben besser mit der Verdünnungslösung mischten. Auch wurden bei den Erhitzungs- und Hochdruckversuchen in Öl 0,5 ml des Probenmediums auf 4,5 ml Verdünnungslösung gegeben, da sich diese Menge (5 ml) besser auf dem Reagenzglasschüttler mischte als 1 ml Öl auf 9 ml Verdünnungsmedium. Von der Mayonnaise wurden 0,5 g in 4,5 ml Sørensenphosphatpuffer eingewogen.

Tab. 3-7: Verwendete Nährböden und Nachweisverfahren für die Lebendkeimzahlbestimmung

Keim	Medium	Methode	Inkubationsbedingungen (Temperatur / Zeit)
<i>E. coli</i>	PC-Agar	Gußkultur	37°C / 24 h
<i>B. subtilis</i>	PC-Agar	Spatelverfahren	30°C / 24 – 48 h
<i>Asp. niger</i>	Malzextrakt-Agar	Spatelverfahren	25°C / 3 – 5 d
<i>A. acidoterrestris</i>	BAM-Agar	Spatelverfahren	46°C / 48 h
<i>Lc. lactis</i>	MRS-Agar	Gußkultur	30°C / 48 h
<i>L. innocua</i>	PC-Agar	Spatelverfahren	30°C / 48 h
<i>S. cerevisiae</i>	PC-Agar	Gußkultur	30°C / 72 h
<i>P. anomala</i>	PC-Agar	Gußkultur	30°C / 72 h
<i>Pen. glabrum</i>	Malzextrakt-Agar	Spatelverfahren	30°C / 48 h
<i>B. stearothermophilus</i>	GC-Agar	Spatelverfahren	37°C / 48 h

Für die Auswertung wurden im allgemeinen die Platten derjenigen Verdünnungsstufen berücksichtigt, welche Kolonienzahlen zwischen 10 und 300 aufwiesen. Bei zwei in Frage kommenden Verdünnungsstufen wurde das gewichtete Mittel gebildet [BAUMGART, 1990].

Die in der Arbeit angegebenen Keimzahlen setzen sich aus mindestens drei Proben zusammen. Jeder Versuch wurde zeitlich versetzt wiederholt. Wurden bei einem Wiederholungsversuch stark abweichende Ergebnisse ermittelt, wurde der Ansatz nochmals durchgeführt und die zusammenpassenden Werte zur Versuchsauswertung herangezogen.

3.3 Bestimmung der Hydrophobizität von Mikroorganismen

Die Hydrophobizität der Mikroorganismen wurde zuerst über die Kontaktwinkelmessung ermittelt. Da diese Methode nur für die Bakteriensporen und Schimmelpilze brauchbare Ergebnisse lieferte, wurde zusätzlich das Verteilungsverhältnis in einem Wasser-Hexadekan-Gemisch (MATH-Test) bestimmt.

3.3.1 Messung des Kontaktwinkels

Bei diesem Test wird der Kontaktwinkel eines Flüssigkeitstropfens auf einem geschlossenen Bakterienfilm bestimmt (vgl. Abb. 3-1 und Abb. 3-2).

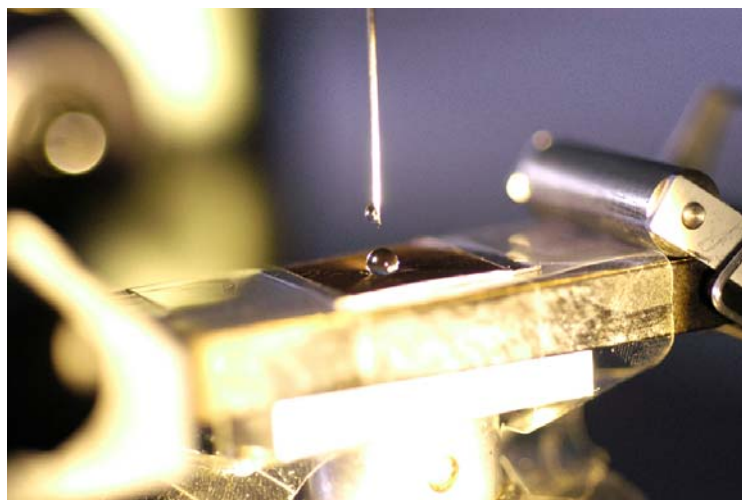


Abb. 3-1: Wassertropfen auf einer Schicht von *Asp. niger*-Konidien zur Bestimmung des Kontaktwinkels nach der Parametermethode

Es wird der Winkel zwischen der Filmoberfläche und der Tangente, die im gedachten Schnittpunkt Filmoberfläche und Tropfenoberfläche an den Tropfen angelegt werden kann (Abb. 3-2), nach folgender Formel berechnet:

$$\alpha = \arctan\left(\frac{2h}{d}\right)$$

α = Kontaktwinkel
 h = Scheitelhöhe
 d = Basisdurchmesser des liegenden Tropfens

Die Scheitelhöhe h und der Basisdurchmesser d des Wassertropfens sind in Abbildung 3-2 wiedergegeben.

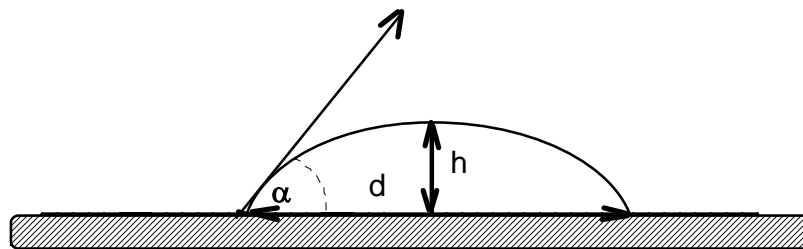


Abb. 3-2: Liegender Wassertropfen mit Scheitelhöhe h und Basisdurchmesser d

Für die Kontaktwinkelmessung wurden die Bakterien- und Konidien sporen, wie unter 3.2.2 beschrieben, herangezogen. Ca. 20 ml der Suspension wurden auf einem Cellulose-Nitrat-Filter (Sartorius, Artikelnummer 11306; Porendurchmesser: 0,45 μm) aufgezogen und bei Raumtemperatur, im Wärmeschrank und zum Teil im Exsikkator für einige Stunden bis mehrere Tage getrocknet.

Danach wurden die Filter in 1 x 1 cm große Stücke geschnitten, mit doppelseitigem Klebeband auf einer Folie befestigt, die dann in der Haltevorrichtung des Kontaktwinkelmeßgerätes (Gerätetyp 28, Lorentzen und Wettres, Stockholm) fixiert wurden (Abb. 3-1). Auf das Filterpapier wurde ein definierter Tropfen (bidestilliertes Wasser, 0,0040 ml) aufgesetzt. Die Höhe und Breite des Tropfens wurde an dem 25-fach vergrößerten Tropfenprofil auf einer Mattscheibe mit einer Schieblehre bestimmt. Das Ablesen erfolgte sofort nach dem Aufsetzen des Wassertropfens.

3.3.2 Durchführung des MATH-Tests

Mit Hilfe dieses Tests wird die Verteilung von Mikroorganismen zwischen einer wäßrigen und einer organischen Phase bestimmt, in der vorliegenden Arbeit zwischen Hexadekan und entionisiertem Wasser bzw. Sørensenphosphatpuffer pH 4 (Verdünnungslösung).

Die Messungen erfolgten an einem Spektralphotometer für UV und Vis Bereich (Ultraspec 4000; Pharmacia Biotech, Cambridge, England). Die gewaschenen Zellen wurden durch Verdünnen auf eine optische Dichte von 0,3 bei 600 nm eingestellt. Jeweils 4 ml dieser Mikroorganismensuspension wurden in 6 Reagenzgläser abgefüllt und bei 30°C temperiert. Anschließend wurde je 1 ml Hexadekan zu vier Gläsern mit Keimsuspension dazugegeben, für den Blindwert wurden zwei Gläser ohne Hexadekan weiterbehandelt. Alle Gläser wurden 15 sec lang bei Stufe sechs auf einem Reagenzglasschüttler (Vortex Genie 2TM; Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) geschüttelt und deren Inhalt sodann in Küvetten umgefüllt. Zur Trennung der Phasen wurden die Küvetten 15 min bei 30°C in den Brutschrank gestellt. Das Hexadekan schied sich oberhalb der Wasserphase ab. Von der wäßrigen Phase wird die Extinktion bestimmt. Die Endextinktion (E) setzt sich aus den vier Einzelwerten der Proben, die mit Hexadekan gemischt wurden, zusammen. Der Nullwert (E_0) wurde aus den zwei Proben, die nicht mit Hexadekan gemischt wurden, ermittelt. Beim MATH-Test wird der prozentuale Anteil der Mikroorganismen, die im Wasser verblieben sind, nach folgender Formel berechnet:

$$\%MO_{Wasser} = \frac{E}{E_0} \cdot 100\%$$

MO_{Wasser} = prozentualer Anteil an Mikroorganismen,
die in der Wasserphase verblieben sind
 E = Endextinktion
 E_0 = Nullwert

Es wurden jeweils zwei zeitlich voneinander unabhängige Meßreihen durchgeführt.

3.4 Untersuchungen zur Verteilung von Mikroorganismen in Emulsionen

3.4.1 Herstellung der Emulsionen

Das mikrobiologische Verteilungsverhältnis wurde für standardisierte Emulsionen vom Typ O/W-Emulsionen ohne Emulgator, W/O-Emulsionen ohne Emulgator und O/W-Emulsionen mit Natriumdodecylsulfat (SLS) als Emulgator bestimmt. Die Herstellung der Emulsionen ist in Tabelle 3-8 zusammengefaßt.

Die Homogenisierung erfolgte mit dem Dispergiergerät Miccra D-8, Stator 20F und Rotor EmR20 (ART moderne Labortechnik, Mühlheim). Der verwendete Rotor wurde speziell für die Herstellung von Emulsionen entwickelt.

Bei den Versuchen ohne Emulgator wiesen das Wasser und das Öl Raumtemperatur auf. Beide Flüssigkeiten wurden mit einem Meßzylinder abgemessen. In eine 250-ml-Schottflasche wurde die kontinuierliche Phase vorgelegt. Die Keimzugabe erfolgte über das Wasser. Während des Homogenisierens bei 17800 U/min für 2 min wurde die diskontinuierliche Phase langsam über einen Meßzylinder zugegeben (innerhalb von 45 sec bei 50 ml oder 90 sec bei 100 ml). Nach Fertigstellung der Emulsion wurde sofort 1 ml zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl entnommen. Es wurden für jede Versuchsreihe fünf Wiederholungen durchgeführt.

Für die Emulsionsversuche mit Emulgator wurden das Wasser und das Öl auf 30°C erwärmt, um die Löslichkeit der Tenside im Wasser zu verbessern. Zu dem in eine Schottflasche abgemessenen Wasser wurden 0,025 mg SLS zugegeben und unter gelegentlichem Schütteln im Wasserbad bei 30°C gelöst. Nach dem Beimpfen des Wassers wurde sofort die Emulsion hergestellt. Das Homogenisieren erfolgte bei 17800 U/min für 2 min. Es wurde ebenfalls sofort 1 ml der Tensidemulsion zur Bestimmung der Animpfdichte entnommen.

Tab. 3-8: Übersicht über die Herstellung der unterschiedlichen Emulsionen zur Bestimmung der Verteilung der Testkeime in Emulsionen

Arbeitsschritte und Parameter	Substanzen und Parameterwerte		
	O/W-Emulsion ohne Emulgator	W/O-Emulsion ohne Emulgator	O/W-Emulsion mit Tensid
Vorlage der kontinuierliche Phase , abgefüllt in eine sterile Schottflasche über einen 50 bzw. 100 ml Meßzylinder	50 bzw. 100 ml ention. H ₂ O	50 ml Öl	50 ml ention. H ₂ O mit 0,025 mg Tensid gelöst bei 30°C
Zugabe der Keimsuspension über das Wasser d. h. entweder zur kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Phase	angestrebte Animpfdichte 5*10 ⁶ KbE/ml Zugabe zur kontinuierlichen Phase	angestrebte Animpfdichte 5*10 ⁶ KbE/ml Zugabe zur diskontinuierlichen Phase	angestrebte Animpfdichte 5*10 ⁶ KbE/ml Zugabe zur kontinuierlichen Phase
Zugabe der diskontinuierliche Phase über einen sterilen 50 bzw. 100 ml Meßzylinder innerhalb von 45 oder 90 sec je nach Ölmenge	50 bzw. 100 ml Öl	50 ml ention. H ₂ O	50 ml Öl
Umdrehungszahl	17800 U/min	17800 U/min	17800 U/min
Gesamtdispergierzeit	2 min	2 min	2 min
Gesamtvolumen	100 - 200 ml	100 ml	100 ml

3.4.2 Gewinnung der Öl- und Wasserphase

Die O/W- und W/O-Emulsionen ohne Emulgatoren trennten sich aufgrund der unterschiedlichen Dichte von selber. Beschleunigt wurde dieser Vorgang, wenn die Emulsionen vor dem Abfüllen in die Scheidetrichter (250 ml Fassungsvermögen) mit der Hand für 30 sec geschüttelt wurden. Die Scheidetrichter wurden im Kühlschrank bei 7°C gelagert. Die Standzeit im Kühlschrank betrug bei O/W-Emulsionen 4 h, bei W/O-Emulsionen 2 h.

Aus der Literatur [SCHUSTER, 1981] war bekannt, daß man anionische Tensidemulsionen durch Zugabe von kationischen Tensiden scheiden kann. Daher wurde zur Trennung der O/W-Emulsion mit SLS 100 ml einer O/W-Emulsion mit CBP auf die gleiche Weise, jedoch ohne Testmikroorganismenzusatz, hergestellt [JAIN UND SHARMA, 1972]. Die Emulsionen wurden zusammengegeben, 30 sec geschüttelt und in Scheidetrichter umgefüllt. Die Standzeit betrug 4 h.

Bei keinem der Emulsionsversuche wurde eine vollständige Trennung erreicht, d. h. sowohl die Wasser- als auch die Ölphase erschienen durch Öl- bzw. Wasserreste trüb. Die nach der Entmischung erhaltenen Wasser- und Ölphasen wurden in sterile Schottflaschen abgelassen. Zum Teil befand sich zwischen den beiden Phasen eine dünne Emulsionsschicht, die separat in einem Reagenzglas aufgefangen wurde.

3.4.3 Charakterisierung der Emulsionen sowie der einzelnen Phasen nach der Trennung

3.4.3.1 Bestimmung der Tröpfchengröße

Mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Axio; Carl Zeiss AG, Oberkochen) mit integrierter Kamera wurden die verschiedenen Emulsionsarten bei einer 1000-fachen Vergrößerung photographiert. Anhand der Photos konnte die Tröpfchengröße bestimmt werden.

3.4.3.2 Bestimmung des Restwassergehalts bzw. des Restölgehalts in den Phasen

Da das Wasser und das Öl nach der Trennung der Emulsionen trüb waren, wurde über Trocknungsversuche der Restgehalt an Wasser bzw. Öl in den Phasen gravimetrisch bestimmt. Dazu wurden ca. 15 g der jeweiligen Phase in einen 100 ml Weithals-Erlenmeyerkolben an einer Analysenwaage (Mettler AE 200 Ablesbarkeit 0,1 mg, Mettler-Toledo GmbH) eingewogen. Die Proben wurden für 24 h im Trockenschrank bei 110°C (Temperaturanzeige des Trockenschrankes) getrocknet und nach dem Abkühlen erneut gewogen. Die Gewichtsänderungen der

jeweiligen Phasen wurden in Bezug zueinandergesetzt und die prozentuale Restmenge Wasser in der Ölphase bzw. die prozentuale Restmenge Öl in der Wasserphase errechnet.

3.5 Vergleichende Untersuchungen mit Wasser, Öl und Mayonnaise

3.5.1 Vorbereitung der Testmikroorganismen und Proben

3.5.1.1 Gefriertrocknung der Testmikroorganismen

Um die Testmikroorganismen wasserfrei ins Öl zu bekommen, wurden diese gefriergetrocknet. Dazu wurde eine größere Menge an Gebrauchssuspension hergestellt und durch Zentrifugieren eingeeengt (vgl. Kap. 3.2.2). Die konzentrierte Keimsuspension wurde in Rollrandgläser (Maße 19 x 40 mm) abgefüllt (pro Glas 1 ml) und mit einem Wattestopfen verschlossen. Die Proben wurden 1 h bei -70°C tiefgefroren und anschließend für ca. 12 h in der Vakuum-Gefriertrocknungsanlage (Alpha 1-4 mit Anlagensteuerung, LDC-1M; Heraeus Christ, Hanau) getrocknet. Die getrockneten Kulturen wurden bei -18°C bis zum Versuchsansatz aufbewahrt.

3.5.1.2 Animpfen der Proben

Um eine Animpfdichte von ca. 10^7 KbE/ml zu erhalten, wurde zum entionisierten Wasser und Phosphatpuffer die entsprechende Menge der wäßrigen Gebrauchssuspension zugegeben, und durch kräftiges Schütteln verteilt. Die Mayonnaise wurde mit der wäßrigen Keimsuspension vor der Zugabe des Öls angeimpft.

Das Animpfen des Öls erfolgte in 100 ml Schottflaschen. Die gefriergetrockneten Kulturen wurden durch Klopfen und Abkratzen mit einem Spatel von der Glaswand gelöst, zerkleinert und zum Öl gegeben. Das angeimpfte Öl wurde dann ca. 3 min mit der Hand kräftig geschüttelt, 10 min stehen gelassen und nochmals 3 min geschüttelt.

3.5.1.3 Herstellung der Mayonnaise

Die Mayonnaise (Ölanteil: 67 Gew.-%, pH ca. 4,7) wurde für jeden Versuch frisch aus folgenden Zutaten (Tab. 3-9) hergestellt:

Tab. 3-9: Zutaten für die Herstellung von 100 g Mayonnaise (Rezeptur nach CERNY ET AL., 1983)

Menge	Rezepturbestandteil
16 g	Flüssigeigelb aus frischen Hühnereiern
8,3 ml	Leitungswasser (abzüglich der Keimsuspension)
0,6 ml	Essigessenz (25 %)
1,4 g	Kochsalz
6,4 g	Haushaltszucker
67 g	Sonnenblumenöl

Die Eierschalen wurden mit Ethanol (70 Vol.-%) desinfiziert, da die Eier mit Hilfe der Eierschalen getrennt wurden. Das Eigelb wurde in einem 250 ml Becherglas mit Leitungswasser und Essigsäurekonzentrat gut vermischt, bevor die Testmikroorganismen zugegeben wurden. Dann wurden Salz und Zucker untergemengt. Für die Zugabe des Öls wurde die Eigelbmischung auf höchster Stufe mit einem Handrührgerät Typ HM-STM-1 (Durabrand, Wuppertal) gerührt. Das Sonnenblumenöl wurde langsam und kontinuierlich dazugegossen. Der Rührvorgang dauerte insgesamt 2 min.

Zugabe der Zusatzstoffe zur Mayonnaise

Die Zugabe der Fettsäuren erfolgte über das Sonnenblumenöl. Dazu wurde die Fettsäure auf 37°C temperiert und 0,2 bzw. 0,7 g der Fettsäure zum ebenfalls vorgewärmten Öl gegeben. Da sich Monolaurin im Öl nur schlecht verteilte, wurde 0,2 g Monolaurin in 1 ml Ethanol gelöst. Die gewünschte Menge des Ethanol/Monolauringemischs wurde vor der Keimzugabe untergemengt.

Natriumbenzoat wurde in dem Leitungswasser gelöst, das zur Herstellung der Mayonnaise verwendet wurde.

3.5.2 Durchführung der Lagerversuche bei 7°C

Das beimpfte Wasser und der beimpfte Phosphatpuffer (50 ml) wurden in 250-ml-Schottflaschen im Kühlschrank bei 7°C gelagert, das beimpfte Öl (20 ml) in 100-ml-Schottflaschen. Die Mayonnaise wurde im Herstellungsglas abgedeckt mit Aluminiumfolie aufbewahrt.

3.5.3 Durchführung der thermischen Abtötungsversuche

Die Temperaturbehandlung erfolgte in thermostatgeregelten Wasserbädern mit Schüttelvorrichtung: Köttermann 3047, Schüttelvorrichtung eingestellt auf Stufe 7 (Uetze/Hänigsen); GSL 1086, Schüttelvorrichtung eingestellt auf 100 U/min (Burgwedel). Die Temperatur des Wasserbades wurde während der Versuchsdauer mit einem Thermoelement, das sich in einem mit Wasser gefüllten Fiolax-Röhrchen befand, kontrolliert. Der Schwankungsbereich lag bei $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Für die Erhitzungsversuche mit entionisiertem Wasser, Phosphatpuffer und Öl wurden jeweils 3 ml des Erhitzungsmediums in dünnwandige Fiolaxgläser (Schott; Maße 10 x 75 mm) gegeben und mit Parafilm verschlossen. Die Mayonnaise wurde möglichst blasenfrei mit sterilen 10 ml Einwegspritzen mit angesteckten Silikonschläuchen in die Fiolax-Röhrchen eingefüllt und ebenfalls mit Parafilm abgedeckt.

Die einzelnen probengefüllten Röhrchen einer Erhitzungsreihe wurden in einem Reagenzglasständer ins vortemperierte Wasserbad gestellt. Dabei wurde darauf geachtet, daß der Wasserspiegel des Wasserbades knapp über dem oberen Rand des Inhalts der Fiolax-Röhrchen lag.

Die erhitzten Glasröhrchen wurden in bestimmten Zeitintervallen dem Wasserbad entnommen und ins Eiswasser gestellt. Die Keimzahlbestimmung erfolgte innerhalb von 4 h.

3.5.4 Durchführung der Hochdruckversuche

Die Hochdruckversuche wurden an einer FoodMicroLab Anlage (Stansted Fluid Power Inc., Stansted, Großbritannien) durchgeführt. Als Druckübertragungsmedium diente Ethanol und Rhizinusöl (80 : 20). Die Temperaturregelung erfolgt über ein Wasserbad (Haake GH, Karlsruhe, Deutschland) mit Thermostat. Während der Druckbehandlung konnte über einen internen Temperaturfühler die Temperatur in der Druckkammer aufgezeichnet werden.

Die Druckbehandlung erfolgte bei Drücken zwischen 350 und 800 MPa bei 20°C . Die Druckauf- und Druckabbaurate betrug 2 MPa/sec.

Als Probenbehälter dienten 2 ml Safe-Look Eppendorf Tubes (Artikelnummer 0030 120.094, Eppendorf), bei denen die Deckel abgezwickelt wurden. Sie wurden stattdessen mit Silikonstopfen verschlossen. Zusätzlich wurden die Eppendorf-Tubes in zurechtgeschnittene Zentrifugenröhrchen (Artikelnummer 62.554.502, Sarstedt), die mit Druckübertragungsflüssigkeit gefüllt waren und ebenfalls mit einem Silikonstopfen verschlossen wurden, verpackt, um bei Undichtigkeiten der Probengefäße ein Verschmutzen der Anlage zu vermeiden.

Die Mayonnaise wurde, wie für die Erhitzungsversuche, mit Einwegspritzen und Silikonschlauch in die Eppendorf-Tubes abgefüllt. Das Öl und das Wasser wurden mit der Pipette abgefüllt (pro Eppendorf-Tube 1,7 ml).

Die druckbehandelten Proben wurden bis zur Aufbereitung in einer mit Kühlakkus gekühlten Styroporschachtel aufbewahrt.

3.6 Bestimmung der antimikrobiellen Wirkung von Ölsäure, Caprinsäure und Monolaurin in Nährbouillon

Als Nährlösung für *Lc. lactis*, *E. coli* und *L. innocua* wurde CaSo-Bouillon eingesetzt, für *Asp. niger* wurde Malzbouillon verwendet. Die Bouillon wurde auf 37°C vorgewärmt, mit den gewaschenen Kulturen angeimpft und in Schottflaschen abgefüllt (pro Flasche 50 ml). Anschließend wurde die entsprechende Konzentration an Fettsäure bzw. Fettsäureester zugegeben.

Da Caprinsäure und Monolaurin bei Raumtemperatur fest sind und sich nur schwer mit der Bouillon mischen, wurden die Zusatzstoffe in Ethanol gelöst. Dazu wurden 0,2 g Fettsäure (auf 37°C erwärmt) oder 0,2 g Monolaurin in 1 ml Ethanol gelöst und die entsprechende Menge zur Bouillon gegeben, um die gewünschte Konzentration zu erhalten. Nach 10 min Einwirkzeit wurde 1 ml der Keimsuspension zu 9 ml Puffer gegeben und bis zur Keimzahlbestimmung ins Eiswasser gestellt.

3.7 Strukturelle Untersuchung der Mayonnaise

3.7.1 Bestimmung der Tröpfchengröße

Die Durchmesser der Öltröpfchen in der Mayonnaise (behandelt, unbehandelt) wurden im Lichtmikroskop (Axio, Carl Zeiss AG, Oberkochen) mit integrierter Kamera bei einer 1000-fachen Vergrößerung näherungsweise bestimmt.

3.7.2 Bestimmung der Viskosität

Die experimentelle Bestimmung der Viskosität der Mayonnaise erfolgte mit einem Torsionsrheometer (Dynamic stress, Typ SR 5000; Rheometric Scientific Inc, Picataway, USA). Es wurden folgende Versuchsreihen durchgeführt: Mayonnaise unbehandelt; Mayonnaise erhitzt auf 60°C für 30 min; Mayonnaise hochdruckbehandelt bei 500 MPa für 15 min.

4 ERGEBNISSE

4.1 Bestimmung der Hydrophobizität der Testmikroorganismen

Bei der Verteilung der Mikroorganismen zwischen der Öl- und Wasserphase spielt die Hydrophobizität der Zellhülle eine maßgebliche Rolle. Die Bestimmung der Zellhydrophobizität der Mikroorganismen erfolgte mit zwei Methoden. Zum einen wurde die Kontaktwinkelmessung, bei der der Randwinkel eines Wassertropfens auf einer Mikroorganismenschicht bestimmt wurde, zum anderen der MATH-Test durchgeführt. Dieser Test gibt die Verteilung von Mikroorganismen zwischen einer hydrophilen und einer hydrophoben Phase wieder.

4.1.1 Kontaktwinkelmessung

Bei Durchführung der Kontaktwinkelmessung stellte sich heraus, daß sich mit dem gewählten Versuchsaufbau nur eingeschränkt Ergebnisse erzielen ließen, weil der Flüssigkeitstropfen in Abhängigkeit von der Keimart zu schnell in den Mikroorganismenrasen auf dem Membranfilter eindiffundierte. Die Bestimmung der Höhe und Breite des Wassertropfens war nur für drei Mikroorganismen möglich. Die Stabilität des Wassertropfens konnte durch Variation der Trocknungszeit, -temperatur und -art sowie der Dicke der Mikroorganismenschicht nicht erhöht werden. Daher konnten nur für die drei in Tabelle 4-1 aufgeführten Testmikroorganismen Kontaktwinkel bestimmt werden. Je größer der Kontaktwinkel ist, um so hydrophober ist die Zellhülle der Mikroorganismen. Nach dieser Methode sind die Konidien von *Asp. niger* hydrophober als solche von *Pen. glabrum* und hydrophober als die Sporen von *B. subtilis*.

Tab. 4-1: Die errechneten Kontaktwinkel aus der Höhe und Breite eines Wassertropfens (bidestilliert) auf einer Bakterien- oder Schimmelpilzschicht zur Bestimmung der Hydrophobizität der Zelloberfläche von Mikroorganismen

Mikroorganismus	Bereich, in dem sich die gemessenen Kontaktwinkel bewegten [°]
<i>Asp. niger</i> (Konidien)	56 – 65
<i>Pen. glabrum</i> (Konidien)	24 – 29
<i>B. subtilis</i> (Sporen) ^{*)}	22 – 31

*) Gemisch aus Sporen + tote vegetative Zellen

4.1.2 MATH-Test

Bei Durchführung des MATH-Tests wurde für die wäßrige Phase zuerst entionisiertes Wasser und für die hydrophobe Phase Hexadekan verwendet. Da sich bei diesen zwei Flüssigkeiten keine bzw. nur sehr geringe Unterschiede in der optischen Dichte zwischen Ausgangs- und Endsuspension ergaben, die zum Teil im Meßgenauigkeitsbereich (letzte Kommastelle bei der photometrischen Messung) lagen, wurde in einer zweiten Versuchsreihe mit physiologischer Kochsalzlösung pH 4 gearbeitet. Wie aus Tabelle 4-2 zu entnehmen ist, waren hier die Unterschiede zwischen Ausgangs- und Endsuspension größer, d. h. es sind mehr Keime in das Hexadekan gewandert. Je mehr Mikroorganismen ins Hexadekan übergehen, d. h. je geringer der prozentuale Anteil in der Wasserphase ist (Werte in der Tabelle 4-2), desto hydrophober ist der betreffende Mikroorganismus. Nach diesem Test sind *E. coli* und *P. anomala* hydrophiler als *L. innocua* und *Lc. lactis*.

Tab. 4-2: Prozentualer Anteil an Mikroorganismen, die in der Wasserphase (entionisiertes Wasser oder 0,9 %ige Kochsalzlösung pH 4) verblieben sind, bei Durchführung des MATH-Tests zur Bestimmung der Hydrophobizität der Zelloberfläche

Mikroorganismus	Wiederfindung in der Wasserphase in [%]					
	entionisiertes Wasser			Kochsalzlösung (0,9 %ig, pH 4)		
	Min	Max	Ø ^{***)}	Min	Max	Ø ^{***)}
<i>A. acidoterrestris</i> (Sporen) ^{*)}	98,3	99,0	98,7	88,9	93,8	91,2
<i>B. subtilis</i> (Sporen) ^{*)}	98,8	101,9 ^{**)}	100,3^{**)}	90,9	97,6	94,8
<i>E. coli</i>	99,6	103,3 ^{**)}	101,6^{**)}	93,2	97,8	95,3
<i>L. innocua</i>	98,6	100,3 ^{**)}	99,6	91,8	77,5	86,7
<i>Lc. lactis</i>	95,0	98,3	96,0	86,9	88,1	87,5
<i>P. anomala</i>	97,7	101,4 ^{**)}	99,3	96,0	99,3	97,4

*) Gemisch aus Sporen + tote vegetative Zellen

***) Wiederfindungsraten über 100 % sind beim MATH-Test methodisch bedingt und werden in der Diskussion (S. 73 f) erläutert.

****) arithmetisches Mittel aus fünf Versuchsansätzen

Durch Pasteurisieren wurden die vegetativen Zellen von *B. subtilis* und *A. acidoterrestris* zwar abgetötet, die toten Zellen verblieben jedoch in der Suspension und konnten ebenfalls ins Hexadekan übergehen. Es wurden also keine reinen Sporensuspensionen verwendet, was bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden muß.

Für *Asp. niger* und *Pen. glabrum* wurden keine photometrischen Messungen zur Bestimmung der Hydrophobizität durchgeführt, da es aufgrund der Sporengewinnung mit Seesand zu einer starken Trübung der Konidien-sporensuspension kam. Daher konnten mit diesen Suspensionen keine brauchbaren Ergebnisse erzielt werden.

Bei *S. cerevisiae* schwankte der Extinktionswert beim Einstellen der Ausgangssuspension auf $OD_{600} = 0,3$ sehr stark, so daß ebenfalls keine weiteren Messungen durchführt wurden.

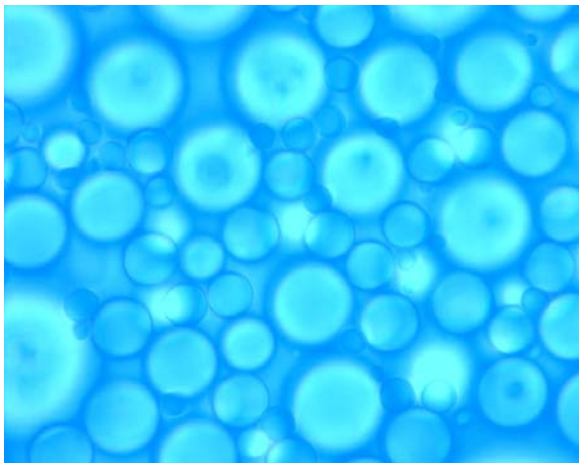
Bei der Durchführung des MATH-Tests wurde deutlich, daß das Wasch- und Suspendiermedium einen Einfluß auf die Oberflächenbeschaffenheit bzw. auf die Oberflächenladung ausübt.

Wie sich später zeigte, sind die mit der Kontaktwinkelmessung bzw. dem MATH-Test erhaltenen Ergebnisse nur zum Teil auf O/W-Emulsionen zu übertragen und somit für das Verhalten der Mikroorganismen in fetthaltigen Lebensmitteln (z. B. Mayonnaisen) nur von begrenzter Aussagekraft. Aus diesem Grund wurde eine Methode entwickelt (vgl. Material und Methodik, Kap. 3.4, S. 29 ff), die es erlaubt, die Verteilung der Mikroorganismen im binären Systemen zu bestimmen.

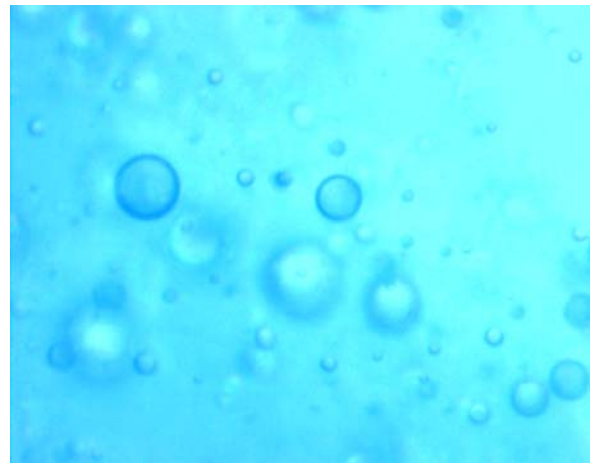
4.2 Verteilung der Testmikroorganismen in Emulsionen

Die Verteilung der Mikroorganismen wurde in standardisierten Emulsionen aus entionisiertem Wasser und Sonnenblumenöl vom Typ Öl-in-Wasser (ohne und mit Emulgator Natriumdodecylsulfat) und Wasser-in-Öl untersucht. Die Zugabe der Testmikroorganismen erfolgte als Keim-, Sporen- oder Konidiensporensuspension über das für die Emulsionsherstellung verwendete entionisierte Wasser. Die Tropfengröße der diskontinuierlichen Phase wurde durch mikroskopische Betrachtung der Emulsionen bestimmt. Bei den O/W-Emulsionen ohne Emulgator lag die Größe der Öltröpfchen im Durchschnitt zwischen 5 und 15 μm . Bei den O/W-Emulsionen mit Emulgator waren die Tröpfchen etwas kleiner und lagen durchschnittlich zwischen 3 und 10 μm . Bei den W/O-Emulsionen ohne Emulgator konnte die Tropfengröße nur schwer bestimmt werden, weil die Emulsionen sehr instabil waren.

O/W-Emulsion ohne Emulgator



W/O-Emulsion ohne Emulgator



O/W-Emulsion mit SLS als Emulgator

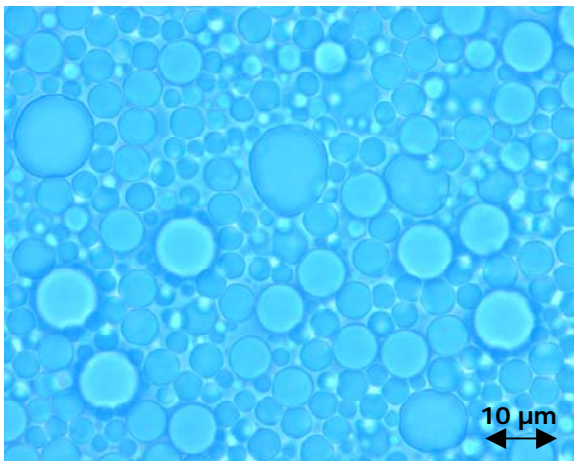


Abb. 4-1: Mikroskopische Aufnahme einer O/W-Emulsion ohne Emulgator, einer W/O-Emulsion ohne Emulgator und einer O/W-Emulsion mit Natriumdodecylsulfat (SLS) als Emulgator in 1000-facher Vergrößerung

Auch wenn Emulsionen ruhend gelagert werden, bewegen sich die Tröpfchen der dispersen Phase. Ohne Zusatz von Emulgatoren und Stabilisatoren kommt es aufgrund des Dichteunterschieds zwischen Öl und Wasser zum Aufrahmen der Öltröpfchen. Es zeigte sich, daß sich die O/W-Emulsionen deutlich langsamer entmischten als die W/O-Emulsionen (bei gleicher Umdrehungszahl und Dispergierzeit). Deshalb wurden die Phasen der O/W-Emulsionen nach 4 h und bei den W/O-Emulsionen schon nach 2 h abgegelassen. Trotz der doppelt so langen Standzeit war die Entmischung bei den O/W-Emulsionen schlechter als beim anderen Emulsionstyp. So befand sich zwischen den Phasen eine dünne, noch nicht getrennte Emulsionsschicht, die sich auch bei verlängerter Standzeit von 4 h auf 48 h nicht entmischte und deren Öl- und Wasseranteil nicht genau bestimmt werden konnte. Auf das Gesamtvolumen bezogen machte diese Emulsionsschicht im Durchschnitt 3 Vol.-% aus. Das Volumen dieser Emulsionsschicht variierte je nach verwendetem Öl geringfügig. So hatten Emulsionen aus Rapsöl die volumenmäßig kleinste Zwischenschicht aus nicht geschiedener Emulsion.

Die Wasserphase der O/W-Emulsionen war milchig trüb, bei den W/O-Emulsionen klar. Die Ölschicht war bei beiden Emulsionsarten trüb. Diese Trübung wurde durch die unvollständige Trennung der Phasen hervorgerufen, d. h. die Wasserphase enthielt noch Reste des Öls und in der Ölphase befanden sich andererseits noch Reste des Wassers. Über gravimetrische Messungen der Phasen vor und nach dem Austreiben des Wassers (im Trockenschrank bei 110°C) wurde der jeweilige Anteil errechnet: Bei O/W-Emulsionen, die sich schlechter trennen, ist der Ölanteil in der Wasserphase < 1,98 %, der Wasseranteil in der Ölphase < 3,35 %. Für W/O-Emulsionen war in der Wasserphase kein Öl nachweisbar, während die Ölphase einen Restwasseranteil < 8,98 % enthielt. Bei den O/W-Emulsionen mit Emulgatorzusatz war der Ölanteil im Wasser < 1,88 % und Wasseranteil im Öl < 0,48 %.

4.2.1 Bestimmung der Verteilung der Mikroorganismen in O/W- und W/O-Emulsionen ohne Emulgator

Über die Verteilung von Mikroorganismen in Emulsionen liegen kaum Untersuchungen vor, daher wurde ein eigenes Einteilungsverfahren erarbeitet. Die Einteilung beruht auf der Bestimmung des prozentualen Anteils der Mikroorganismen, die in der Wasserphase verbleiben. Daraus ergibt sich folgendes: Sind die Mikroorganismen gleichmäßig auf die Phasen verteilt, beträgt die Wiederfindung in der Wasserphase 50 %, bei Werten > 50 % liegen mehr Keime in der Wasserphase (blau gekennzeichnet) vor, bei Werten < 50 % mehr in der Ölphase (rot gekennzeichnet). Bei den O/W-Emulsionen blieben die ermittelten Keimzahlen in der nicht phasengetrenten Zwischenschicht unberücksichtigt. Eine Phasenzuordnung der Mikroorganismen konnte in dieser nicht getrennten Übergangsschicht experimentell nicht durchgeführt werden.

In dieser Schicht war die Keimdichte normalerweise am höchsten. Die in dieser Zwischenschicht bestimmten Keimzahlen lagen im Durchschnitt um eine Zehnerpotenz höher als in der separaten Phase mit der höchsten Wiederfindungsrate. Dies deckt sich mit Ergebnissen von anderen Autoren [BROCKLEHURST ET AL., 1993].

Tab. 4-3: Prozentuale Wiederfindung der Mikroorganismen in der Wasserphase in O/W- und W/O-Emulsionen (Sonnenblumenöl/entionisiertes Wasser) ohne Zugabe eines Emulgators

Mikroorganismus	Wiederfindung in der Wasserphase in [%]					
	O/W-Emulsion			W/O-Emulsion		
	Min	Max	Ø ^{***)}	Min	Max	Ø ^{***)}
<i>A. acidoterrestris</i> (Sporen) ^{*)}	79,7	97,0	90,2	70,2	85,9	73,2
<i>B. subtilis</i> (Sporen) ^{*)}	0,63	17,0	9,4	36,1	12,1	25,0
<i>B. stearothermophilus</i> (Sporen) ^{*)**)}	—	—	—	13,6	44,6	15,7
<i>E. coli</i>	88,2	98,8	95,8	82,3	94,4	93,2
<i>L. innocua</i>	87,5	97,1	92,7	21,0	86,7	66,1
<i>Lc. lactis</i>	(97,3)	(99,2)	(98,1)	(95,5)	(99,7)	(99,1)
<i>P. anomala</i>	83,5	92,0	87,3	95,6	98,1	96,7
<i>S. cerevisiae</i>	68,0	88,9	83,3	86,1	93,5	88,0
<i>Asp. niger</i> (Konidien)	0,4	9,3	3,8	3,2	10,0	4,2
<i>Pen. glabrum</i> (Konidien)	0,9	32,8	5,5	9,4	73,6	44,0

^{*)} Gemisch aus Sporen + toten vegetativen Zellen

^{**)} Bei O/W-Emulsion wurde die Verteilung nicht bestimmt.

^{***)} arithmetisches Mittel aus fünf Versuchsansätzen

Die Gesamtkeimzahl in den Emulsionen wurde sofort nach der Herstellung und nach der Standzeit von 2 bzw. 4 h überprüft. Bei *Lc. lactis* ging die Gesamtkeimzahl innerhalb 2 bzw. 4 h um mehrere Zehnerpotenzen zurück, d. h. *Lc. lactis* starb während des Versuchsverlaufes ab. Daher sind die Ergebnisse nur eingeschränkt wertbar und in Tabelle 4-3 eingeklammert wiedergegeben.

Bei *B. subtilis*-Sporen und bei *Asp. niger*-Konidien traten größere Schwankungen in Abhängigkeit von der Bakterien- bzw. Konidiensporensuspension auf. Trotz festgelegter Anzuchtbedingungen konnten die Ergebnisse mit einer neu hergestellten Suspension nur eingeschränkt bestätigt werden. Auch bei *L. innocua* differierten die Ergebnisse in den W/O-Emulsionen stark. So lagen die *L. innocua*-Zellen abhängig vom Versuch mal in der Wasserphase mal in der Ölphase vermehrt vor (vgl. Minimal- und Maximalwerte).

Wie die Vorversuche gemäß Kap. 4.4.1 (Kontaktwinkelmessung) erwarten ließen, ging die Mehrheit der Schimmelpilzsporen ins Öl über. Auch die Bakteriensporen von *B. subtilis* und *B. stearothermophilus* befanden sich vorwiegend in der Ölphase. Bei *A. acidoterrestris* verblieb

der überwiegende Teil der Sporen hingegen in der Wasserphase. Alle gestesteten vegetativen Bakterien und Hefen wurden bevorzugt in der Wasserphase aufgefunden.

Mit Ausnahme von *L. innocua*, *A. acidoterrestris* und *E. coli* wurden in der Wasserphase der W/O-Emulsionen höhere Anteile der Mikroorganismen gefunden als in der Wasserphase der O/W-Emulsionen. Der Übergang von der Wasserphase in die Ölphase war also bei W/O-Emulsionen erschwert.

Versuche zur Verteilung der Mikroorganismen zwischen den Phasen bei beimpfter Ölphase wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt, da diese Thematik in einer parallel erstellten Diplomarbeit [DUDEK, 2004] analysiert wurde. Es konnte gezeigt werden, daß auch in diesem Fall bei der Emulsionbildung ein Phasenübergang (hier von der Öl- in die Wasserphase) mit ähnlicher Verteilung der Mikroorganismen beobachtet werden konnte.

4.2.2 Bestimmung der Verteilung der Mikroorganismen in O/W-Emulsionen mit Emulgator-Zusatz

Die Verteilungsversuche mit dem Emulgator Natriumdodecylsulfat wurden nur mit einer Auswahl von Testmikroorganismen durchgeführt, da die gram-positiven vegetativen Bakterien durch das kationische Tensid in den Konzentrationen, die nötig waren, um später die Emulsion zu trennen, abgetötet wurden. Zudem lieferten die Versuche mit *B. subtilis*-Sporen kaum reproduzierbare Ergebnisse.

Durch den Einsatz von Natriumdodecylsulfat wurde die Verteilung, außer bei *Pen. glabrum*, nur geringfügig beeinflusst. Bei *Pen. glabrum* wurde der Übergang in die Wasserphase begünstigt, so daß in der Wasserphase mehr Konidien gefunden wurden als in der Ölphase.

Tab. 4-4: Prozentuale Wiederfindung der Mikroorganismen in der Wasserphase in O/W-Emulsionen (Sonnenblumenöl/entionisiertes Wasser) mit Zugabe des Emulgators Natriumdodecylsulfat

Mikroorganismus	Wiederfindung in der Wasserphase in [%]		
	Min	Max	Ø
<i>A. acidoterrestris</i> (Sporen) *)	94,5	99,6	96,0
<i>E. coli</i>	96,4	98,3	97,5
<i>P. anomala</i>	75,2	94,9	88,9
<i>S. cerevisiae</i>	82,1	92,3	89,3
<i>Asp. niger</i> (Konidien)	1,5	6,3	2,2
<i>Pen. glabrum</i> (Konidien)	46,8	74,9	61,2

*) Gemisch aus Sporen + toten vegetativen Zellen

4.2.3 Bestimmung von Einflußfaktoren bei der Verteilung in O/W-Emulsionen

4.2.3.1 Ölart

Für *E. coli*, *P. anomala*, *Asp. niger*-Konidiosporen und *A. acidoterrestris*-Sporen wurde der Einfluß der Ölart (Sonnenblumenöl, Rapsöl und Olivenöl) auf das Verteilungsverhältnis in O/W-Emulsionen bestimmt (Abb. 4-2).

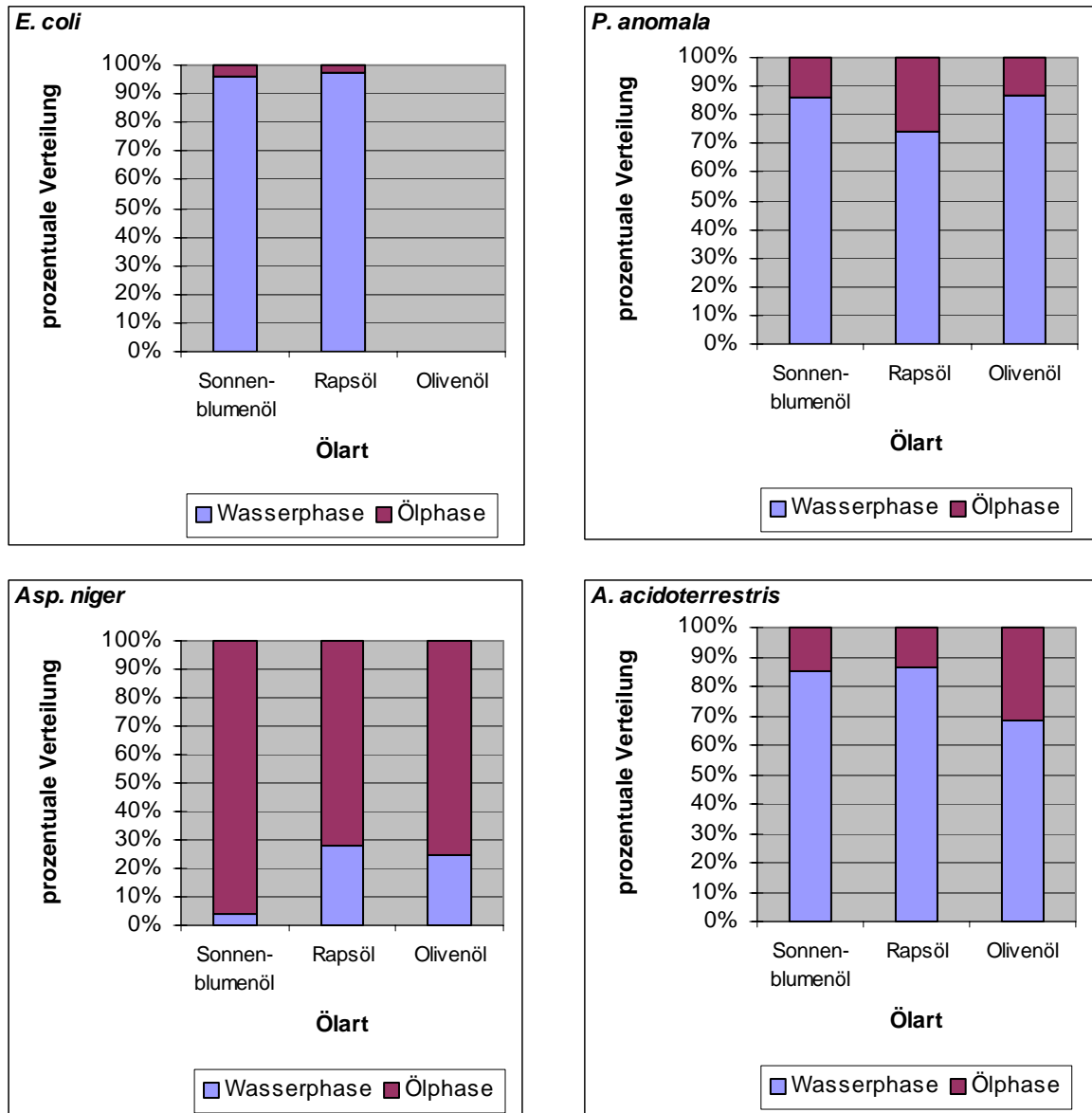


Abb. 4-2: Einfluß der Ölart auf die Verteilung der Testmikroorganismen in der Wasser- und Ölphase von O/W-Emulsionen

Der Einfluß der Ölart war relativ gering, die größten Unterschiede wurden bei *Asp. niger*-Konidien beobachtet. In den Emulsionen mit Rapsöl und Olivenöl befanden sich ca. 7 – 9 mal mehr Konidien in der Wasserphase als in den Emulsionen mit Sonnenblumenöl. Eine einheitliche Verschiebung des Verteilungsverhältnisses aufgrund der Ölsorte wurde nicht festgestellt (Abb. 4-2). Für *E. coli* konnte die Verteilung in Olivenöl nicht angegeben werden, da die Bakterien in Olivenöl abgestorben waren: Innerhalb von 24 h ging die Keimzahl bereits um mehrere Zehnerpotenzen zurück und nach 48 h war *E. coli* nicht mehr nachweisbar.

4.2.3.2 Ionenkonzentration in der Wasserphase

In einem weiteren Versuch wurde für *E. coli* die Auswirkung einer unterschiedlichen Ionenkonzentration in der Wasserphase bei der Verteilung untersucht. Zum einen wurde eine O/W-Emulsion mit entionisiertem Wasser, zum anderen mit Sørensenphosphatpuffer pH 7 (vgl. Tab. 3-2) hergestellt. Die unterschiedliche Verteilung der Bakterien ist in Abbildung 4-3 dargestellt. Durch den erhöhten Gehalt an Elektrolyten in der Wasserphase gingen mehr Bakterien in das Öl über.

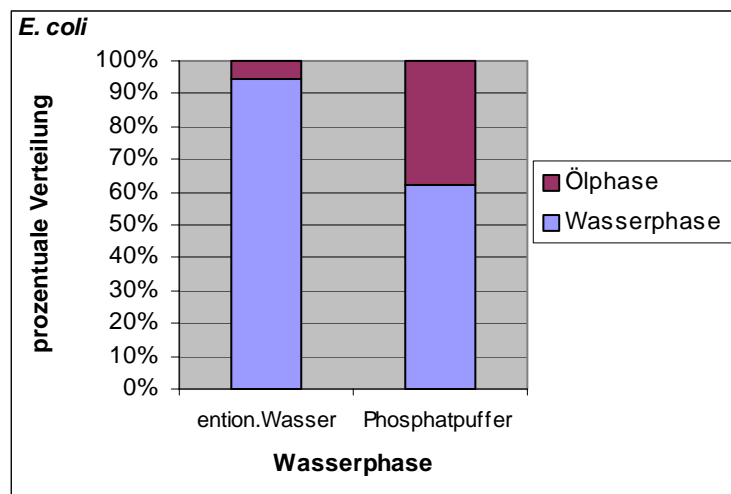


Abb. 4-3: Einfluß der Ionenkonzentration auf die Verteilung von *E. coli* in der Wasser- und Ölphase von O/W-Emulsionen (Sonnenblumenöl/entionisiertes Wasser)

4.2.3.3 Wachstumsphase

Am Beispiel von *E. coli* wurde der Einfluß der Wachstumsphase auf die Verteilung bestimmt. Mit den durchgeführten Versuchen konnte kein erkennbarer Unterschied in der Verteilung in Abhängigkeit von der Wachstumsphase festgestellt werden (Abb. 4-4).

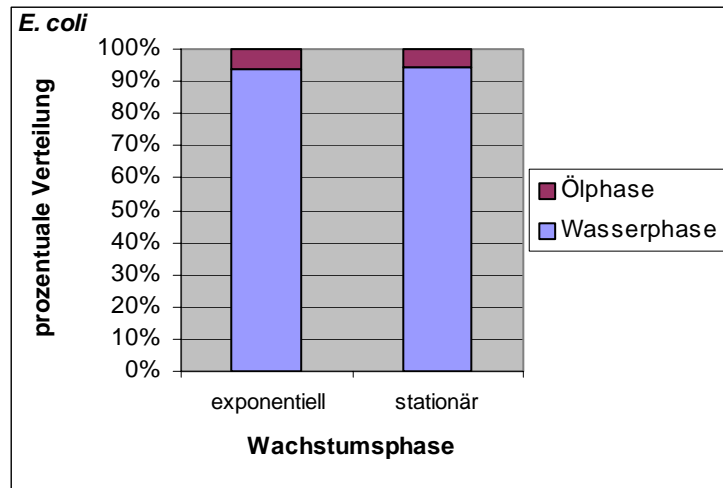


Abb. 4-4: Einfluß der **Wachstumsphase** auf die Verteilung von *E. coli* in der Wasser- und Ölphase von O/W-Emulsionen (Sonnenblumenöl/emulsiertes Wasser)

4.3 Gefriertrocknung der Testmikroorganismen und Animpfen des Öls

Um die Mikroorganismen wasserfrei im Öl verteilen zu können, wurden diese gefriergetrocknet. Dabei wurde auf Gefrierschutzmittel wie Glycerin, Magermilchpulver oder meso-Inosit verzichtet, um bei den anschließenden Versuchen keine weitere Variable zu haben, die einen Einfluß ausüben könnte. Durch den Wegfall dieser Schutzsubstanzen wurde jedoch die Überlebensrate bei der Gefriertrocknung und die Lagerfähigkeit der gefriergetrockneten Mikroorganismen bei -18°C beeinträchtigt. Die Keimzahlen von *Lc. lactis*, *L. innocua* und *P. anomala* vor und nach der Gefriertrocknung unterschieden sich um bis zu zwei Zehnerpotenzen. Bei *Asp. niger*-Konidien wurde keine Reduzierung der Keimzahl festgestellt, während *E. coli* unter den angegebenen Bedingungen überhaupt nicht in lebensfähigem Zustand getrocknet werden konnte.

Als gefriergetrocknete Kultur war *L. innocua* bei -18°C für einen Zeitraum von zwei Monaten mit nur geringen Verlusten lagerbar. *Lc. lactis* erwies sich als weniger lagerstabil, daher wurde dieses Bakterium maximal vier Wochen gelagert. Bei *Asp. niger*-Konidien kam es während der Lagerung zu keinem Rückgang der Keimzahl.

Allgemein stellte die gleichmäßige Verteilung der wasserfreien, gefriergetrockneten Testmikroorganismen bei den Versuchen in Öl ein Problem dar. Die von ZUCCARO ET AL. [1951] vorgeschlagene Methode die Mikroorganismen mit einem Mörser im Öl zu verteilen, war für die Versuche in dieser Arbeit nicht brauchbar, da hierzu größere Mengen an gefriergetrockneten Kulturen notwendig gewesen wären. Daher wurden in dieser Arbeit die gefriergetrockneten Mikroorganismen in eine 100-ml-Schottflasche gegeben und durch kräftiges Schütteln verteilt. Die noch vorhandenen, sichtbaren Verklumpungen konnten selbst durch Homogenisieren im Öl mit dem Ultraturrax, durch Schütteln auf dem Vortex in einem geeigneten Gefäß mit Glaskugeln oder durch eine Behandlung im Ultraschallbad nicht beseitigt werden: Die Koloniezahlen von *L. innocua* vor und nach einer solchen Behandlung variierten nur geringfügig.

4.4 Lagerung der Testmikroorganismen in Wasser, Mayonnaise und Sonnenblumenöl bei 7°C

Mikroorganismen wachsen in Öl nicht, da das notwendige Wasser fehlt. Dennoch überdauern in Öl nicht nur Sporen, sondern über einen gewissen Zeitraum auch vegetative Zellen, wie die nachfolgenden Versuche zeigen. Es wurde untersucht, wie lange Zellen von *L. innocua*, *Lc. lactis* und *Asp. niger*-Konidien in der Lage sind in Öl, in wäßrigen Medien (entionisiertes Wasser, Leitungswasser und Phosphatpuffer pH 7) und in Mayonnaise bei 7°C zu überleben.

Es zeigte sich, daß die Überlebensrate der gefriergetrockneten Kulturen in Öl von der vorausgegangen Aufbewahrungszeit bei -18°C abhängig war. Denn die Kulturen wurden nach der Gefriertrocknung tiefgefroren und im Tiefkühlfach bis zum Versuchsansatz aufbewahrt. Je länger die vorausgegangene Aufbewahrungszeit war, desto geringer war die Lagerstabilität der Keime in Öl. Dieser Einfluß war bei *Lc. lactis* stärker ausgeprägt als bei *L. innocua*.

In Abbildung 4-5 sind die Ergebnisse für alle drei Mikroorganismenarten zusammengestellt:

L. innocua wies eine hohe Stabilität in Sonnenblumenöl auf. Die Überlebensrate in Öl lag nur knapp unter der Überlebensrate in Phosphatpuffer und sogar deutlich über der Lebendkeimzahl in Leitungswasser und entionisiertem Wasser. Die Keimzahl ging in Sonnenblumenöl innerhalb von 28 Tagen nur um zwei Zehnerpotenzen zurück. Überraschend war die schlechte Überlebensrate in Freisinger Leitungswasser. Innerhalb der ersten drei Tage nahm die Keimzahl um fast vier Zehnerpotenzen ab, was möglicherweise auf eine Chlorierung des Trinkwassers zurückzuführen sein könnte.

Bei *Lc. lactis* traten größere Unterschiede bei dem Wiederholungsversuch in Sonnenblumenöl auf. Daher wurden die Versuchsreihen einzeln dargestellt und als Sonnenblumenöl A und Sonnenblumenöl B bezeichnet. Trotz dieser Abweichungen ist aus den Versuchen erkennbar, daß *Lc. lactis* nur eine sehr begrenzte Zeit in Öl überleben kann, annähernd vergleichbar mit der Überlebensrate in Mayonnaise. Auch zeigte dieses Bakterium eine auffallend hohe Absterberate in Freisinger Leitungswasser und in entionisiertem Wasser.

Da bekannt ist, daß *Asp. niger*-Konidien in wäßrigen Medien über einen langen Zeitraum lagerbar sind, wurden für Phosphatpuffer, Leitungswasser und entionisiertes Wasser keine Überlebensraten bestimmt. Es stellte sich heraus, daß *Asp. niger*-Konidien auch in Mayonnaise und Sonnenblumenöl eine hohe Stabilität aufweisen.

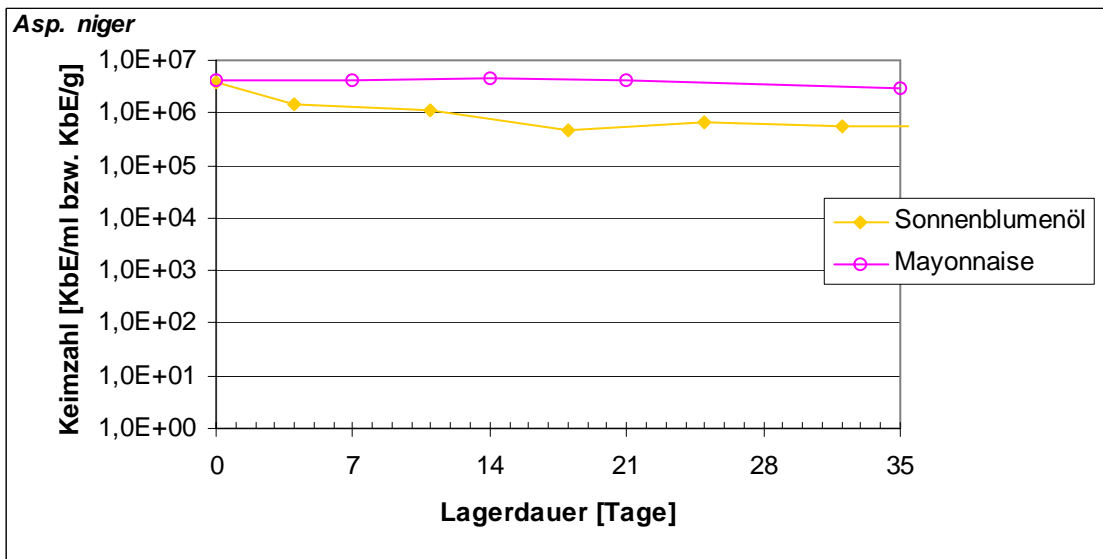
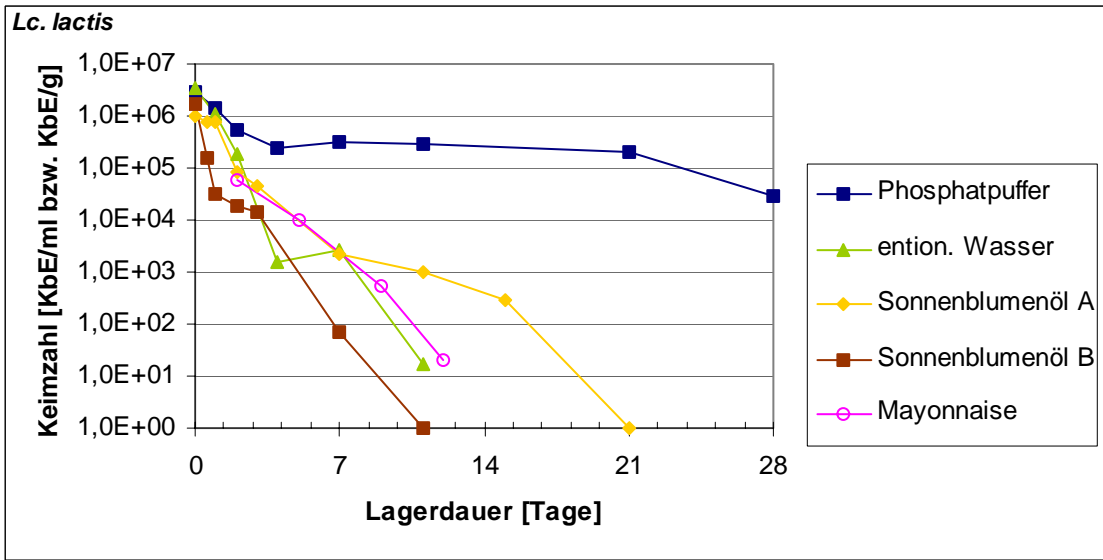
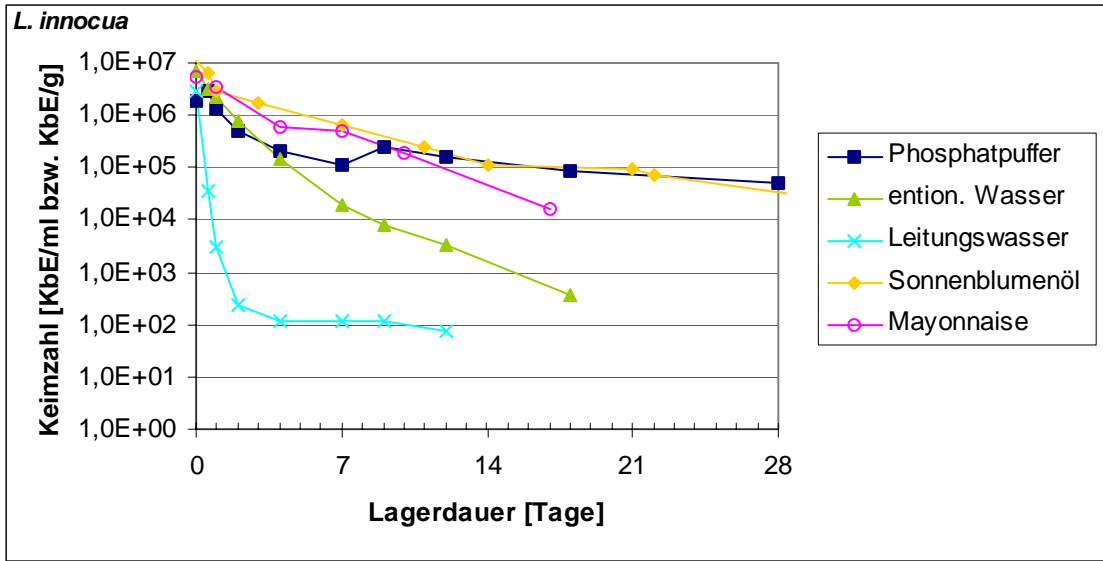


Abb. 4-5: Keimzahlreduktion von *L. innocua*, *Lc. lactis* und *Asp. niger* in Phosphatpuffer, entionisiertem Wasser, Leitungswasser, Sonnenblumenöl und Mayonnaise während einer Kühlung bei 7°C (Keimzahlen für Mayonnaise in KbE/g, für wässrige Lösungen und Öl in KbE/ml)

4.5 Thermische Behandlung

Anhand von *L. innocua* und *Lc. lactis* als Testmikroorganismen wurde der Einfluß des Umgebungsmediums bei einer thermischen Behandlung untersucht und mit den Ergebnissen der Hochdruckbehandlung verglichen. Für bestimmte Versuche wurden auch weitere Mikroorganismen (*E. coli* und *Asp. niger*) herangezogen.

4.5.1 Einfluß des Erhitzungsgefäßes auf die Abtötungskinetik von *E. coli*

Die erwartete exponentielle Abtötungskurve in Wasser konnte für *E. coli* bei den Erhitzungsversuchen in gewöhnlichen Duran[®]-Reagenzgläsern nicht ermittelt werden. Nach einem anfänglich linearen Verlauf (in halblogarithmischer Darstellung) konnte nach ca. 3 min keine weitere Abtötung von *E. coli* festgestellt werden. Es kam zur Bildung eines Stagnationsplateaus (= Tailing). Es wurde vermutet, daß dies durch Verklumpungen des Keims, die z. B. bei der Gewinnung der Keimsuspension (Zentrifugieren bei 9.000 U/min) entstanden waren, hervorgerufen wurde. Daher wurde die Bakteriensuspension vor der Hitzebehandlung zum einen für 10 min in ein Ultraschallbad gestellt, zum anderen wurde die Bakteriensuspension mit dem Ultraturrax bei 17800 U/min für 3 min homogenisiert. Beide Behandlungsverfahren hatten keinen wesentlichen Einfluß auf das Versuchsergebnis (Abb. 4-6). Eine lineare Abtötungskurve wurde erst erreicht als schmale, dünnwandige Schott Fiolax[®]-Reagenzgläser (Wandstärke 0,4 – 0,5 mm; Durchmesser 10 mm) eingesetzt wurden.

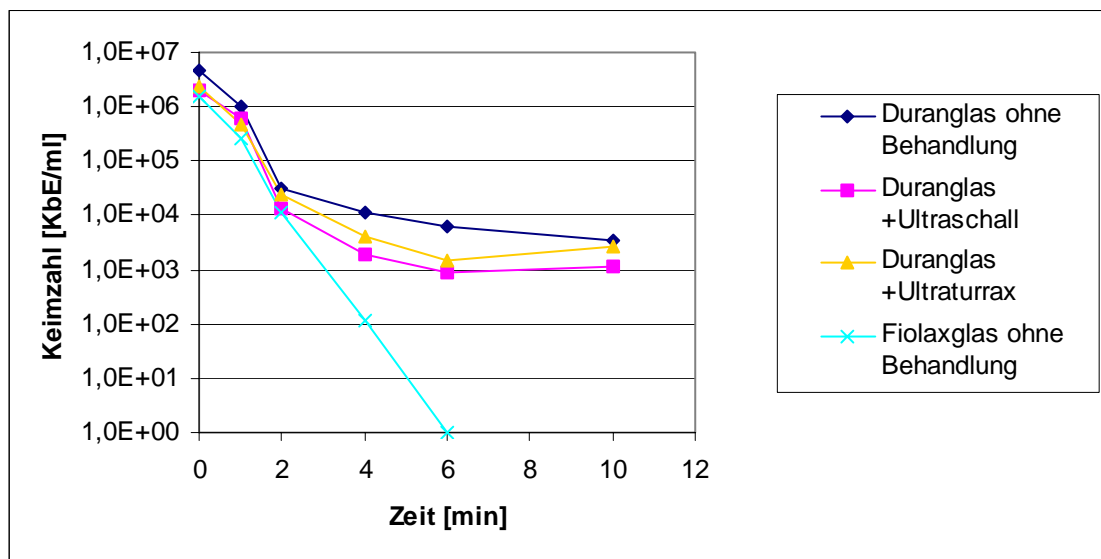


Abb. 4-6: Einfluß des Erhitzungsgefäßes (Duran[®]- oder Fiolax[®]-Reagenzgläser der Firma Schott) sowie eine vorherige Ultraschall- oder Ultraturraxbehandlung auf die thermische Abtötung von *E. coli* bei 60°C in entionisiertem Wasser

4.5.2 Auswirkungen des Erhitzungsmediums (entionisiertes Wasser, Mayonnaise und Sonnenblumenöl) auf die Abtötung der Testmikroorganismen

Eine nicht-exponentielle Abtötung von *Lactobacillus buchneri* und *Pichia membranaefaciens* in Mayonnaise wurde schon von CERNY UND HENNLICH [1983] nachgewiesen. Als Grund hierfür wurde der hohe Ölanteil angeführt. Die Hitzeinaktivierung in Mayonnaise wurde für zwei weitere Bakterien, *L. innocua* und *Lc. lactis*, untersucht. Darüberhinaus wurde die Keimzahlreduzierung in Mayonnaise mit den Abtötungskurven in Wasser bzw. Öl verglichen.

Um Effekte, die durch die verzögerte Hitzeübertragung der Medien hervorgerufen wurden, besser erkennen zu können, wurden zuerst für die verschiedenen Medien Temperaturprofile erstellt. Es zeigte sich, daß in Wasser innerhalb von 1 min sicher die vorgegebenen Temperaturen (50, 55, 60, 70°C) erreicht wurden, in Mayonnaise und Öl innerhalb von 3 min. Daher wurde erst zu diesen Zeitpunkten eine Keimzahlbestimmung durchgeführt.

4.5.2.1 *L. innocua*

In Abbildung 4-7 sind die Abtötungskinetiken von *L. innocua* bei 55 und 60°C in entionisiertem Wasser, Mayonnaise und Sonnenblumenöl gegenübergestellt. Wie zu erwarten war, fand in entionisiertem Wasser eine schnelle exponentielle Abtötung von *L. innocua* bei 50 und 60°C statt.

In Sonnenblumenöl blieb die Keimzahl bei 55 und 60°C unverändert.

In Mayonnaise dagegen kam es bei 55°C zu einer kontinuierlichen Abtötung um vier Zehnerpotenzen von *L. innocua* innerhalb von 30 min. Ein Stagnationsplateau war bei 55°C nicht erkennbar, bei 60°C kam es hingegen nur zu einer verzögerten Ausbildung eines Plateaus.

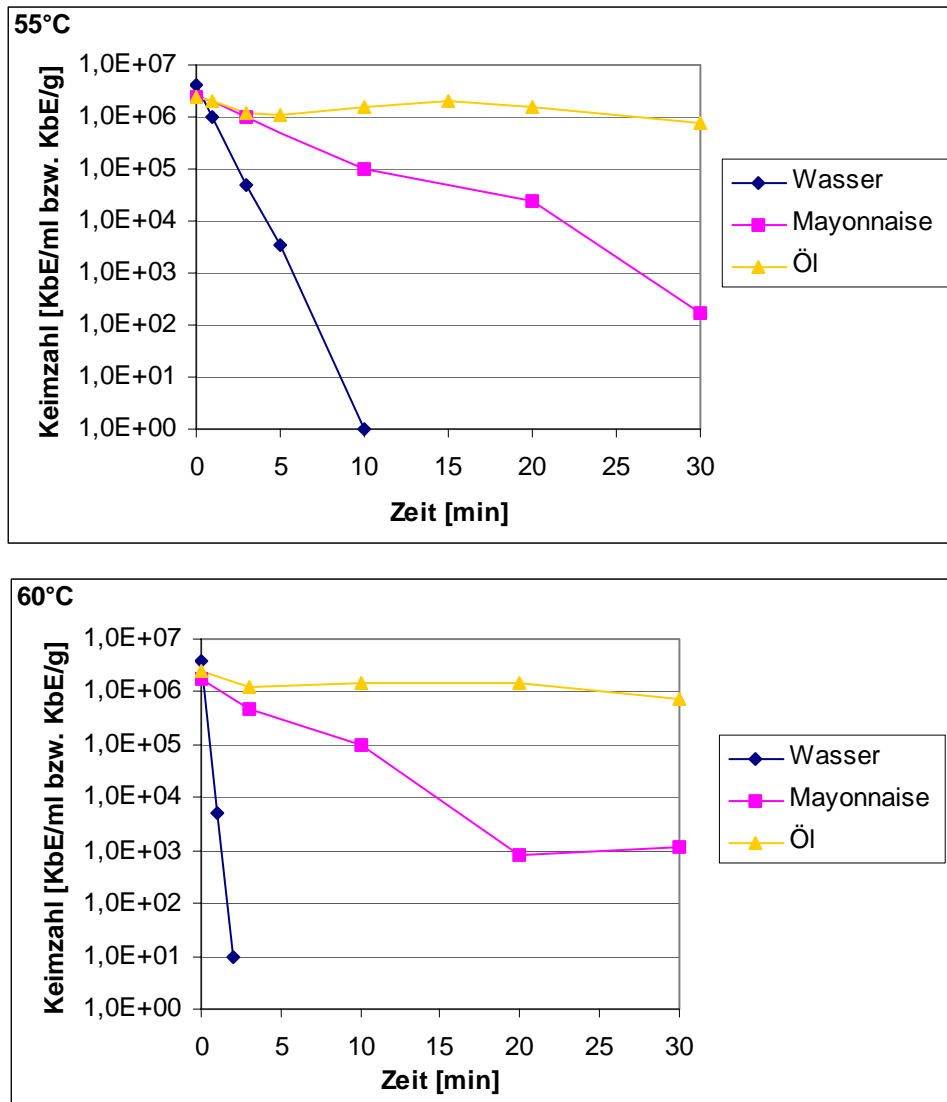


Abb. 4-7: Thermische Abtötung von *L. innocua* in entionisiertem Wasser, Mayonnaise und Sonnenblumenöl bei 55 und 60°C (Keimzahlen für Mayonnaise in KbE/g, für wässrige Lösungen und Öl in KbE/ml)

4.5.2.2 *Lc. lactis*

Für *Lc. lactis* wurde ebenfalls die Hitzeabtötung in den drei Medien bestimmt (Abb. 4-8). Da dieser Keim eine stärkere Hitzeempfindlichkeit aufwies als *L. innocua*, wurden die vergleichenden Erhitzungsversuche auch bei 50°C durchgeführt.

In entionisiertem Wasser kam es bei 50°C innerhalb von 20 min zu einer Abtötung um mehr als fünf Zehnerpotenzen, bei 55°C wurde dies innerhalb von 5 min und bei 60°C in weniger als 2 min erreicht.

In Sonnenblumenöl kam es bei 50°C zu einer Reduzierung der Keimzahl um zwei Zehnerpotenzen innerhalb von 25 min. Bei 60°C war die Abtötung in Öl sogar besser als in Mayonnaise.

Bei 50°C war in Mayonnaise noch kein Stagnationsplateau im angegebenen Zeitraum erkennbar, jedoch bei 55 und vor allem bei 60°C.

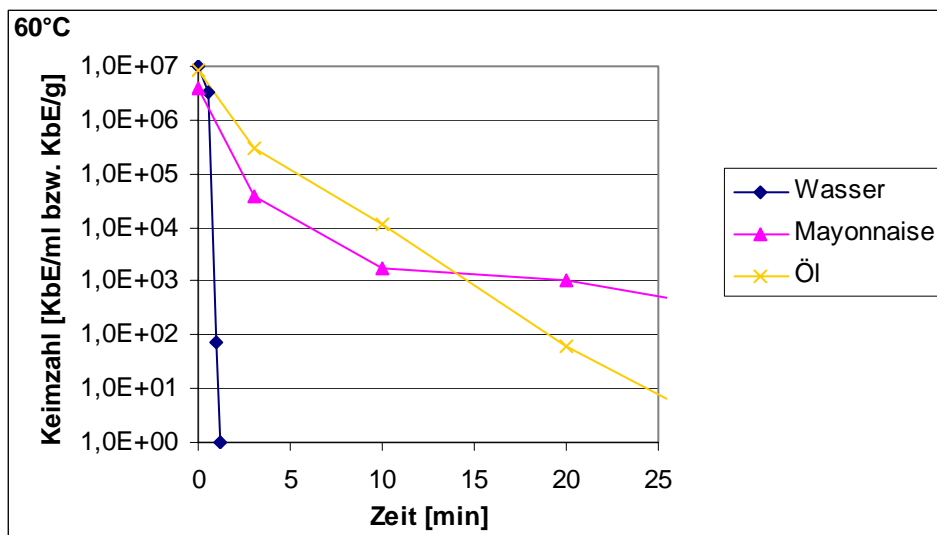
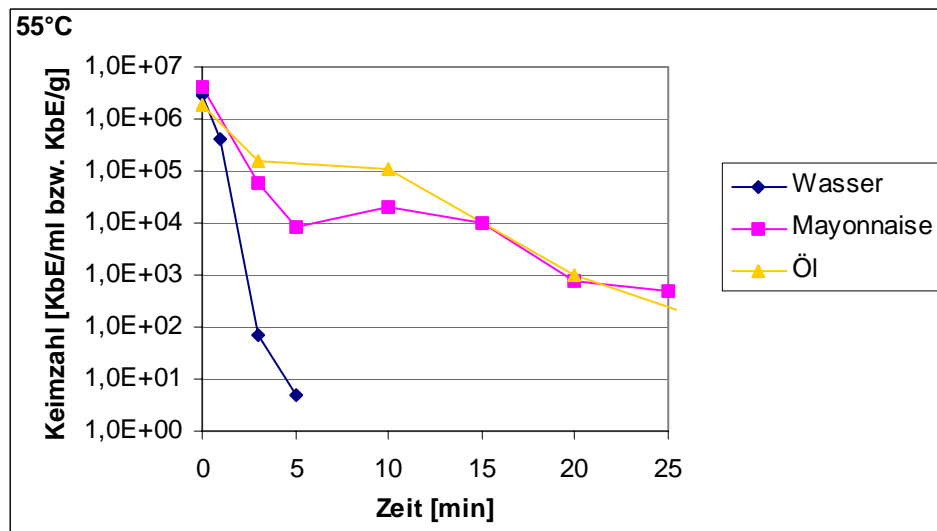
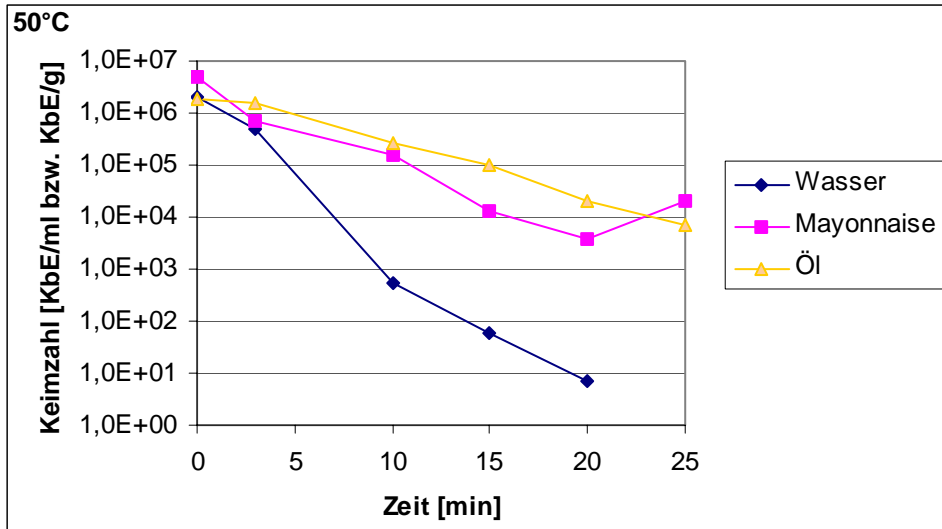


Abb. 4-8: Thermische Abtötung von *L. lactis* in entionisiertem Wasser, Mayonnaise und Sonnenblumenöl bei 50, 55 und 60°C (Keimzahlen für Mayonnaise in KbE/g, für wässrige Lösungen und Öl in KbE/ml)

4.5.3 Erhitzung von *L. innocua* in verschiedenen Ölen

Wie aus der Abbildung 4-9 zu entnehmen ist, kam es bei *L. innocua* erst bei Temperaturen um 70°C zu einer deutlichen Abnahme der Keimzahl in Sonnenblumenöl. Bei 80°C wurden innerhalb von 15 min die Bakterien um mehr als fünf Zehnerpotenzen abgetötet.

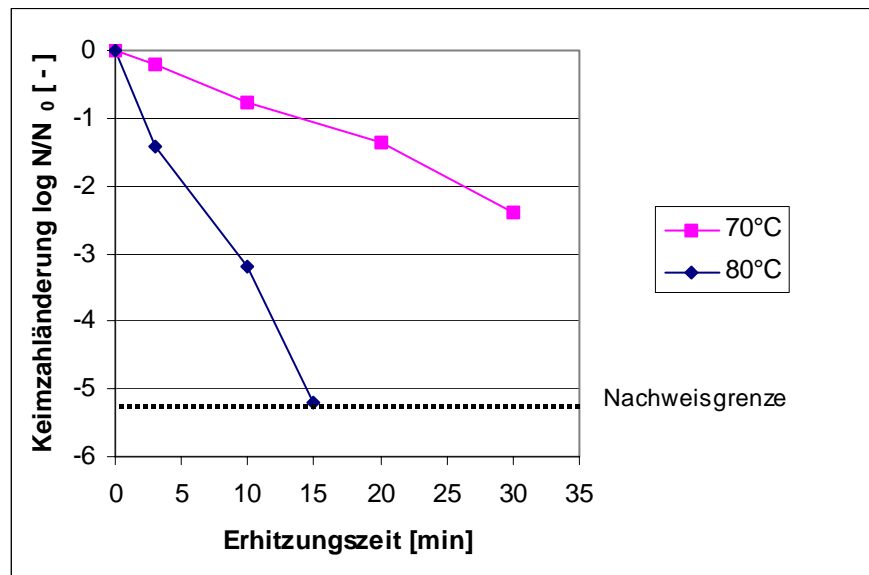


Abb. 4-9: Thermische Abtötung von *L. innocua* in Sonnenblumenöl bei 70 und 80°C (N/N₀ = Endkeimzahl/Ausgangskeimzahl)

Daher wurde in den nachfolgenden Versuchen der Einfluß der Ölart bei 70°C untersucht. Die Erhitzung erfolgte in Sonnenblumen-, Soja- und Olivenöl. Zum Teil traten bei den Wiederholungsversuchen erhebliche Abweichungen auf. Bei näherer Betrachtung der Versuchsdurchführung wurde ersichtlich, daß dies zum einen von der Lagerzeit der gefriergetrockneten Kulturen abhängig war, zum anderen auch von der Lagerung des Öls. Wurden die Versuche in frisch geöffnetem Öl durchgeführt, wurden die Bakterien besser abgetötet als in einem Öl, das bereits mehrere Wochen geöffnet aufbewahrt wurde (vgl. Abb. 4-10).

In beiden Versuchsreihen konnte in Sojaöl die stärkste Keimzahlreduzierung und in Olivenöl die geringste thermische Keiminaktivierung ermittelt werden.

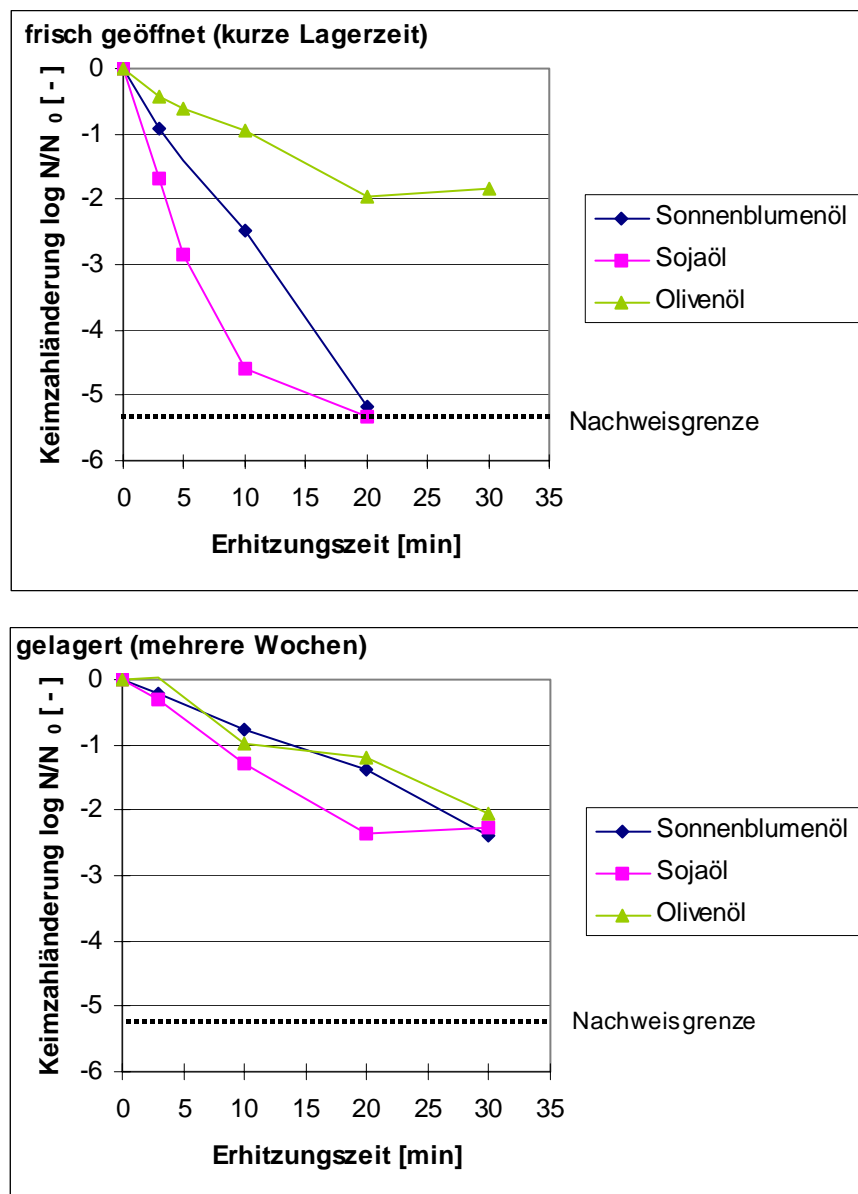


Abb. 4-10: Einfluß der Ölart und -eigenschaften (Lagerzeit) auf die thermische Abtötung von *L. innocua* bei 70°C (N/N_0 = Endkeimzahl/Ausgangskeimzahl)

4.5.4 Einsatz von Fettsäuren und Monolaurin als natürliche Konservierungsstoffe

Die konservierende Wirkung von Fettsäuren und Fettsäureestern wurde in Kapitel 2.3.3 (S. 16) erläutert. Mit nachfolgenden Versuchen sollte überprüft werden, ob Fettsäuren und deren Derivate als natürliche Konservierungsstoffe die Hitzeabtötung von Bakterien in Mayonnaise verstärken und damit als Alternative zu chemischen Konservierungsstoffen eingesetzt werden können. Da die Wirkung von Fettsäuren stark vom Medium abhängig ist, wurde in Vorversuchen zuerst die antimikrobielle Wirkung der Testsubstanzen in Nährbouillon bei 37°C und einer Einwirkzeit von 10 min (in Anlehnung an BERGSSON ET AL. [2001]) bestimmt. Anschließend wurde die Wirkung von Caprinsäure, Ölsäure und Monolaurin in Mayonnaise kombiniert mit einer Hitzebehandlung überprüft.

4.5.4.1 Wirkung von Fettsäuren und Monolaurin in Nährbouillon bei 37°C

Weil die Fettsäuren wasserunlöslich sind, wurde Ethanol als Lösungsmittel eingesetzt. Abbildung 4-11 gibt die Inaktivierungskurven der verschiedenen Testmikroorganismen durch den Zusatz von Caprinsäure, Ölsäure und Monolaurin in den Konzentrationen 0,04 %, 0,2 %, 0,7 % und 1,0 % wieder. Als Kontrolle wurde zum einen die angeimpfte Nährbouillon für 10 min bei 37°C stehen gelassen, zum anderen wurde die entsprechende Menge an Ethanol, die notwendig war, um die Fettsäuren und den Fettsäureester zu lösen (= Kontrolle + Ethanol) zugegeben.

Eine gute antimikrobielle Wirkung zeigte Caprinsäure. Bei allen Testmikroorganismen kam es bei einer Konzentration von 0,04 % zu einer Reduzierung der Koloniezahlen in unterschiedlich starker Ausprägung. Durch die Erhöhung der Konzentration auf 0,2 % kam es bei *L. innocua* zu einem Rückgang um mehr als sechs Zehnerpotenzen und *Lc. lactis* konnte überhaupt nicht mehr nachgewiesen werden. Die gram-positiven Bakterien erwiesen sich somit empfindlicher als die *E. coli*-Zellen, *Asp. niger*-Konidien und *P. anomala*-Zellen.

Ölsäure zeigte in den eingesetzten Konzentrationen nur bei *Lc. lactis* eine keimabtötende Wirkung. Bei einer Konzentration von 0,7 % kam es zu einer Abtötung um sechs Zehnerpotenzen innerhalb von 10 min.

Die Wirkung von Monolaurin wurde nur bei den gram-positiven Bakterien *L. innocua* und *Lc. lactis* überprüft. Durch Monolaurin starben diese Bakterien noch stärker ab als durch Caprinsäure. Daher besaß der Fettsäureester bei den gram-positiven Bakterien die größte antibakterielle Wirkung.

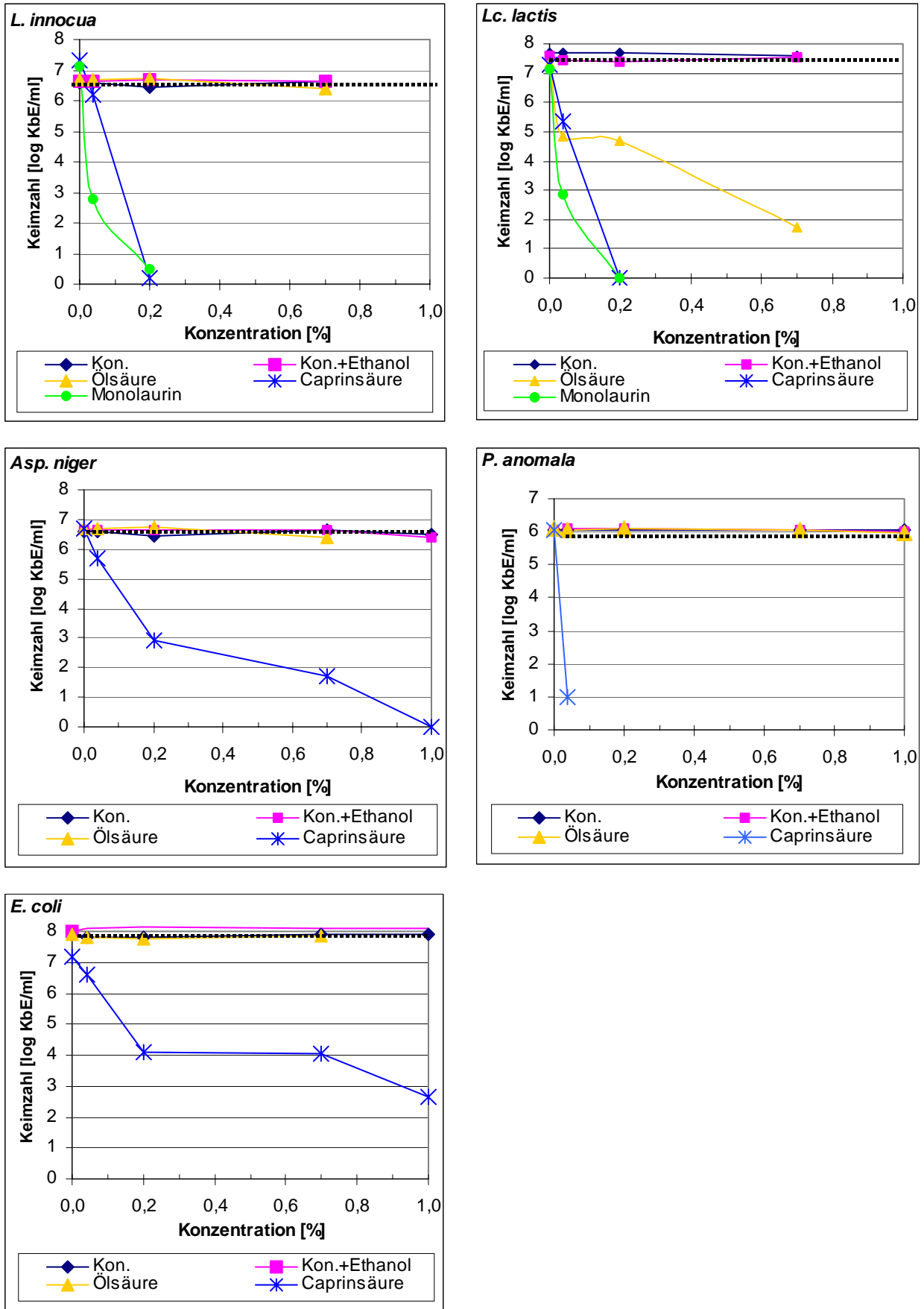


Abb. 4-11: Wirkung von Fettsäuren, zusätzlich für *L. innocua* und *Lc. lactis* die Wirkung von Monolaurin, gelöst in Ethanol auf verschiedene Mikroorganismen in CaSo-Bouillon bei 37°C nach 10 min (Kon. = Kontrolle: Bouillon ohne Fettsäure oder Fettsäurederivat)

4.5.4.2 Wirkung von Fettsäuren und Monolaurin bei der Pasteurisation von Mayonnaise auf *L. innocua*, *Lc. lactis* und *E. coli*

Für *L. innocua*, *Lc. lactis* und *E. coli* wurde die Wirkung von Ölsäure und Caprinsäure bei der thermischen Behandlung von Mayonnaise untersucht (Abb. 4-12, 4-13 und 4-14).

Durch Zugabe von 0,7 % Ölsäure konnte in den Erhitzungsversuchen mit *L. innocua*, *Lc. lactis* und *E. coli* keine Verbesserung der Hitzeabtötung erzielt werden. Es hatte sogar den Anschein, daß die Ölsäure einen schützenden Effekt ausübte, da die Inaktivierungskurve von Ölsäure flacher verläuft als Kontrollkurve ohne Fettsäurezugabe.

Durch Zugabe von 0,7 % Caprinsäure zu Mayonnaise konnte bei *L. innocua* die Abtötung nicht gesteigert werden, da beide Inaktivierungskurven (ohne Fettsäure bzw. mit Caprinsäure 0,7 %) einen annähernd gleichen Verlauf zeigen, der lediglich aufgrund geringer Animpfdichte parallel verschoben erscheint. Bei *E. coli* zeigte die Caprinsäure ebenfalls keine Wirkung, jedoch wurde für *Lc. lactis* eine verbesserte Keimabtötung um durchschnittlich eine Zehnerpotenz durch das Erhitzen erreicht. Für *L. innocua* und *Lc. lactis* wurde die Wirkung der Caprinsäure auch bei einer Konzentration von 2 % getestet. Bei dieser Konzentration kam es für *L. innocua* zu einer gesteigerten Abtötung, bei *Lc. lactis* konnte durch die höhere Konzentration die Wirkung der Caprinsäure nicht verbessert werden.

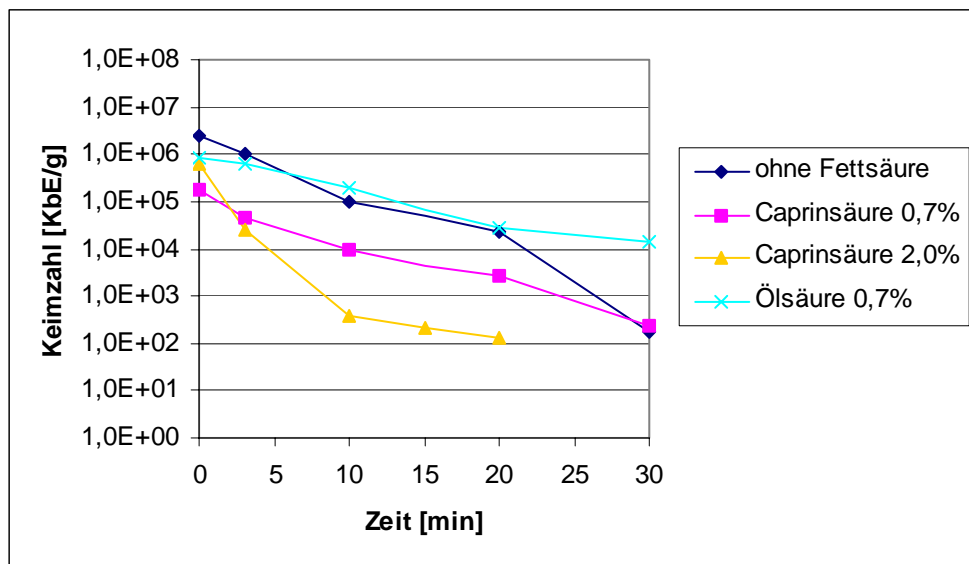


Abb. 4-12: Wirkung von Fettsäuren bei der thermischen Abtötung von *L. innocua* in Mayonnaise bei 55°C

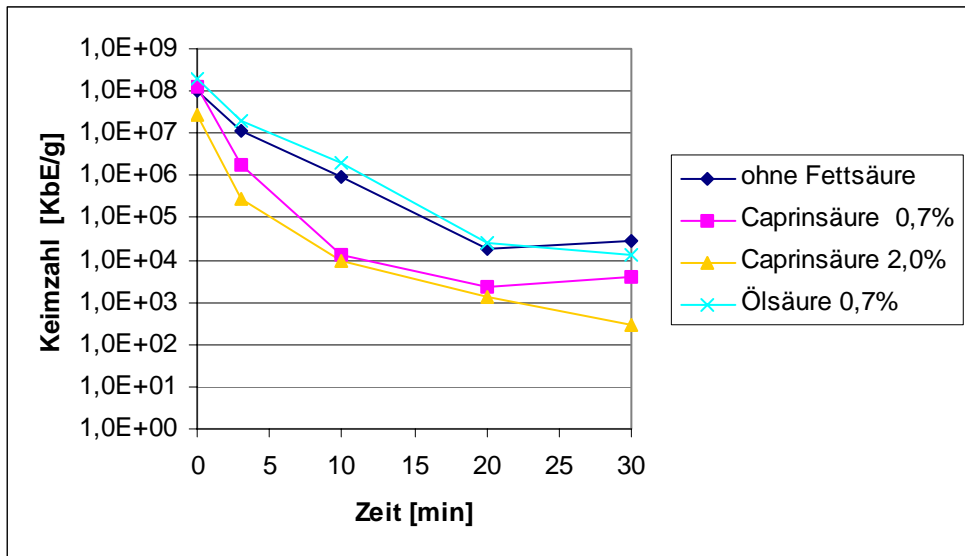


Abb. 4-13: Wirkung von Fettsäuren bei der thermischen Abtötung von *Lc. lactis* in Mayonnaise bei 50°C

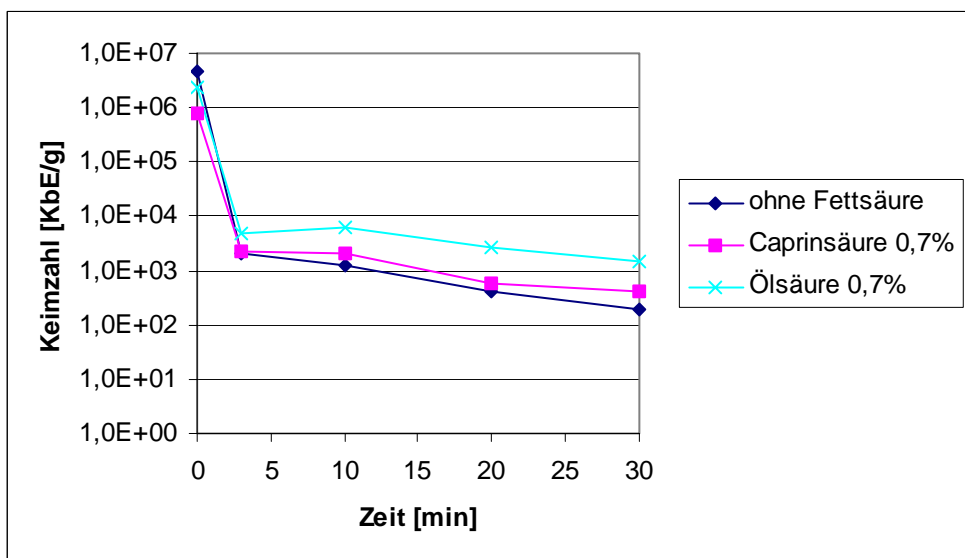


Abb. 4-14: Wirkung von Fettsäuren bei der thermischen Abtötung von *E. coli* in Mayonnaise bei 50°C

Für *L. innocua* wurde zusätzlich noch der Einfluß von Monolaurin bei der Pasteurisation von Mayonnaise untersucht. Da Monolaurin bei Raumtemperatur in fester Form vorliegt, mußte dieser Fettsäureester in Ethanol gelöst werden, um ihn besser in der Mayonnaise verteilen zu können. Die dadurch erzielte gesteigerte Abtötung der *L. innocua*-Zellen ist offensichtlich nicht auf das Monolaurin selbst, sondern auf den Ethanolgehalt zurückzuführen, wie aus Abbildung 4-15 ersichtlich wird (vgl. Kontrolle + Ethanol).

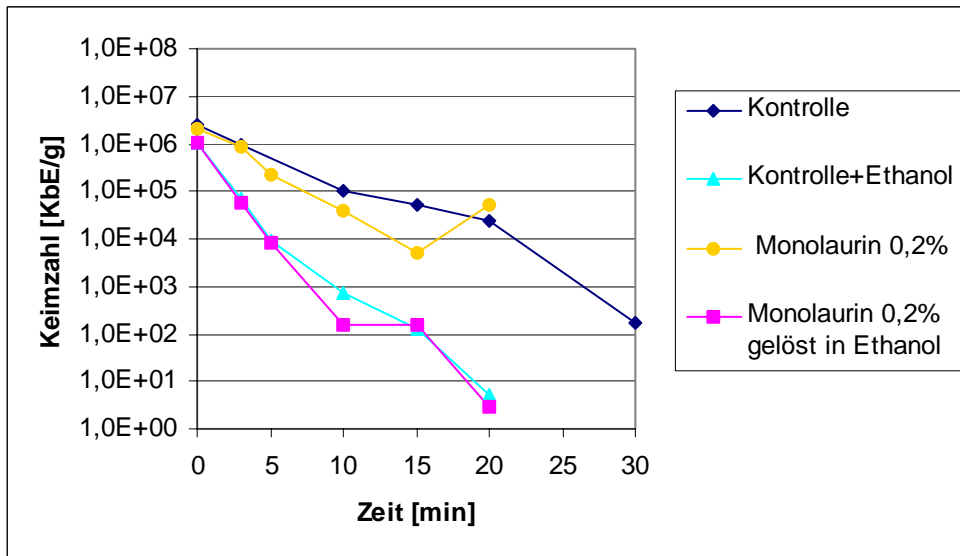


Abb. 4-15: Wirkung von Monolaurin bei der thermischen Abtötung von *L. innocua* in Mayonnaise bei 55°C

4.6 Hochdruckbehandlung

4.6.1 Auswirkungen des Umgebungsmediums (entionisiertes Wasser, Mayonnaise und Sonnenblumenöl) auf die Abtötung der Testmikroorganismen

Es wurden die Abtötungskinetiken von *L. innocua* und *Lc. lactis* bei unterschiedlichen Prozeßbedingungen bezüglich der Druckhöhe und Druckhaltezeit bestimmt. Dabei wurden die Parameter (z. B. Druckrampe aufwärts oder abwärts) so gewählt, daß sich die Temperaturen während der Druckbehandlung zwischen 5 und 40°C befanden, um temperaturbedingte Abtötungseffekte möglichst zu vermeiden.

Sowohl bei *L. innocua* als auch bei *Lc. lactis* kam es allein durch den Druckaufbau zu letalen Schädigungen der in Mayonnaise und Phosphatpuffer verteilten Bakterien.

4.6.1.1 *L. innocua*

In Phosphatpuffer kam es zu einer deutlichen Abnahme der Keimzahlen (Abb. 4.16 oben). So waren nach 15 min bei einem Druck von 400 MPa und einer Animpfdichte von ca. 10^6 KbE/ml keine Listerien mehr nachweisbar.

Bei den Versuchen mit Mayonnaise wurden bei allen drei Drücken (350, 400 und 500 MPa) die Keimzahlen innerhalb von 15 min reduziert (Abb. 4.16 Mitte). Die Abtötungskinetiken bei 350 und 400 MPa verliefen annähernd identisch, innerhalb von 15 min kam es zu einer gleichmäßigen Abnahme der Keimzahlen. Bei 500 MPa fiel die Keimzahl in den ersten 5 min stark ab und verblieb auf diesem Niveau. Die Keimzahlreduktion nach 15 min bei 500 MPa war im Vergleich zu 350 MPa nur geringfügig höher.

In Sonnenblumenöl konnte nur bei einem Druck von 500 MPa eine leichte Reduktion der Keimzahlen innerhalb von 15 min beobachtet werden (Abb. 4.16 unten).

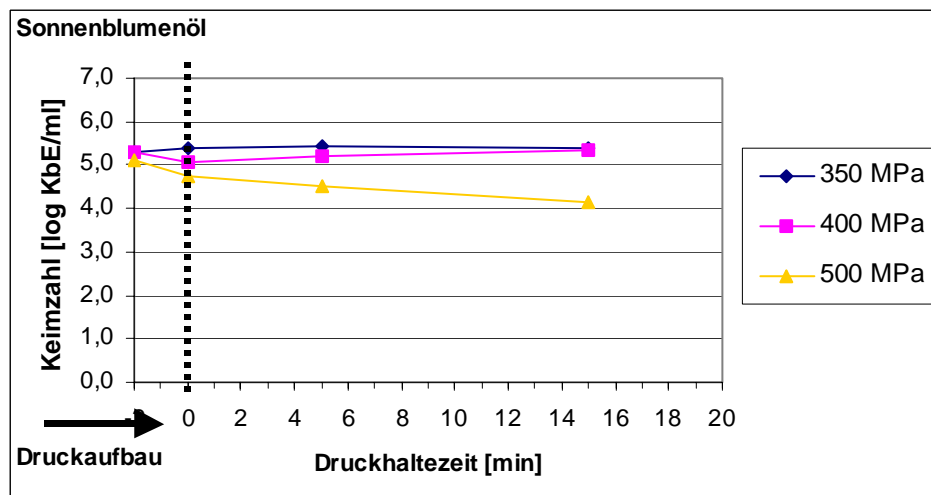
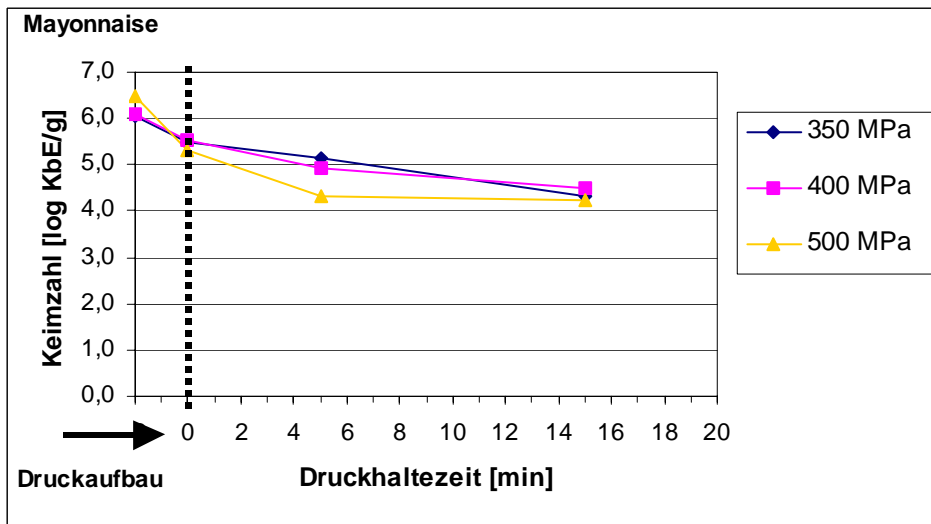
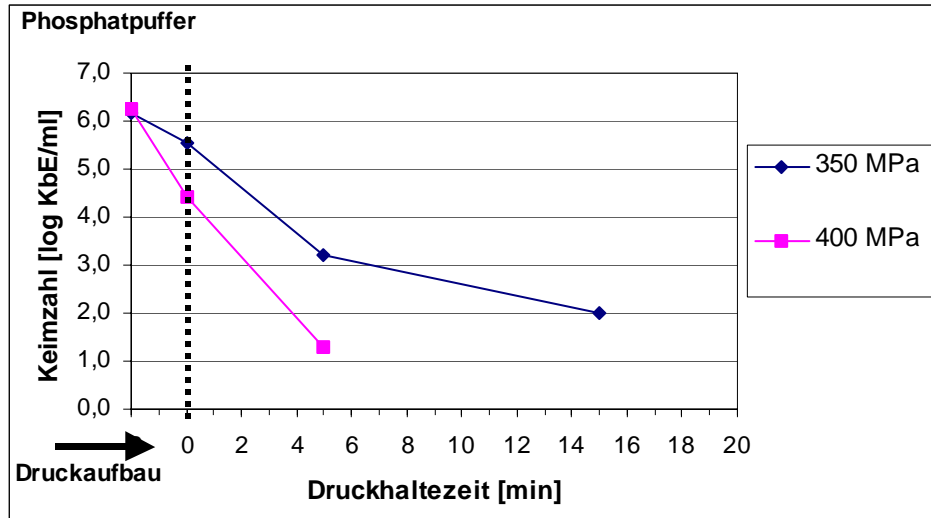


Abb. 4-16: Abtötung von *L. innocua* durch Hochdruck in verschiedenen Medien, bei unterschiedlichen Drücken

Durch die Zugabe von 0,2 % des chemischen Konservierungsstoffes Natriumbenzoat konnte die Abtötung von *L. innocua* nicht verbessert werden. Die Abtötungskurve in Mayonnaise mit Natriumbenzoat lag sogar leicht über der Abtötungskurve ohne Benzoat. Da der Unterschied geringer als eine halbe Zehnerpotenz war, wurde dies wahrscheinlich durch methodisch bedingte Schwankungen hervorgerufen.

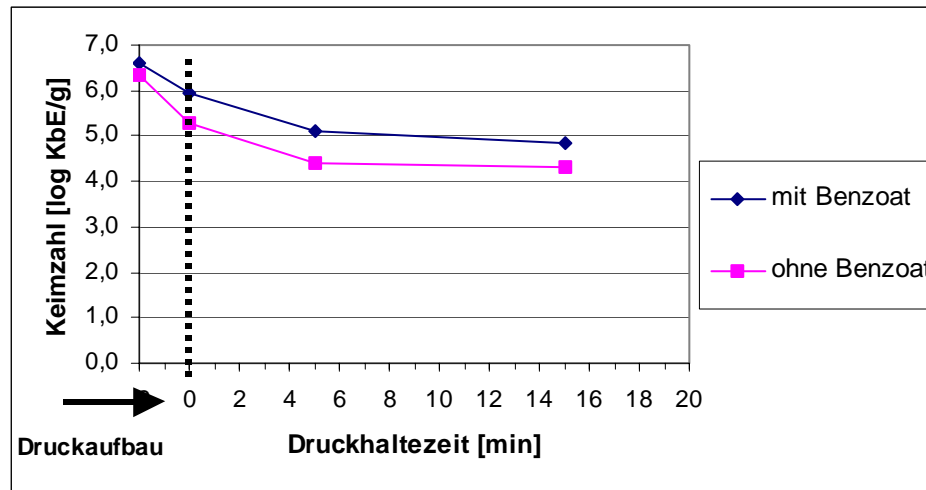


Abb. 4-17: Abtötung von *L. innocua* durch eine Hochdruckbehandlung bei 500 MPa in Mayonnaise mit und ohne 0,2 % Natriumbenzoat

Es wurde auch untersucht, ob durch eine Druckbehandlung bei 500 MPa ohne Druckhaltezeit die *L. innocua*-Zellen subletal geschädigt werden, so daß sie innerhalb von 24 h Stunden verstärkt in Mayonnaise absterben. Die Keimzahl ging innerhalb von 24 h nur um eine halbe Zehnerpotenz zurück. Es wurde somit kein verstärktes Absterben von *L. innocua*-Zellen festgestellt.

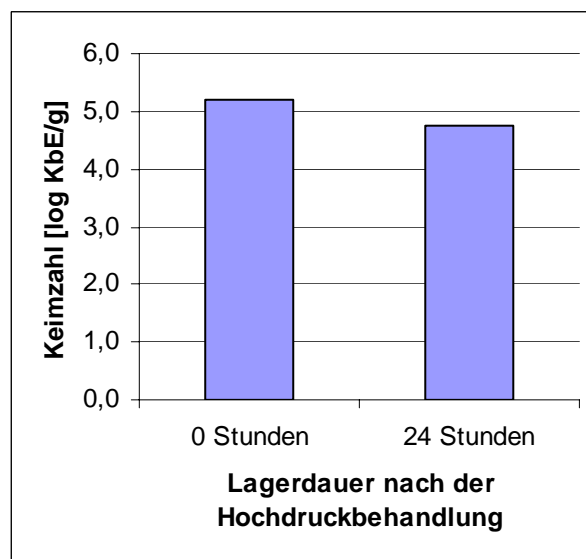


Abb. 4-18: Keimzahlveränderung von *L. innocua* nach einer Hochdruckbehandlung bei 500 MPa ohne Haltezeit nach einer Lagerung bei 7°C für 24 h

4.6.1.2 *Lc. lactis*

In Phosphatpuffer wurden die *Lc. lactis*-Zellen bei einem Druck von 350 MPa innerhalb von 5 min um mehr als sechs Zehnerpotenzen abgetötet, da nach dieser Zeit keine Bakterien mehr nachweisbar waren (Abb. 4-19 oben). Der Abtötungseffekt war somit stärker als bei *L. innocua*.

Auch in Mayonnaise kam es zu einer deutlich stärkeren Abtötung von *Lc. lactis* verglichen mit *L. innocua*. Nach 5 min bei 500 MPa waren in der Mayonnaise bei einer Animpfdichte 10^6 KbE/ml keine Laktokokken mehr nachweisbar (Abb. 4-19 Mitte). Bei einem Druck von 400 MPa kam es zu einem Absterben um vier Zehnerpotenzen innerhalb von 15 min.

In Sonnenblumenöl wies *Lc. lactis* (wie *L. innocua*) nur eine sehr geringe Keimzahlreduktion innerhalb von 15 min bei 500 MPa auf (Abb. 4-19 unten). Auch hier schützt das Öl die Testmikroorganismen vor der Hochdruckinaktivierung.

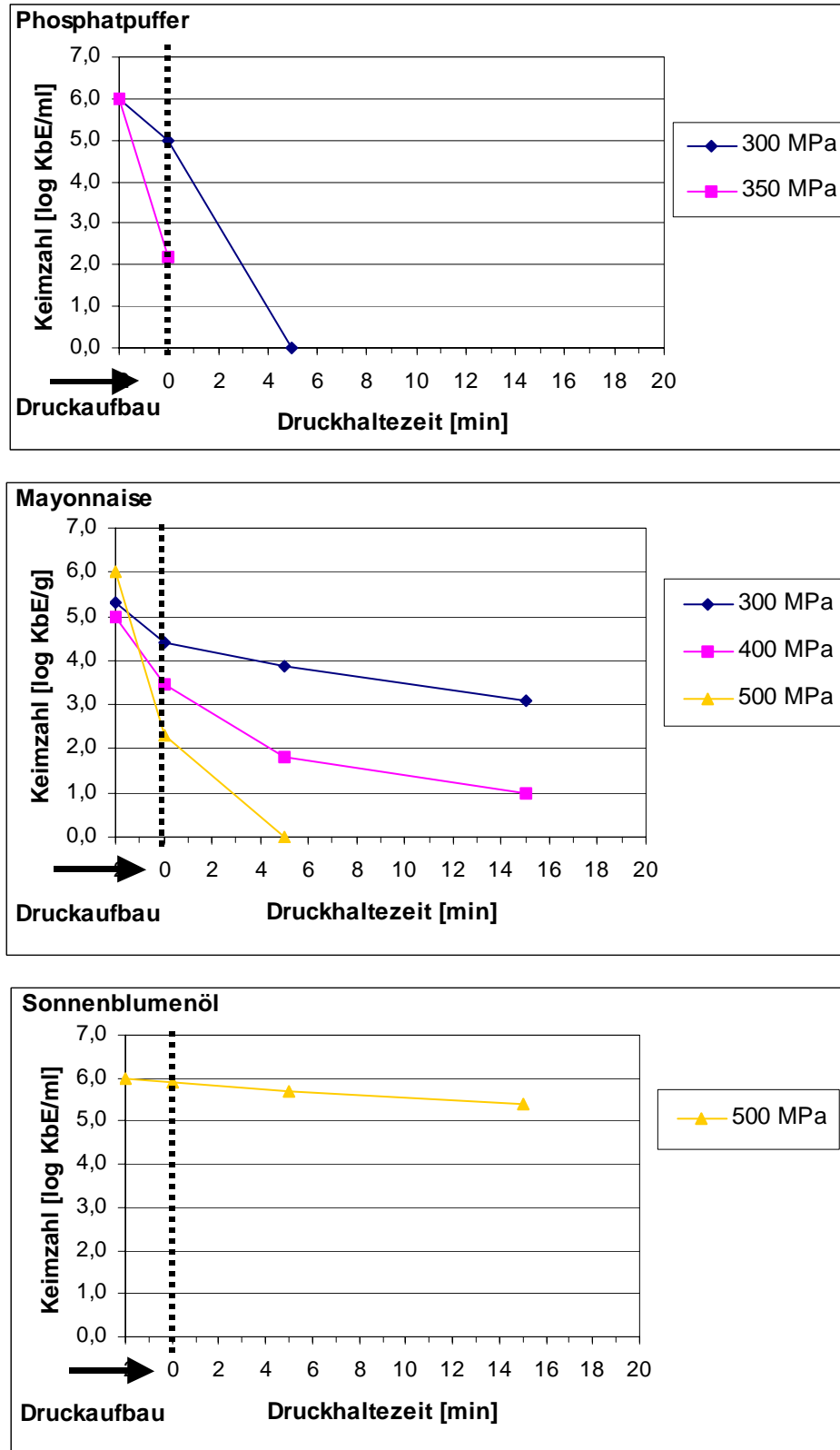


Abb. 4-19: Abtötung von *Lc. lactis* durch Hochdruck in verschiedenen Medien, bei unterschiedlichen Drücken

4.6.2 Abtötung von *L. innocua*, *Lc. lactis*, *P. anomala* und *Asp. niger* in Sonnenblumenöl durch Hochdruckbehandlung bei 600 und 800 MPa ohne Druckhaltezeit

Bei den Hochdruckversuchen in Phosphatpuffer und Mayonnaise kam es bereits durch den Druckaufbau und -abbau zu einer Abtötung der Mikroorganismen. In nachfolgenden Versuchen wurde untersucht, ob eine Keimzahlreduktion in Sonnenblumenöl allein durch den Druckaufbau und -abbau bei Erhöhung des Drucks auf 600 und 800 MPa erzielt werden kann. Die Abbildung 4-20 zeigt, daß dies für *L. innocua*, *P. anomala* und *Asp. niger*-Konidien nicht möglich war. Bei *Lc. lactis* sank die Keimzahl sowohl bei 600 MPa als auch bei 800 MPa geringfügig. Daher ist wahrscheinlich für *Lc. lactis* eine deutliche Keimzahlreduktion bei längerer Druckhaltezeit in Sonnenblumenöl ab 600 MPa möglich.

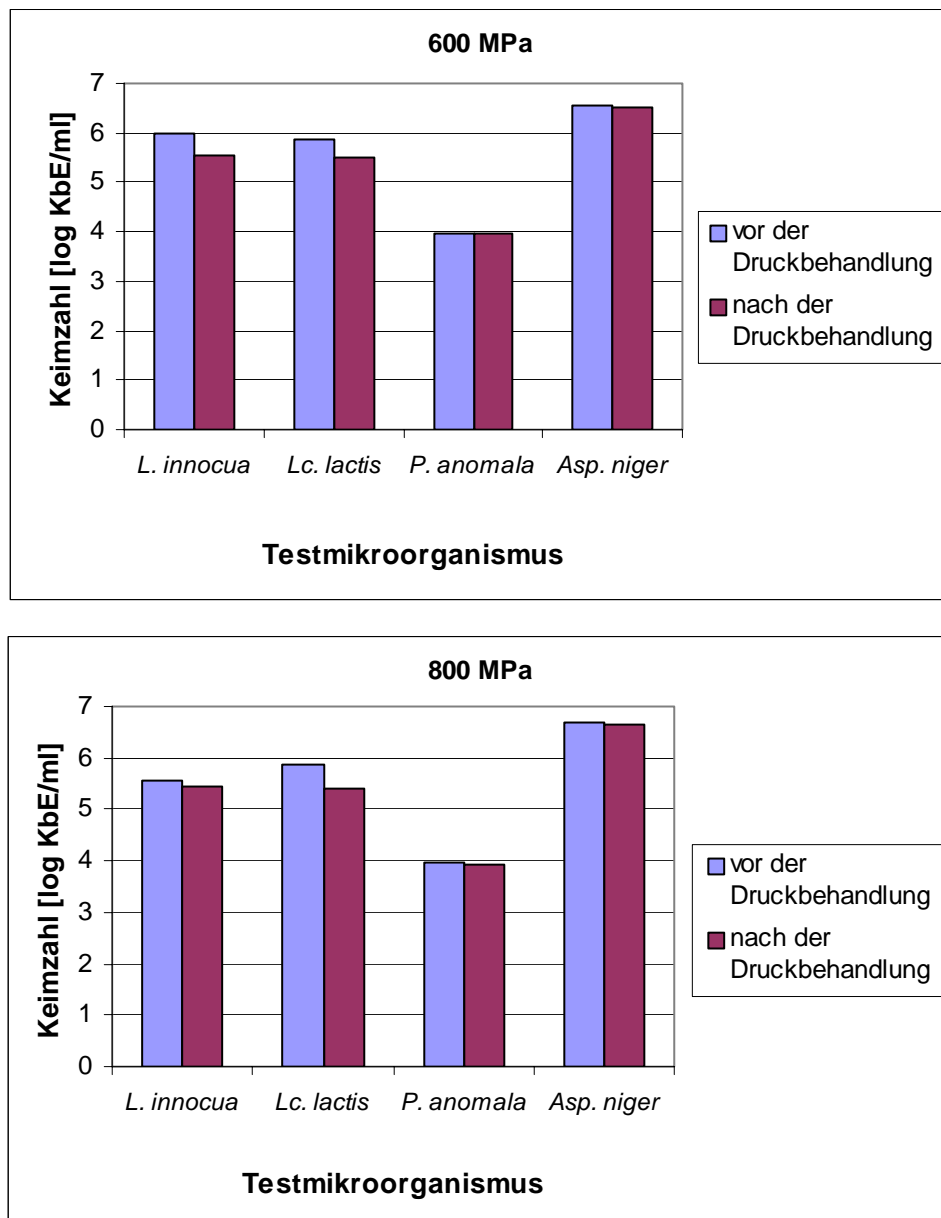


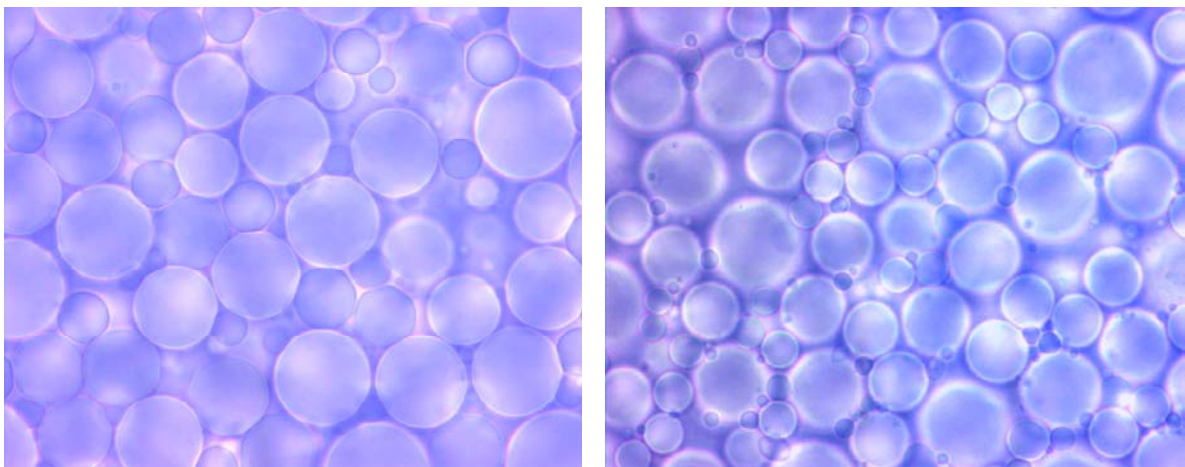
Abb. 4-20: Abtötung der Testmikroorganismen durch Hochdruck bei 600 und 800 MPa in Sonnenblumenöl ohne Druckhaltezeit

4.6.3 Strukturelle Veränderungen in der Mayonnaise nach einer Hitze- bzw. einer Hochdruckbehandlung

4.6.3.1 Mikroskopische Betrachtung

Aus den Abbildungen 4-21 und 4-22 wird ersichtlich, daß es sowohl durch die thermische Behandlung als auch durch die Hochdruckbehandlung zu einem Zusammenlagern der Fetttröpfchen und zur Aggregatbildung kam. Es sind größere Fetttröpfchen durch Koaleszenz entstanden.

Mayonnaise vor der Erhitzung



Mayonnaise nach der Erhitzung

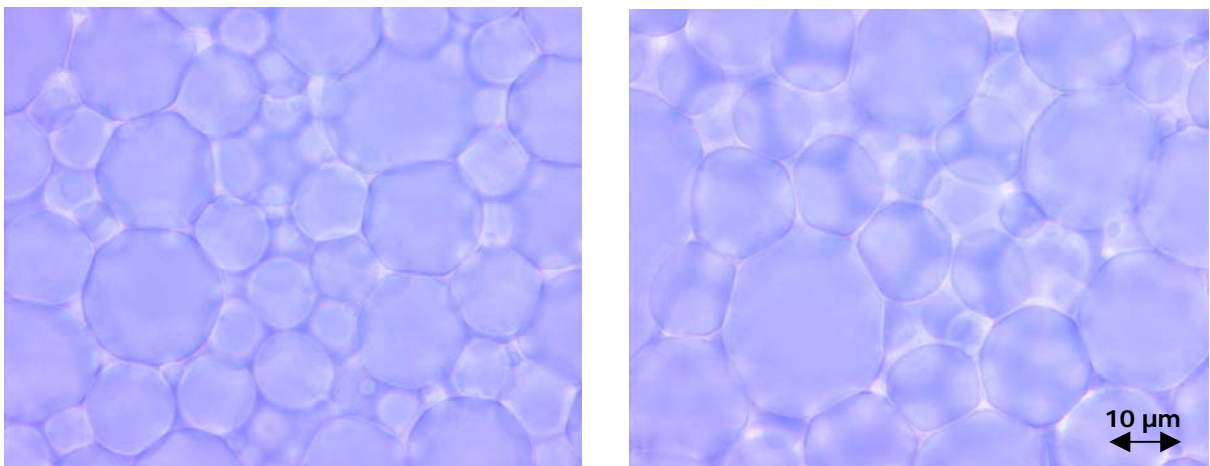
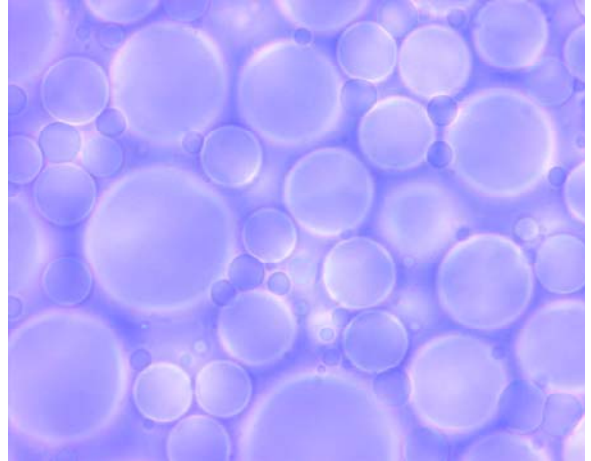
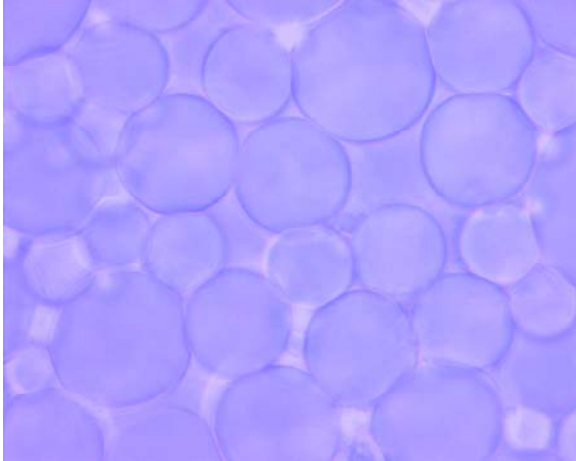


Abb. 4-21: Mikroskopische Aufnahmen der Mayonnaise vor und nach einer **Hitzebehandlung** bei 60°C für 30 min in 1000-facher Vergrößerung

Mayonnaise vor der Hochdruckbehandlung



Mayonnaise nach der Hochdruckbehandlung

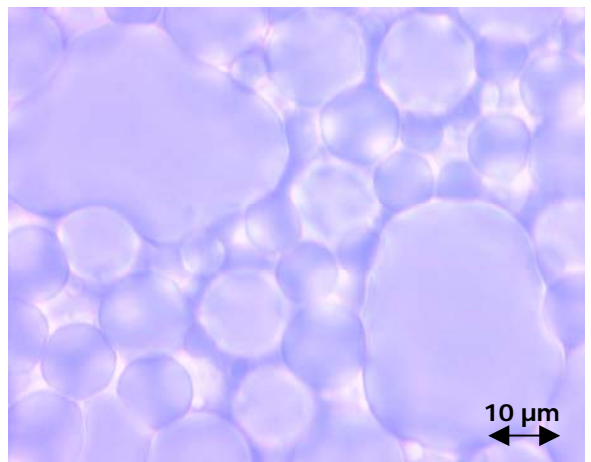
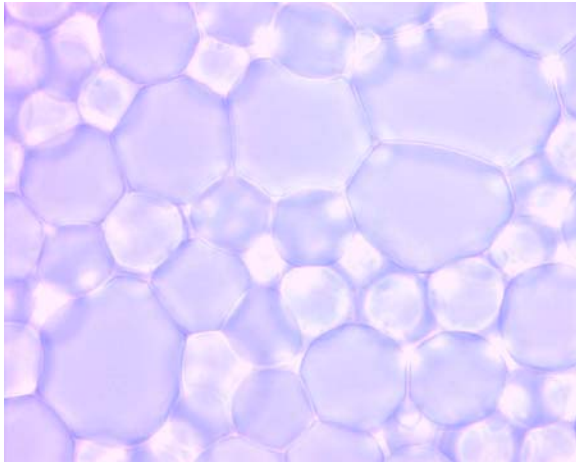


Abb. 4-22: Mikroskopische Aufnahmen der Mayonnaise vor und nach einer **Hochdruckbehandlung** bei 500 MPa für 15 min in 1000-facher Vergrößerung

4.6.3.2 *Meßung der rheologischen Eigenschaften*

Da auf den mikroskopischen Aufnahmen der Mayonnaise Unterschiede in der Größe und Anordnung der Fetttropfchen festgestellt wurden, wurde die dynamische Viskosität in Abhängigkeit der Scherrate von den unterschiedlich behandelten Mayonnaisen (unbehandelt, erhitzt bei 60°C für 30 min, hochdruckbehandelt bei 500 MPa für 15 min) mit einem Torsionsrheometer bestimmt (Abb. 4-23).

Sowohl bei der hochdruckbehandelten als auch bei der erhitzten Mayonnaise konnten meßbare Unterschiede im Vergleich mit der unbehandelten Mayonnaise festgestellt werden. Beide Behandlungsverfahren führten zu einer Erhöhung der Viskosität. Durch eine Hochdruckbehandlung bei 500 MPa für 15 min wurde diese stärker erhöht als durch eine Hitzebehandlung bei 60°C für 30 min.

Unabhängig von der Behandlung zeigen die Kurven das strukturviskose Verhalten der Mayonnaise und sie nähern sich bei steigender Scherrate an.

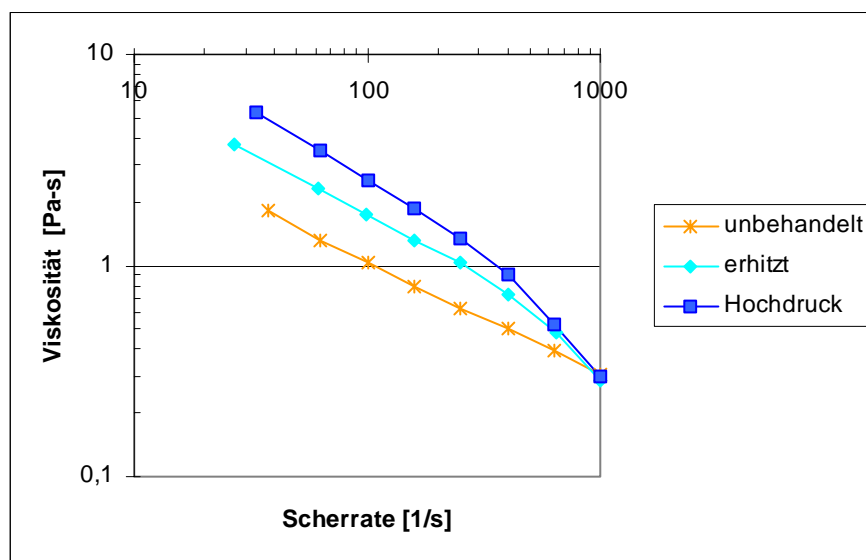


Abb. 4-23: Viskosität von unterschiedlich behandelter Mayonnaise: unbehandelt, erhitzt bei 60°C für 30 min und hochdruckbehandelt bei 500 MPa für 15 min

5 DISKUSSION

5.1 Charakterisierung der Zellhydrophobizität

Ein Einflußfaktor bei der Verteilung von Mikroorganismen in Emulsionen ist die Oberflächenbeschaffenheit der Zelle. Der unterschiedliche Aufbau der äußeren Schicht und die verschiedenen extrazellulären Strukturen der Zelloberfläche bestimmen die Hydrophobizität von Mikroorganismen. Die Hydrophobizität kann nicht direkt gemessen werden. Daher hängt der ermittelte Wert stark von der verwendeten Methodik ab. Bei der Literaturrecherche [NEUFELD ET AL., 1980; DOYLE UND ROSENBERG, 1995; van LOOSDRECHT ET AL., 1987a] hat sich gezeigt, daß zur indirekten Bestimmung der Hydrophobizität häufig die Kontaktwinkelmessung und die Verteilung von Mikroorganismen in zwei nicht-mischbare Phasen, meist in einem Wasser-Kohlenwasserstoff-Gemisch (= MATH-Test), herangezogen wird. Der MATH-Test wird vor allem deswegen angewandt, weil er ohne großen apparativen Aufwand durchgeführt werden kann.

Neben der verwendeten Methode spielen auch das Anzuchtmedium, die Inkubationsparameter und die Wachstumsphase bzw. das Zellalter eine Rolle [NEUFELD ET AL., 1980; HAZEN ET AL., 1986; VAN LOOSDRECHT ET AL., 1987b; KOHLWEYER, 2000; HENRIQUES ET AL., 2002]. Eine hohe Wachstumsrate durch optimale Anzuchtbedingungen erhöht die Hydrophobizität der Zellen. Die Hydrophobizität nimmt auch mit fortschreitendem Zellalter zu, da es zu Änderungen an der Zelloberfläche aufgrund der unterschiedlichen Stoffwechselaktivität kommt [VAN LOOSDRECHT ET AL., 1990]. Die Ernte und Zellbehandlung beeinflussen die Zellhydrophobizität ebenfalls. Zum einen kann es zu Ladungsverschiebungen an der Oberfläche der Zelle aufgrund des pH-Werts des Waschmediums kommen, zum anderen können durch einwirkende Kräfte, z. B. Scherkräfte beim Zentrifugieren, anhängende Oberflächenbestandteile der Zelle abgetrennt werden [MOZES ET AL., 1991].

Kontaktwinkelmessung

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Versuchsaufbau zur Kontaktwinkelmessung konnten nur bedingt Ergebnisse erzielt werden, weil bei den Bakterien und Hefen der Wassertropfen nach dem Aufsetzen sofort in den Mikroorganismenrasen eingezogen wurde. Es konnten nur für die Konidien der Schimmelpilze *Asp. niger* und *Pen. glabrum* und für Sporen von *B. subtilis* Randwinkel bestimmt werden. Eine Schwierigkeit bei der Kontaktwinkelmessung ist daher die Herstellung eines geschlossenen Bakterienrasens, auf dem ein Wassertropfen für die Zeit der Messung stabil bleibt. Einen Einfluß üben hierbei zum einen die Trocknungsbedingungen, zum anderen die Meßapparatur aus. Für die Versuche wurde ein Kontaktwinkelmeßgerät verwendet, das keine sofortige Bestimmung des Randwinkels nach dem Aufsetzen des Wassertropfens auf

den Bakterienrasen erlaubt. Eine Bestimmung in Echtzeit war also nicht durchführbar. Mögliche Ursachen für ein zu schnelles Aufsaugen des Wassertropfens sind nach MOZES ET AL. [1991] ein zu dünner Bakterienrasen oder eine ungenügende Trocknung der Zellen. Über Variationen bei der Herstellung des Bakterienrasens wurde versucht, die Stabilität des Wassertropfens zu erhöhen. Die Trocknungszeiten lagen zwischen drei Stunden und mehreren Tagen. In der Literatur werden Trocknungszeiten zwischen einer halben und vier Stunden [VAN LOOSDRECHT ET AL., 1987a; MOZES UND ROUXHET, 1987] oder länger (über Nacht [KOHLWEYER, 2000]) angegeben. Die Trocknung erfolgte bei normaler Luftfeuchte bei Raumtemperatur, bei normaler Luftfeuchte im Brutschrank bei 30°C oder in einem Exsikkator mit Trocknungskieselgel bei Raumtemperatur. Die Stabilität des Wassertropfens konnte durch die unterschiedlichen Trocknungsmethoden jedoch nicht erhöht werden.

Eine zu starke Dehydratisierung der Zellen führt zu erheblichen Änderungen der Oberflächeneigenschaften und ermöglicht so keine zuverlässigen Rückschlüsse auf das Verhalten der Mikroorganismen im nativen Zustand. Dies stellt einen erheblichen Nachteil dieser Methode dar [MOZES UND ROUXHET, 1987; VAN LOOSDRECHT ET AL., 1990]. Daher werden zum Teil Agarplatten mit lebenden Zellen als Trägermedium eingesetzt. Nach VAN LOOSDRECHT ET AL. [1987a] ist es aber problematisch, auf einem solchen Untergrund brauchbare Ergebnisse zu erzielen. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurden Nitrosecellulose-Filter, wie bei DICKSON UND KOOHMARAIE [1989], verwendet. Es finden auch Cellulosetriacetat-Filter Anwendung [MOZES UND ROUXHET, 1987; FIEDLER UND SATTLER, 1992].

MOZES UND ROUXHET [1987] teilten je nach Kontaktwinkel die Mikroorganismen in drei Gruppen ein: hydrophob bei Kontaktwinkeln größer 90°, mäßig hydrophob bei Winkeln zwischen 50° und 60° und hydrophil bei Winkeln kleiner 40°. Die Kulturen wurden, wie in dieser Arbeit, in entmineralisiertem Wasser gewaschen, und der Randwinkel von einem bidestillierten Wassertropfen bestimmt. Nach diesem Einteilungsschema sind die Konidien von *Asp. niger* (56 – 65°) als mäßig hydrophob einzustufen, die Konidien von *Pen. glabrum* (24 – 29°) und die Sporen von *B. subtilis* (21 – 31°) als hydrophil.

In der Literatur findet man zahlreiche Kontaktwinkelbestimmungen für die unterschiedlichsten Mikroorganismen. Eine gute Zusammenfassung über gemessene Winkel liefert VAN DER MEI ET AL. [1998]. Für *B. subtilis* wurden folgende Werte bestimmt: bei DICKSON UND KOOHMARAIE [1989] für vegetative Zellen 29° (Wassertropfen: Phosphatpuffer) und bei AHIMOU ET AL. [2001] für vegetative Zellen Werte zwischen 27 – 49° und für Sporensuspensionen zwischen 42 – 59° in Abhängigkeit des Stammes. Für den Schimmelpilz *Moniliella pollinis* wurde von MOZES UND ROUXHET [1987] ein Randwinkel > 90° ermittelt (Wassertropfen: bidestilliertes Wasser).

MATH-Test

Der von ROSENBERG ET AL. [1980] entwickelte BATH-Test (vgl. Kap. 2.1.3.2) wird auch als MATH-Test bezeichnet und ist von zahlreichen Autoren weiterentwickelt und abgewandelt worden. In der vorliegenden Arbeit lag der Hexadekananteil bei 20 %, die Durchmischungszeit betrug 15 sec, die Entmischungszeit 15 min und die photometrischen Messungen wurden bei 600 nm durchgeführt. Des Weiteren wurde die Wasserphase nach der Trennung im Reagenzglas nicht mit der Pipette in die Küvette überführt, sondern die Mischung wurde sofort nach dem Suspendieren in die Küvette gefüllt. Das Hexadekan setzte sich im oberen Drittel der Küvette ab, so daß die Messung am Photometer nicht beeinträchtigt wurde. Die Ergebnisse waren auf diese Weise besser reproduzierbar. Es zeigte sich auch, daß entionisiertes Wasser als Suspensionsmedium ungeeignet war, weil kaum Unterschiede in der Hydrophobizität zwischen den Keimen erkennbar waren. Durch den Einsatz von physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %ige NaCl-Lösung) mit pH 4 konnten deutlichere Unterschiede erzielt werden. Der pH-Wert und die Salzkonzentration orientierten sich an den Werten, die in der Mayonnaise vorliegen. Der Einfluß des pH-Wertes und der Ionenkonzentration des Wasch- und Suspendiermediums wurde von PEMBERY ET AL. [1999], BUNT ET AL. [1993] und VAN DER MEI ET AL. [1995] untersucht. Die Autoren bestätigten die Ergebnisse von NESBITT ET AL. [1982], daß bei niedrigem pH-Wert der Übergang in die Kohlenwasserstoffphase am größten ist. Auch durch die Erhöhung der molaren Ionenkonzentration konnte der Übergang in die hydrophobe Phase gesteigert werden, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde. Bei Verwendung der Salzlösung ergab sich folgende Reihenfolge für die Hydrophobizität (begonnen mit dem hydrophilsten Keim): *P. anomala*, *E. coli*, *B. subtilis*, *A. acidoterrestris*, *Lc. lactis* und *L. innocua*, d. h. *L. innocua* hatte das größte Bestreben in die Hexadekanphase überzugehen und war von den getesteten Keimen am hydrophobsten.

LEE UND YII [1996] teilten *Vibrio*-Bakterien, in Anlehnung an SANTOS ET AL. [1990], in drei Kategorien ein, je nach dem Anteil der Bakterien, der in die Kohlenwasserstoffphase überging: als stark hydrophob, bei einem Übergang von mehr als 50 %, als mäßig hydrophob bei einem Übergang zwischen 20 und 50 % und als nicht hydrophob bei einem Übergang kleiner als 20 %. Bei dieser Untersuchung wurde abhängig vom verwendeten Kohlenwasserstoff (n-Hexadekan oder n-Oktan) dieselben Bakterienstämme zum einen als stark hydrophob, zum anderen als nicht hydrophob eingestuft. Nach diesem Einteilungsschema wären alle in dieser Arbeit getesteten Keime nicht hydrophob, da nur geringe Unterschiede zwischen den Testkeimen meßbar waren. Auch von anderen Autoren wurde nur ein geringer Übergang ins Hexadekan (bei abweichendem Versuchsaufbau) bestimmt. ROSENBERG ET AL. [1980] konnten bei zwei von drei getesteten *E. coli*-Stämmen keinen signifikanten Übergang in die Hexadekanphase beobachten. Bei dem dritten Stamm, einer Mutante, die bestimmte Oligosaccharide auf der äußeren Membran verloren hatte, wurde ein deutlicher Übergang in die hydrophobe Phase bestimmt.

DICKSEN UND KOOHMARAIE [1989] ermittelten für Phosphatpuffer/Hexadekan folgende Werte (OD_{Wasser} = optische Dichte der Wasserphase nach dem Trennen/optische Dichte der Kontrolle): für *E. coli* $OD_{\text{Wasser}} = 0,995$, für *B. subtilis* $OD_{\text{Wasser}} = 1,086$ und für *L. monocytogenes* $OD_{\text{Wasser}} = 0,995$. Die Autoren vermuteten, daß es durch Lyse von Zellen zu Werten > 1 kommt. Bei dem MATH-Test handelt es sich nach VAN LOOSDRECHT ET AL. [1987a] um ein sehr sensibles Meßsystem, das stark durch die Anzahl und Größe der Hexadekantropfen beeinflusst wird. Die Tropfeneigenschaften sind von den Mischbedingungen wie Mischzeit, Entmischungszeit, Temperatur der Lösung und Mischapparatur abhängig. Ein weiteres Problem ist die unvollständige Entmischung. Es können kleine Hexadekantropfen, die durch Bakterien stabilisiert werden, in der Wasserphase verbleiben. Auch ist die Ansammlung von Bakterien in der Phasengrenzfläche möglich, wodurch das Meßergebnis ebenfalls nachteilig beeinflusst wird. Größere Schwankungen sind auch bei den Wiederholungsversuchen in dieser Arbeit aufgetreten.

Neben den aliphatischen Kohlenwasserstoffen, wie Hexadekan und n-Oktan, werden auch aromatische Kohlenwasserstoffe, z. B. Xylol, eingesetzt, weil schwach hydrophobe Zellen besser an aromatische Kohlenwasserstoffe adsorbieren. Der Einsatz von Xylol wird allerdings von VANHAECKE UND PIJCK [1988] kritisch gesehen, weil sie davon ausgehen, daß durch Xylol die Zellwände lysiert werden. Nach VAN LOOSDRECHT ET AL. [1987a] stellt die Kontaktwinkelmessung eine brauchbare Methode dar, die Oberflächenhydrophobizität von Zellen zu bestimmen, um Rückschlüsse auf die Oberflächenanhaftung zu ziehen. AHIMOU ET AL. [2001] kommen durch Untersuchungen an *B. subtilis* zu dem Schluß, daß durch Kontaktwinkelmessung die Hydrophobizität der Zelle besser wiedergegeben wird als durch den MATH-Test und den HIC-Test („hydrophobic interaction chromatography“), weil beide Tests unter dem Einfluß von elektrostatischen Interaktionen stehen. Dagegen bevorzugen DOYLE UND ROSENBERG [1995], die sich eingehend mit der Thematik beschäftigt haben [DOYLE UND ROSENBERG, 1990], den MATH-Test, da abgesehen von einigen Ausnahmen eine gute Übereinstimmung zwischen der Hydrophobizität der Zelloberfläche und dem Bestreben, sich an Kohlenwasserstoffe zu binden, besteht. Der MATH-Test korreliert zudem gut mit anderen Methoden. DOYLE UND ROSENBERG [1995] weisen auch darauf hin, daß die Adhäsion an hydrophobe Substanzen durch zahlreiche Faktoren beeinflusst wird und empfehlen eine einheitliche Durchführung festzulegen, um die Ergebnisse von unterschiedlichen Arbeitsgruppen miteinander vergleichen zu können. Als Wasserphase wurde die Verwendung einer 0,2 M Natriumchloridlösung mit pH 5 – 6, temperiert auf 37°C vorgeschlagen.

Vergleicht man die Durchführung der Versuche und die in der Literatur angegebenen Vor- und Nachteile beider Methoden miteinander, so scheint der MATH-Test störanfälliger zu sein als die Kontaktwinkelmessung. Daher sollte die Kontaktwinkelmessung bei geeigneter Apparatur, die eine Bestimmung des Randwinkels in Echtzeit unterstützt durch Video- oder Phototechnik zuläßt, dem MATH-Test vorgezogen werden.

5.2 Beurteilung der Verteilung von Mikroorganismen in Emulsionen

Über die Verteilung von Mikroorganismen in Emulsionen ist nur wenig bekannt. Die meisten Autoren gehen davon aus, daß sich Mikroorganismen in mehrphasigen Systemen verstärkt in der Grenzfläche zwischen den Phasen ansammeln [ZUCCARO ET AL., 1951; BRUCKLEHURST ET AL., 1993]. In den meisten Untersuchungen wurde die Verteilung anhand von mikroskopischen Beobachtungen bestimmt. In dieser Arbeit wurde eine neue Möglichkeit erarbeitet, die Verteilung in Emulsionen wiederzugeben: Mit dem Plattengußverfahren nach Robert Koch wurden die Keimzahlen in der Wasser- und Ölphase nach Trennung der Emulsion bestimmt und in Bezug gesetzt. Als hydrophob erwiesen sich die Konidien von *Asp. niger*, *Pen. glabrum* und die Sporen von *B. subtilis* und *B. stearothermophilus*, d. h. es wurden mehr als 50 % der Mikroorganismen in der Ölphase bei den O/W- und W/O-Emulsionen wiedergefunden. *A. acidoterrestris*, *E. coli*, *L. innocua*, *P. anomala*, *S. cerevisiae* und unter Vorbehalt *Lc. lactis* sind als hydrophil einzustufen.

Die hohe Wiederfindungsrate der Schimmelpilzkonidien sporen im Öl entspricht der Erwartung, da nach RUIZ-HERRERA [1992] Konidien sporen hohe Anteile an Lipiden und Wachsen in der äußeren Membran enthalten können, die den hydrophoben Charakter bedingen. Die äußere Schicht von Bakterien sporen (Exosporium oder Sporenhülle) besteht aus sporenspezifischen Proteinen. Diese sind je nach Aufbau hydrophil, neutral oder hydrophob. Für Bakterien sporen war kein einheitlicher Trend bei der Verteilung feststellbar, da sich die *B. subtilis*-Sporen vorwiegend im Öl und die *A. acidoterrestris*-Sporen mehrheitlich im Wasser befanden. Nach HUSMARK [1993] sind *Bacillus*-Sporen sehr hydrophob. HUSMARK UND RÖNNER [1992] stellten auch größere Unterschiede innerhalb der *Bacillus*-Stämme bei der Durchführung des BATH-Tests fest. Die Hydrophobizität scheint von der Art des Sporenbildners und vom Stamm abzuhängen. Aber auch der Lebenszyklus beeinflusst die Oberflächeneigenschaften [ANDERSSON UND RÖNNER, 1998]. Nach WIENCEK ET AL. [1990] wird die Hydrophobizität von *Bacillus*-Sporen durch eine Hitzebehandlung erhöht, wahrscheinlich durch die Inaktivierung von Integralproteinen auf der Sporenhülle oder dem Exosporium [ANDERSON UND RÖNNER, 1998]. Manche Mikroorganismen, so z. B. *B. subtilis*, sind in der Lage Biotenside (z. B. Lipoproteine) zu produzieren, um die Hydrophobizität zu steigern. Diese werden in das Umgebungsmedium abgegeben und bewirken eine Änderung der Zellhydrophobizität durch Anlagerung an der Zelloberfläche [AHIMOU ET AL., 2001]. Die Hydrophobizität von Bakterien wird durch Proteine mit vielen hydrophoben Seitenketten, Lipide und Fimbrien erhöht. Von den getesteten vegetativen Bakterien hat das gram-negative Bakterium *E. coli* die größte Affinität zur Wasserphase. Ein Grund könnte das Fehlen von Teichonsäuren sein, die nur bei gram-positiven Bakterien vorkommen und welche die hydrophoben Eigenschaften von Bakterien verstärken (vgl. Kap. 2.1.1). Die getesteten Hefen sind im Vergleich zu *E. coli* als mäßig hydrophil einzustufen.

Ein Nachteil bei der Bestimmung des Verteilungsverhältnisses ist die unvollständige Trennung der Emulsionen. Sowohl in der Wasser- als auch in der Ölphase konnten noch Restmengen von Öl und Wasser ermittelt werden. Die Restwassermenge im Öl betrug bei den O/W-Emulsionen weniger als 3,4 % und bei W/O-Emulsionen weniger als 9,0 %. Daher war nicht sichergestellt, daß die in der Ölphase gefundenen Mikroorganismen tatsächlich ins Öl übergegangen waren und sich nicht in Wassertropfen, die noch im Öl vorhanden waren, befanden. DUDEK [2004] bestimmte bei gleichem Versuchsaufbau die Größe der Wassertropfen im Öl. Die Öltröpfchen hatten eine Größe von ca. 1 µm und waren damit kleiner als Hefen und Schimmelpilze und größtenteils auch kleiner als Bakterien. Der Übergang der Mikroorganismen eingeschlossen in Wassertropfen kann somit weitgehend ausgeschlossen werden. Eine weitere Möglichkeit, wie das Restwasser im Öl das Ergebnis beeinflussen könnte, besteht darin, daß die Mikroorganismen zum Teil adsorbiert an die Wassertröpfchen ins Öl übergegangen sind.

Die Wasserphase war bei O/W-Emulsionen milchig trüb (Restölmenge 1,9 %). Bei den W/O-Emulsionen war die Wasserphase klar und durch die Trocknungsversuche konnten keine Reste an Öl nachgewiesen werden. Dies lag wahrscheinlich an der schlechten Durchmischung bei Zugabe des Wassers zu dem zähflüssigen Öl. Die Tropfengröße des Wassers in Öl war deswegen auch deutlich größer.

Die Bestimmung des Verteilungsverhältnisses mit der in dieser Arbeit vorgestellten Methode stellt eine Möglichkeit dar, die Verteilung von Mikroorganismen in Emulsionen zu charakterisieren. Bedingt durch die Schwankungen innerhalb der Einzelversuche ist nur eine Grobeinteilung möglich. Diese Schwankungen bezüglich der Phasenverteilung dürften methodisch bedingt sein, da in Wiederholungsversuchen nicht exakt dieselben mittleren Tropfendurchmesser erzielt werden konnten, diese aber nach DUDEK [2004] die Verteilung der Mikroorganismen in binären System entscheidend beeinflussen.

Die durchgeführten Versuche machen auch deutlich, daß ein Wechsel von der Wasser- in die Ölphase bei der Emulsionsherstellung stattfindet. Je nach Testmikroorganismus ist der Übergang sehr beträchtlich, bei Schimmelpilzen gehen mehr als die Hälfte ins Öl über. Auch weisen die Mikroorganismen in Öl eine relativ hohe Überlebensrate in Abhängigkeit von der Zeit auf (vgl. Kap. 5.3). Dies kann erhebliche Auswirkungen auf die Produktsicherheit und -haltbarkeit von ölhaltigen Lebensmitteln haben, was nicht vernachlässigt werden sollte.

5.2.1 Einflußfaktoren auf die Verteilung von Mikroorganismen in Emulsionen

Der Übergang von Mikroorganismen in die Wasser- oder Ölphase einer Emulsion wird zum einen durch die mikrobielle Zelloberfläche, zum anderen durch die Zusammensetzung des Verteilungsmediums bestimmt. Inwieweit Veränderungen der mikrobiellen Zelloberfläche oder der Beschaffenheit der Emulsion das Verteilungsverhalten beeinflussen, wurde an ausgewählten Parametern untersucht.

Emulsionstyp

Vergleicht man die Verteilungsverhältnisse der zwei Emulsionstypen, fällt auf, daß außer bei *L. innocua*, *A. acidoterrestris* und *E. coli* mehr Mikroorganismen in der Wasserphase der W/O-Emulsionen als in der Wasserphase der O/W-Emulsionen gefunden wurden. Es scheint, daß bei den W/O-Emulsionen der Übergang in das Öl erschwert ist. Dies kann folgendermaßen begründet werden: Das Wasser läßt sich im Öl bei den W/O-Emulsionen schwerer verteilen, als das Öl im Wasser beim anderen Emulsionstyp. Daher waren bei den W/O-Emulsionen größere Wassertropfen vorhanden, die nach dem Homogenisieren sofort aggregierten. Deshalb trennt sich dieser Emulsionstyp schneller. Durch die großen Wassertropfen befanden sich dann zu wenig Mikroorganismen im Grenzbereich Wasser/Öl, die dann ins Öl überwechseln konnten [BROCKLEHURST ET AL., 1993]. Das entgegengesetzte Verhalten der drei oben genannten Mikroorganismen kann durch Schwankungen und Ungenauigkeiten bedingt durch den Versuchsaufbau erklärt werden, wenn man die Minimal- bzw. die Maximalwerte betrachtet.

Natriumdodecylsulfat als Emulgator

Durch die Zugabe von Natriumdodecylsulfat zu O/W-Emulsionen wurde die Verteilung der Mikroorganismen nur geringfügig verändert. Bei *A. acidoterrestris*, *E. coli*, *S. cerevisiae* und *Pen. glabrum* war der Anteil in der Wasserphase leicht erhöht, bei *P. anomala* und *Asp. niger* hingegen in der Ölphase. Es ist also keine einheitliche Richtungsverschiebung erkennbar. HANSEN UND RIEMANN [1963] vertreten die Ansicht, daß durch grenzflächenaktive Substanzen der Übergang ins Öl begünstigt wird. Dies trifft beim grenzflächenaktiven Natriumdodecylsulfat nur für einzelne Mikroorganismen zu. Nach NESBITT ET AL. [1982] wurde bei Zugabe von Natriumdodecylsulfat zur Wasserphase beim BATH-Test die Adhäsion an den Kohlenwasserstoff, eventuell durch die Zerstörung von Makromolekülen, verringert, d. h. auch hier wurde der Übergang in die hydrophobe Phase nicht begünstigt.

Ein Problem bei den Verteilungsversuchen mit Emulgator war die Herstellung einer Emulsion, die sich auch wieder trennen ließ. Des weiteren sollte durch den Trennvorgang die Verteilung der Mikroorganismen sowie die Keimdichte nicht beeinflußt werden. Emulsionen aus Wasser, Öl und frischem Eigelb konnten durch eine pH-Wert-Verschiebung nicht getrennt werden, da Eigelb eine Vielzahl von Substanzen (Phospholipide, LD-Lipoproteine und Proteine) enthält, wodurch

die Emulsion stabilisiert wird. Es war jedoch möglich, eine mit dem anionischen Tensid Natriumdodecylsulfat stabilisierte Emulsion mit einem kationischen Tensid zu brechen, da anionische und kationische Tenside Komplexe bilden und sich in ihrer Wirkung aufheben. Jedoch müssen die beiden Tenside einen ähnlichen isoelektrischen Punkt aufweisen. Dies ist bei Natriumdodecylsulfat und Cetylpyridiniumbromid der Fall. Das kationische Tensid wirkt jedoch schon in geringen Mengen gegen gram-negative Bakterien abtötend. Daher wurden die Verteilungsversuche nur für sporenbildende Bakterien, Hefen und Schimmelpilze durchgeführt. Die Zugabe des kationischen Emulgators mußte in Form einer Emulsion erfolgen, um eine Trennung zu erhalten.

Ölart

Der Einfluß der Ölart wurde mit Sonnenblumenöl, Rapsöl und Olivenöl bei *E. coli*, *P. anomala*, *Asp. niger* und *A. acidoterrestris* überprüft. Eine einheitliche Verschiebung des Verteilungsverhältnisses der verschiedenen Mikroorganismen konnte nicht beobachtet werden. Ein möglicher Einflußfaktor könnte die Viskosität der Öle sein. Bei den ausgewählten Ölen hatte Olivenöl die höchste Viskosität. Dies wird durch die Triglyceridzusammensetzung bedingt. Öle mit hohen Trioleatgehalten, wie zum Beispiel Olivenöl, besitzen eine hohe Viskosität [BOCKISCH, 1993]. Daher wurde vermutet, daß aufgrund der höheren Viskosität weniger Mikroorganismen ins Olivenöl übergehen als bei Sonnenblumen- und Rapsöl. Dies konnte jedoch nicht festgestellt werden. Eine weitere Rolle könnte das Fettsäuremuster der Öle spielen. Freie Fettsäuren können als Emulgator wirken und in Emulsionen den Übergang ins Öl begünstigen [PRÄNDL, 1976].

Zusammensetzung der Wasserphase

Durch den Vergleich von O/W-Emulsionen, die zum einen mit entionisiertem Wasser und zum anderen mit Phosphatpuffer hergestellt wurden, wird ersichtlich, daß durch eine Erhöhung des Ionengehaltes in der Wasserphase der Übergang in die Ölphase begünstigt wird. Bei der Durchführung des BATH-Tests wurde ebenfalls durch die Ionenkonzentration die Verteilung beeinflusst. Auch durch die Senkung des pH-Wertes wird der Übergang in die Hydrocarbonphase begünstigt [NESBITT ET AL., 1982]. Durch den Gehalt an Ionen im Wasser kommt es zum einen zu Veränderungen an der Zelloberfläche, die im Zusammenhang mit der Durchlässigkeit der Membran stehen [BUNT ET AL., 1993], zum anderen durch den geänderten pH-Wert zu Ladungsverschiebungen auf der Zelloberfläche [MOZES ET AL., 1991].

Wachstumsphase

Eine von der Wachstumsphase abhängige Änderung der Hydrophobizität aufgrund von unterschiedlichen Oberflächenstrukturen der Zellen [HAZEN ET AL., 1986; KOHLWEYER, 2000] konnte mit den durchgeführten Versuchen nicht erfaßt werden.

Die unterschiedliche Oberflächenstruktur wird durch die verschiedene Stoffwechselaktivität der Zellen in den Wachstumsphasen bestimmt. Mit fortschreitendem Zellaalter nimmt der Stoffwechsel ab und die Zellhydrophobizität erhöht sich [VAN LOOSDRECHT ET AL., 1987b; KOHLWEYER, 2000]. So sind Zellen aus der frühexponentiellen Wachstumsphase am hydrophilsten und aus der stationären Phase am hydrophobsten. HAZEN ET AL. [1986] zeigten anhand des MATH-Tests, daß *Candida albicans*-Zellen aus der stationären Wachstumsphase eine höhere Zelloberflächenhydrophobizität besitzen als Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase. Die Autoren wiesen auch darauf hin, daß sich Zellen mit höherer Hydrophobizität stärker an Epithelzellen anheften.

Weitere Einflußfaktoren wurden von DUDEK [2004] untersucht. Als Testmikroorganismen wurden Sporen von *Bacillus amyloliquefaciens* und Konidien von *Penicillium decumbens* verwendet. Durch Erhöhung der Scherkräfte bei der Herstellung der O/W-Emulsionen (Drehzahl erhöht von 17800 auf 23500 U/min) wurde das Öl feiner dispergiert und der Anteil der Mikroorganismen in Öl, wahrscheinlich aufgrund der kleineren Tröpfchendurchmesser des Öls, verringert. Die Verlängerung der Entmischungszeit von 2 bzw. 4 h auf bis zu 24 h hatte keinen großen Einfluß auf die Verteilung. Bei W/O-Emulsionen wurden die Mikroorganismen auch gefriergetrocknet über das Öl zugegeben. Das Ausmaß der Verteilung im binären System das durch die Keimzugabe zum einen über das Wasser, zum anderen über das Öl hervorgerufen wurde, war vom verwendeten Mikroorganismus abhängig. Eine grundlegende Veränderung in der Verteilung ist jedoch nicht aufgetreten.

5.2.2 Vergleich zwischen der Hydrophobizität und der Verteilung von Mikroorganismen in Emulsionen

Es ist ein Zusammenhang zwischen der Hydrophobizität bestimmt durch den MATH-Test und der Verteilung der Mikroorganismen in den Emulsionen feststellbar. Nach dem MATH-Test waren *P. anomala* und *E. coli* hydrophiler als die anderen getesteten Mikroorganismen. Für *E. coli* war auch der prozentuale Anteil in der Wasserphase bei O/W-Emulsionen am höchsten, und *P. anomala* wies ebenfalls eine hohe Wiederfindungsrate in der Wasserphase auf. Dies gilt vor allem für die W/O-Emulsionen.

Die Ergebnisse des MATH-Tests mit den sporenbildenden Bakterien, *B. subtilis* und *A. acidoterrestris*, sind mit Vorbehalt zu bewerten (vgl. Kap. 5.1), da keine reinen Sporensuspensionen verwendet wurden, wobei das Ergebnis des MATH-Tests durch die abgetöteten vegetativen Zellen möglicherweise beeinflusst wurde.

Schimmelpilzkonidien sind aufgrund ihrer Zellstruktur hydrophob. Dies konnte mit der Kontaktwinkelmessung belegt werden. Auch wurde bei den Emulsionsversuchen mehr als die Hälfte der Konidien im Öl wiedergefunden. Von allen getesteten Mikroorganismen hatten *Asp. niger*- und *Pen. glabrum*-Konidien die höchsten Wiederfindungsraten in Öl.

Um jedoch gesicherte Aussagen über den Zusammenhang zwischen der durch den MATH-Test bestimmten Hydrophobizität und der tatsächlichen Verteilung in der Wasser- und Ölphase treffen zu können, müßten noch weitere Mikroorganismen getestet werden. Da die Kontaktwinkelmessung in dieser Arbeit nur für drei Stämme möglich war, wären ebenfalls noch weitere Untersuchungen nötig, um die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessung mit der tatsächlichen Verteilung in Emulsionen besser vergleichen zu können.

5.3 Lagerstabilität von Mikroorganismen in Öl und Mayonnaise

Bevor die Auswirkungen eines hohen Ölgehalts bei der Lebensmittelkonservierung untersucht wurden, wurde die Stabilität von Mikroorganismen in Öl und Mayonnaise bei Kühlung (7°C) miteinander verglichen.

Lagerung in Öl

L. innocua wies eine hohe Lagerstabilität in Öl auf. Die Überlebensrate in Sonnenblumenöl bei Kühlung entsprach derjenigen in Phosphatpuffer und lag über derjenigen von entionisiertem Wasser und Mayonnaise. Nach 28 Tagen kam es nur zu einer Keimzahlreduktion um zwei Zehnerpotenzen. Im Gegensatz dazu ging die Keimzahl von *Lc. lactis* kontinuierlich zurück. Auch traten größere Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen auf. Dies könnte an der vorausgegangenen unterschiedlichen Lagerdauer der gefriergetrockneten *Lc. lactis*-Zellen gelegen haben. Die Mikroorganismen wurden für die Versuche in Öl gefriergetrocknet, um sie wasserfrei im Öl verteilen zu können. Nach der Gefrier Trocknung wurden die Mikroorganismen bis zum Versuchsansatz bei -18°C aufbewahrt. Durch diese Lagerung ist es wahrscheinlich zur Schädigungen von *Lc. lactis* in Abhängigkeit von der Aufbewahrungszeit gekommen, wodurch der eigentliche Versuch zur Lagerstabilität in Öl beeinflusst wurde. *Lc. lactis* reagiert somit empfindlicher auf Umwelteinflüsse als *L. innocua*.

Bei ZUCCARO ET AL. [1951] findet man Angaben zur maximalen Überlebensdauer von verschiedenen Hefen, von *Lactobacillus lycopersici* und *Bacillus thermoacidurans* in Baumwoll-, Erdnuß-

und Maiskeimöl. Die Hefen und *Lactobacillus lycopersici* waren zwischen 16 und 29 Tage im Öl nachweisbar, die *Bacillus*-Sporen überlebten mehr als 85 Tage (entspricht der Versuchsdauer). Die Art des Öls hatte in diesen Versuchen keinen Einfluß auf die Überlebensrate.

Lagerung in Mayonnaise

Die Überlebensdauer von Mikroorganismen in Mayonnaise hängt ebenfalls von der verwendeten Mikroorganismenart ab. Für die Versuche in Mayonnaise gilt das gleiche wie für Sonnenblumenöl. Die Überlebensrate von *L. innocua* lag über derjenigen von *Lc. lactis*. Vergleiche mit anderen Untersuchungen sind nur bedingt möglich, da die Zusammensetzung der Mayonnaise eine entscheidende Rolle spielt. Ein Einflußfaktor ist der pH-Wert der Mayonnaise. Je niedriger der pH-Wert ist, desto höher ist die mikrobielle Stabilität der Mayonnaise. Auch die Art der Säure hat einen Einfluß. PERALES UND GARCIA [1990] konnten zeigen, daß der antimikrobielle Effekt von Essig (Essigsäure) gegenüber Zitronensaft (Zitronensäure) bei gleichem pH-Wert größer ist, weil die Essigsäure im höheren Maße undissoziiert vorliegt als die Zitronensäure [RADFORD UND BOARD, 1993]. Bestimmte Gewürze können ebenfalls eine Keimzahlreduzierung bewirken. Durch den Zusatz von 1 % frischem Knoblauch zu Mayonnaise konnten LEUSCHER UND ZAMPARINI [2002] die Keimzahl von *Salmonella* Enterica von $3,5 \times 10^5$ KbE/ml innerhalb von fünf Tagen auf < 100 KbE/ml reduzieren, in der Kontrolle wurden nach zehn Tagen noch immer $1,5 \times 10^5$ KbE/ml detektiert.

CERNY [1983a] untersuchte die Haltbarkeit von Fleischsalat bei Raumtemperatur. Fleischsalat besitzt bei Raumtemperatur eine mikrobiologische Stabilität von zwei bis drei Wochen. Durch die Zugabe von Konservierungsstoffen in lebensmittelrechtlich zulässigen Mengen kann die Haltbarkeit verlängert werden.

5.4 Verfahren zur Haltbarmachung von Lebensmitteln im Vergleich

5.4.1 Thermische Inaktivierung von Mikroorganismen in Abhängigkeit vom Umgebungsmedium

Alle lebensmittelrelevanten, unerwünschten Mikroorganismen können bei Anwendung entsprechend hoher Temperaturen abgetötet werden. Es kommt jedoch, abhängig von der gewählten Temperatur, zu deutlichen Geschmacks-, Konsistenz- und Nährstoffveränderungen. Die Wirkung der thermischen Abtötung hängt im wesentlichen von folgenden Faktoren ab:

- der Art des abzutötenden Mikroorganismus,
- dem morphologischen Stadium (vegetative Form, Spore) und physiologischen Zustand,
- der Ausgangskeimzahl,
- der Temperatur,
- der Erhitzungszeit und
- der Zusammensetzung des Erhitzungsmediums [MÜLLER UND WEBER, 1995].

Durch die Versuche mit *E. coli* wurde aufgezeigt, daß auch die Beschaffenheit des Erhitzungsgefäßes (wie Durchmesser oder Wandstärke) Auswirkungen auf die Abtötungskinetik hat. Bedingt wird dies wahrscheinlich durch die unterschiedlichen thermodynamischen Vorgänge (z. B. Wärmeübertragung und Leitfähigkeit).

Bei Mayonnaise ist aufgrund der chemischen und physikalischen Zusammensetzung die Inaktivierung von Mikroorganismen stark herabgesetzt. Auch verläuft die Abtötung nicht exponentiell [CERNY UND HENNLICH 1983]. Ob diese Tatsache vorwiegend durch den Ölgehalt oder durch andere Parameter verursacht wird, soll durch den Vergleich der Abtötungskurven in Wasser, Öl und Mayonnaise geklärt werden.

Wasser als Umgebungsmedium

Im allgemeinen findet in Wasser aufgrund der guten Wärmeleitfähigkeit und der Homogenität eine schnelle exponentielle (= logarithmische) Abtötung von Mikroorganismen statt. Für die Testbakterien *E. coli*, *L. innocua* und *Lc. lactis* wurden in entionisiertem Wasser logarithmische Abtötungskinetiken bei Verwendung von dünnwandigen Fiolaxgläsern bestimmt. Daß es durchaus zu Abweichungen von der logarithmischen Abtötung in wäßrigen Medien kommen kann, ist vielfach in der Literatur belegt worden [MOATS ET AL., 1971; ABABOUC ET AL., 1995; STABEL ET AL., 1997]. MOATS ET AL. [1971] bestimmten für *E. coli* einen sigmoiden Verlauf. Durch zahlreiche Experimente und Literaturvergleiche versuchten die Autoren die Unregelmäßigkeiten zu erklären. Für die Bildung des Tailings wurden verschiedene Thesen diskutiert. Sie konnten jedoch keine eindeutige Ursache für den sigmoiden Verlauf identifizieren und kamen daher zu dem Schluß, daß die Annahme der exponentiellen Inaktivierung oft zu ungenau ist, um das tatsächliche Absterbeverhalten wiederzugeben. Zudem weist die Population eines Bakterienstammes selten eine völlig homogene Hitzeresistenz auf. Des weiteren kann der Zelltod bei der thermischen Behandlung nicht auf einen einzelnen Mechanismus zurückgeführt werden.

Öl als Umgebungsmedium

Die Abtötung von *L. innocua* in Öl verlief erwartungsgemäß erheblich langsamer als in Wasser. Eine deutliche Abtötung fand in Sonnenblumenöl erst ab einer Temperatur von 70°C statt. Bei *Lc. lactis* verlief die Abtötung in Sonnenblumenöl zwar langsamer als in entionisiertem Wasser,

aber schon bei 50°C kam es zu einer Reduzierung der Keimzahl vergleichbar mit der Abtötung in Mayonnaise. Die relativ gute Abtötung von *Lc. lactis* in Sonnenblumenöl war erstaunlich. Eine mögliche Ursache könnte sein, daß es bei der Gefrier Trocknung zu einer subletalen Schädigung der Zellen gekommen ist, wodurch sie empfindlicher gegenüber der Hitzeeinwirkung geworden sind und daher bei 60°C eine bessere Abtötung in Sonnenblumenöl aufwiesen als in Mayonnaise, in der sie als nicht gefriergetrocknete Zellen eingesetzt wurden.

Die gefundene Schutzwirkung des Öls wurde auch für andere vegetative Bakterien [GAZE, 1985], Bakteriensporen [ABABOUC ET AL., 1987, KONRICH, 1963], Hefen [ZUCCARO ET AL., 1951] und Schimmelpilze [BRÖKER ET AL., 1987] nachgewiesen. Man geht davon aus, daß in Öl ähnliche Bedingungen vorliegen wie beim Erhitzen durch trockene Wärme [SLESAREWSKY, 1931], da im Öl kein oder nur eine sehr geringe Menge Wasser vorhanden ist. Nach einer Zusammenstellung von KONRICH [1963] findet bei gleicher Temperatur in heißer Luft sogar eine stärkere Sporeninaktivierung statt als in heißem Öl, vor allem in den Temperaturbereichen um 140°C.

Der Einfluß der Ölart auf die thermische Abtötung von *L. innocua* wurde in Sonnenblumenöl, Olivenöl und Sojaöl untersucht. Es konnten Unterschiede in der Abtötung festgestellt werden. In Sojaöl war die Keimzahlreduzierung am stärksten, in Olivenöl am geringsten. Dies entsprach nicht der Erwartung, da *E. coli* bei den Verteilungsversuchen in den verschiedenen Ölen in Olivenöl schon ohne Erhitzung abgestorben war. Daher wurde vermutet, daß Olivenöl antimikrobielle Substanzen enthält, die eine Hitzeabtötung begünstigen könnten. Auffällig waren auch die Schwankungen innerhalb der Wiederholungsversuche. Bei näherer Betrachtung der Versuche stellte sich heraus, daß die Wirkung wahrscheinlich auch von der Alterung des Öls und dem damit verbundenen Oxidationsgrad abhängt. Wenn die Versuche in gealtertem Öl durchgeführt wurden, verliefen die Abtötungskurven, vor allem in Sojaöl deutlich flacher. Daher waren bei gealterten Ölen kaum noch Unterschiede zwischen den Ölarten erkennbar. MOLIN UND SYNGG [1967] bestimmten unterschiedliche Abtötungskurven in Abhängigkeit von der Ölart. Bei ihren Untersuchungen wurden *Bacillus cereus*-Sporen in Olivenöl (und Paraffin) besser abgetötet als in Sojaöl. Dies ist genau gegensätzlich zu den in dieser Arbeit vorliegenden Versuchen mit *L. innocua* (Sojaöl besser als Olivenöl).

Für die Konidiensporen von *Penicillium roqueforti* konnten BRÖKER ET AL. [1987] in Maiskeimöl eine geringfügig verringerte Hitzeabtötung feststellen im Vergleich zu Paraffin, Erdnuß-, Oliven- und Sojaöl, die in etwa identische Abtötungskinetiken aufwiesen. Die geringste Abtötungsrate wurde jedoch für Ölsäure detektiert. Ein Zusammenhang zwischen den innerhalb der Fettsäureketten vorliegenden Doppelbindungen und der Temperaturverträglichkeit der Konidien konnte nicht hergestellt werden.

Dagegen stellten ZUCCARO ET AL. [1951] bei ihren Erhitzungsversuchen mit verschiedenen Hefen und Bakterien (*Lactobacillus lycopersici* und *Bacillus thermoacidurans*) keine Unterschiede

zwischen den Ölarten (Baumwoll-, Erdnuß- und Maiskeimöl) bei der Abtötung fest. Eine pH-Wert Senkung in Baumwollöl von pH 5,6 auf pH 4,0 hatte auch keinen erkennbaren Einfluß. In Phosphatpuffer wurde bei gleicher pH-Wert-Änderung die Abtötungszeit um die Hälfte verkürzt. Der Einfluß der Ölart scheint daher auch von der verwendeten Mikroorganismenart abzuhängen. Ein entscheidendes Problem bei den Abtötungsversuchen in Öl ist die gleichmäßige und wasserfreie Verteilung der Mikroorganismen. SMITH ET AL. [1976] vertreten daher die Ansicht, daß der Einfluß von Fett bei der thermischen Abtötung von Bakterien und Hefen überbewertet wird, weil die Schutzwirkung weitgehend methodisch bedingt ist. Die Autoren untersuchten den Einfluß des Fettes in emulgierten Wurstprodukten und groben Brühwürsten mit Fettgehalten zwischen 11 und 38 %. Sie konnten keinen Zusammenhang zwischen dem Fettgehalt und der Abtötung feststellen. Dieser Kritikpunkt ist durchaus angebracht. Auch in den vorliegenden Versuchen war es nicht möglich, die gefriergetrockneten Testmikroorganismen homogen im Öl zu verteilen. So waren vor allem bei *Lc. lactis* noch Zellverklumpungen erkennbar. Diese Verklumpungen ließen sich weder durch Homogenisieren mit dem Ultraturrax noch durch eine Ultraschallbehandlung beseitigen.

SMITH ET AL. [1976] führten auch an, daß es nicht praxisnah sei, die Mikroorganismen völlig wasserfrei im Öl zu verteilen und daß schon durch 1 % Wasser in reinem Fett oder Öl die Schutzwirkung bei der thermischen Inaktivierung von sporenbildenden Organismen aufgehoben würde [RODENBECK, 1933]. Auch KONRICH [1963] zeigte auf, daß man durch einen geringen Wasserzusatz von 0,1 % zu reinen Ölen und Fetten diese unter üblichen Autoklavierbedingungen (120°C 30 min oder 130°C 10 min) sterilisieren kann. BRÖKER ET AL. [1987] konnten ebenfalls durch den Zusatz von Wasser (0,1 %, 1 % und 10 %) die Schutzwirkung des Öls verringern.

Mayonnaise als Umgebungsmedium

Die Erhitzungsversuche in Mayonnaise bauten auf den Untersuchungen von CERNY [1983a und 1983b] und CERNY UND HENNLICH [1983] auf, welche die thermische Abtötung von *Lactobacillus buchneri* und *Pichia membranaefaciens* bei Temperaturen zwischen 50 – 80°C in Mayonnaise bestimmt haben: Auf eine anfänglich schnelle Abtötung der Mikroorganismen folgte ein Stagnationsplateau, das durch die Erhitzungstemperatur beeinflusst wurde. Je höher die Temperatur war, desto mehr Mikroorganismen wurden zu Beginn abgetötet, d. h. das Stagnationsplateau befand sich auf einem niedrigeren Level.

Für *L. innocua* war ein Plateau bei 55°C nicht erkennbar und auch bei 60°C nur schwach ausgebildet, d. h. nicht so gut ersichtlich wie bei CERNY UND HENNLICH [1983]. *Lc. lactis* wies bei 50°C auch eine annähernd lineare Abtötung auf (in der halblogarithmischen Darstellung). Bei 55°C, vor allem aber bei 60°C hingegen war ein Stagnationsplateau erkennbar. PAULUS [2005], die ebenfalls die Ergebnisse von CERNY UND HENNLICH [1983] als Grundlage für ihre Erhitzungs-

versuche in Mayonnaise heranzogen hatte, konnte für *Pichia anomala* bei 56°C kein Stagnationsplateau feststellen. Es zeigte sich, daß die von CERNY UND HENNLICH [1983] bestimmten Abtötungskinetiken mit dem Stagnationsplateau nur eine Möglichkeit von mehreren bei der thermischen Abtötung in Mayonnaise darstellten und der Verlauf der Abtötungskurven auch von der Temperatur abhängig ist. Die Autoren erklärten das Absterbeverhalten wie folgt: In der Anfangsphase werden nur die Mikroorganismen abgetötet, die sich in der Wasserphase aufhalten. Die anderen Mikroorganismen, die sich in den Öltröpfchen befinden, bzw. von den Öltröpfchen umgeben sind, überleben die Erhitzung und bilden das Stagnationsplateau. Durch Bestimmung der Abtötungskurven der Testmikroorganismen in Wasser und in Öl und dem anschließenden Vergleich mit dem Verlauf der Abtötungskurven in Mayonnaise sollte diese Vermutung bestätigt werden. Mit den erzielten Ergebnissen konnte dies im Falle von *Lc. lactis* und *L. innocua* (bei 60°C) zum Teil bestätigt werden.

Über das Eigelb gelangen Proteine, die einen Schutz bei der Hitze einwirkung bieten, in die Mayonnaise. Von nativen Proteinen geht eine größere Schutzwirkung aus als von denaturierten. Durch den Zusatz von Kochsalz und Saccharose in molaren Konzentrationen kommt es ebenfalls zu einem Schutzeffekt. Die protektive Wirkung von Kochsalz und Saccharose hängt mit der Erniedrigung des a_w -Wertes (osmotischer Wasserentzug) zusammen.

Der pH-Wert spielt bei der Hitzeinaktivierung normalerweise eine entscheidende Rolle. Im allgemeinen sind Bakterien im Bereich zwischen pH 6 und 7 am hitzeresistentesten [MÜLLER UND WEBER, 1996]. Jedoch sind Hefen und Schimmelpilze mitunter im schwach sauren pH-Bereich hitzebeständiger [CERNY, 1980]. Eine Senkung des pH-Wertes führt in stärkerem Maße zu einer Resistenzabnahme als eine Erhöhung des pH-Wertes [MÜLLER UND WEBER, 1996]. Die verbesserte thermische Abtötung durch einen niedrigen pH-Wert wird bei den Erhitzungsversuchen in Mayonnaise größtenteils von anderen Faktoren, die einen Schutzeffekt bei der Erhitzung ausüben, überlagert.

Es läßt sich festhalten, daß Mayonnaise aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung einen Schutz bei der thermischen Inaktivierung von Mikroorganismen bietet. Unter bestimmten Umständen kommt es zur Entstehung eines Stagnationsplateaus. Dies ist zum Beispiel von der Temperatur abhängig. Bei der Hitzeinaktivierung ist auch entscheidend, ob die Zellen in der Wasser- oder in der Ölphase vorliegen. Des weiteren ist ausschlaggebend, welche protektiv wirkenden Substanzen (z. B. Öl, Salz, Zucker) in der Mayonnaise vorhanden sind.

5.4.2 Wirkung von Fettsäuren und Fettsäureestern bei der thermischen Inaktivierung

Die verstärkte thermische Abtötung von Mikroorganismen in Mayonnaise nach Zugabe von geringen Mengen an chemischen Konservierungsstoffen wurde bereits von CERNY UND HENNLICH [1983] nachgewiesen. Des weiteren ist die antimikrobielle Wirkung von Fettsäuren und Fettsäureestern vielfach, vorwiegend in wäßrigen Medien, belegt worden [BERGSSON ET AL., 2001; LEE ET AL., 2002; WELSH ET AL., 1979]. Mit den durchgeführten Versuchsreihen sollte überprüft werden, ob Fettsäuren und deren Derivate als natürliche Konservierungsstoffe die Hitzeabtötung von Bakterien in Mayonnaise verstärken und damit als Alternative zu chemischen Konservierungsstoffen eingesetzt werden können.

In Vorversuchen zeigte sich, daß durch den Zusatz von Caprinsäure und Monolaurin in Konzentrationen ≤ 1 % Zellen von *L. innocua* und *Lc. lactis* in Nährbouillon bei 37°C innerhalb kurzer Zeit (≤ 10 min) abgetötet wurden. Die Zugabe von Ölsäure führte nur bei *Lc. lactis* zu einer Keimzahlreduzierung.

Allerdings waren diese Ergebnisse nicht auf die Erhitzungsversuche in Mayonnaise übertragbar. Bei den Erhitzungsversuchen konnte durch die Zugabe der Fettsäuren die Keimzahlreduktion nicht verbessert werden. Ein Problem bei den Versuchen stellte die schlechte Wasserlöslichkeit der Fettsäuren und des Monolaurins dar. Für die Versuche in der Bouillon wurden die Substanzen in Ethanol gelöst, um diese in der wäßrigen Nährlösung zu verteilen. Bei den Erhitzungsversuchen mit Mayonnaise wurden die Fettsäuren direkt zum Öl gegeben. Dies könnte eine mögliche Ursache dafür sein, daß durch die Fettsäuren die Hitzeabtötung in Mayonnaise nicht verbessert wurde, weil sich der Großteil der Mikroorganismen in der Wasserphase befand. Monolaurin, das die beste Wirkung in Nährbouillon aufzeigte, wurde zum einem direkt zum Öl und zum anderen gelöst in Ethanol der Wasserphase zugegeben. Durch die Zugabe dieser Substanz konnte keine eindeutige Wirkungssteigerung erzielt werden: Die verbesserte Hitzeabtötung in Mayonnaise mit Monolaurin (gelöst in Ethanol) war nicht auf den Fettsäureester, sondern auf den Ethanolgehalt zurückzuführen.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von TREMULET ET AL. [2002]. Sie konnten durch den Zusatz von ungesättigten, freien Fettsäuren (Palmitinsäure, Palmitoleinsäure, Stearinsäure, Ölsäure und Linolsäure) die Abtötung von *Bacillus stearothermophilus*-Sporen bei der Erhitzung in Entenleber steigern. Die Fettsäuren wurden dazu in destilliertem Wasser mit 2,5 % Tween 80 durch Mikrosonation dispergiert.

Der genaue Wirkungsmechanismus von Fettsäuren und deren Derivaten bei der Abtötung von Bakterien und Hefen ist noch nicht bekannt [BERGSSON ET AL., 2001]. Da die Fettsäureester, abgesehen von einigen Ausnahmen wie Monolaurin, eine geringere antimikrobielle Wirkung aufweisen als die Fettsäuren, scheint die freie Carboxylgruppe eine wichtige Funktion zu erfüllen.

Allgemein nimmt man an, daß freie Fettsäuren ähnlich wirken wie anionische, oberflächenaktive Substanzen [KABARA ET AL., 1972]. Es müssen aber noch weitere Mechanismen eine Rolle spielen, da Fettsäuren effektiver sind als zum Beispiel die oberflächenaktive Substanz Natriumdodecylsulfat. Generell gehen KABARA ET AL. [1972] davon aus, daß durch Fettsäuren die Lipidmembran beeinflusst wird, wodurch sich die Permeabilität ändert.

BERGSSON ET AL. [2001] wiesen durch elektronenmikroskopische Aufnahmen nach, daß durch Monocaprin die Zellwand von Hefen nicht visuell erkennbar beeinflusst wurde, jedoch der strukturelle Aufbau des Cytoplasmas. Dies hat wahrscheinlich eine Änderung des „Hydrostatischen Turgor-Drucks“ der Zelle zur Folge und ist Ursache für den Zelltod. Auch bei Bakterien waren keine sichtbaren Veränderungen an der Zellwand erkennbar. Trotzdem kamen BERGSSON ET AL. [2001] zu dem Schluß, daß die verschiedenen Bestandteile der Zellwand von Hefen und Bakterien eine wichtige Rolle spielen, weil Monocaprin in Abhängigkeit vom jeweiligen Mikroorganismus eine unterschiedliche Wirkung (Schnelligkeit und Effektivität) zeigte.

LEE ET AL. [2002] konnten zeigen, daß durch die Zugabe von emulgierend wirkenden Substanzen (Glycerinlaurat oder Glycerinmyristat) die Wirkung der Linolensäure durch synergistische Effekte gesteigert wurde.

Auch beim Einsatz von Fettsäuren und deren Derivaten als „natürliche Konservierungsstoffe“ schien das Umgebungsmedium eine wichtige Rolle zu spielen. Die Hitzeinaktivierung in Mayonnaise konnte jedenfalls durch den Einsatz von Fettsäuren nicht verbessert werden. Von Ölsäure ging sogar ein leichter Schutzeffekt aus.

5.4.3 Druckinaktivierung von Mikroorganismen in Abhängigkeit vom Umgebungsmedium

Das Umgebungsmedium hat auch bei der Hochdruckbehandlung einen entscheidenden Einfluß. Daher sollte die Wirkung einer Hochdruckbehandlung direkt am Lebensmittel getestet werden.

Nach RADEMACHER [1999] wird bei Milch und Milchprodukten die Abtötung der Mikroorganismen

- verbessert durch Absenkung des pH-Wertes und die Erhöhung der Temperatur,
- verschlechtert durch Absenkung des a_w -Wertes mit Salz und Zucker und durch die Konzentrierung des Produktes mit Hilfe von Nanofiltration,
- nicht beeinflusst durch die Konzentrierung des Produktes mit Hilfe von Ultrafiltration und durch den Fettgehalt.

Die Inaktivierung von Mikroorganismen verläuft in Lebensmitteln meist langsamer als in Wasser oder Puffer [MOLINA-HÖPPNER, 2002]. Dies konnte auch für Mayonnaise durch den Vergleich der Inaktivierungskurven von Phosphatpuffer, Sonnenblumenöl und Mayonnaise bestätigt werden.

Phosphatpuffer als Umgebungsmedium

Als wäßriges Medium wurde nicht entionisiertes Wasser wie bei den Erhitzungsversuchen, sondern Phosphatpuffer verwendet, in dem die Mikroorganismen normalerweise beständiger sind. Eine Keimzahlreduktion um drei Zehnerpotenzen wurde bei *L. innocua* bei einem Druck von 350 MPa innerhalb von 5 min erreicht. *Lc. lactis* erwies sich als druckempfindlicher, so daß diese Bakterienart schon bei einem Druck von 300 MPa innerhalb von 5 min um mehr als sechs Zehnerpotenzen abgetötet wurde. Vergleicht man vorliegende Ergebnisse, die mit *L. innocua* erzielt wurden, mit anderen Publikationen über die Hochdruckinaktivierung von Listerien in wäßrigen, neutralen Medien, so weist der in dieser Arbeit eingesetzte Teststamm eine durchschnittliche Druckempfindlichkeit auf [OXEN-BODENHAUSEN, 1995; SIMPSON UND GILMOUR, 1997; HERDEGEN, 1998]. RADEMACHER [1999] konnte bei Erhitzungsversuchen in Milch für *L. monocytogenes* Scott A ein Tailing detektieren, für *L. innocua* WS 2257 und *L. monocytogenes* NCTC 11994 bestimmte sie in der halblogarithmischen Darstellung annähernd lineare Abtötungskinetiken. SIMPSON UND GILMOUR [1997] wiesen ebenfalls Unterschiede im Verlauf der Abtötungskinetiken von drei *L. monocytogenes*-Stämmen nach. HERDEGEN [1998] ermittelte für die Abtötungskurve von *L. innocua* bei 500 MPa einen sigmoiden Verlauf in Nährlösung.

Für *Lc. lactis*-Stämme wurden ebenfalls sigmoid-asyymetrische Abtötungskurven in Milchpuffer bei 300 MPa bestimmt [MOLINA-HÖPPNER, 2002]. Innerhalb von 5 min konnten die Milchsäurebakterien in Milchpuffer um eine halbe bis zu dreieinhalb Zehnerpotenzen abgetötet werden.

Öl als Umgebungsmedium

In Sonnenblumenöl fand unabhängig vom jeweils eingesetzten Testmikroorganismus nur eine sehr geringe Inaktivierung statt. Innerhalb von 15 min wurde bei einem Druck von 500 MPa Zellen von *L. innocua* und *Lc. lactis* um ca. eine halbe bis eine Zehnerpotenz abgetötet. Auch OXEN-BODENHAUSEN UND KNORR* [zitiert nach RADEMACHER, 1999] wiesen eine geringere Abtötung von *Micrococcus luteus* in reinem Pflanzenöl nach: Es wurden weniger Mikroorganismen als in Sahne abgetötet.

Die geringe Abtötung der Mikroorganismen in Ölen und Fetten dürfte weitgehend auf den herabgesetzten a_w -Wert zurückzuführen sein. Den Einfluß des Wassergehaltes im Umgebungsmedium bzw. des solvatisierten Zustandes der mikrobiellen Zellen bei der Hochdruckbehandlung wiesen auch andere Autoren nach. OXEN-BODENHAUSEN [1995] erzielte bei einer Hochdruckbe-

* Hochschulkurs Hochdruckpasteurisierung: Einfluß von Lebensmittelinhaltsstoffen auf die Barotoleranz von Mikroorganismen, Heidelberg, 1993.

handlung von Trockenhefe bei 400 MPa für 15 min eine Abtötung um weniger als eine Zehnerpotenz. Durch Suspendierung der Trockenhefe in Ringerlösung kam es hingegen zu einer Reduzierung der Keimzahlen um mehr als acht Zehnerpotenzen. KOWALSKI ET AL. [1992] zeigten, daß Mikroorganismen in trockenen Gewürzen eine höhere Druckresistenz aufweisen. Die erhöhte Druckresistenz aufgrund des niedrigen a_w -Wertes deckte sich somit mit den eigenen Ergebnissen.

Mayonnaise als Umgebungsmedium

Die Abtötungskinetiken von *L. innocua* und *Lc. lactis* in Mayonnaise verliefen im Vergleich zu den Abtötungskurven in Phosphatpuffer sehr flach, d. h. es fand nur eine geringe Abtötung der Bakterien, wie auch schon bei der thermischen Behandlung, statt. Bei 500 MPa wurden innerhalb von 15 min nur zwei Zehnerpotenzen von *L. innocua* abgetötet. Auch schien die Abtötung der Listerien nicht exponentiell zu verlaufen. *Lc. lactis* wies im Gegensatz zu *L. innocua* eine stärkere Abtötung in Mayonnaise auf. So waren bei einem Druck von 500 MPa innerhalb von 15 min keine Laktokokken mehr nachweisbar, die Keimzahlreduzierung betrug somit mindestens sechs Zehnerpotenzen. Bei einem Druck von 350 MPa wurden hingegen die Keimzahl innerhalb von 15 min um zwei Zehnerpotenzen abgetötet. Ein Grund für die bessere Abtötung ist die höhere Drucksensitivität von *Lc. lactis*, so kam es schon in Phosphatpuffer bei gleichem Druck zu einer stärkeren Keimzahlreduktion im Vergleich zu *L. innocua*. Eine andere Ursache könnte sein, daß mehr Laktokokken in der Wasserphase verblieben sind als Listerien. Die vorausgegangenen Verteilungsversuche in Emulsionen deuten eine höhere Affinität von *Lc. lactis* zur Wasserphase als von *L. innocua* an.

Es liegen nur wenige Untersuchungen über die Hochdruckbehandlung von Emulsionen mit einem hohen Fettanteil vor, daher ist ein Vergleich nur begrenzt möglich. SIMPSON UND GILMOUR [1997] untersuchten bei Listerien die Wirkung von Hochdruck in einer Emulsion aus Phosphatpuffer und 30 % Olivenöl stabilisiert mit 0,75 % Lecithin. In der Emulsion war die Druckresistenz der Testmikroorganismen deutlich erhöht. Ein wichtiger Einflußfaktor dabei ist die Menge an freiem Wasser, dies gilt vor allem für die Bakterien, die sich an der Grenzfläche der Öltröpfchen zusammen mit dem Emulgator befinden. RADEMACHER [1999] ermittelte ebenfalls eine schlechtere Abtötung der Testmikroorganismen in Milch und Sahne als in Phosphatpuffer. Eine Abhängigkeit der Inaktivierungsreaktion vom Fettgehalt konnte jedoch in Milchprodukten (O/W-Emulsionen) bei Fettgehalten zwischen 1,5 und 30 % nicht festgestellt werden. RADEMACHER [1999] geht davon aus, daß sich die Mikroorganismen in der wäßrigen Phase befinden, und somit der Inaktivierungseffekt nicht vom Fettgehalt des Produktes abhängig ist.

OXEN-BODENHAUSEN [1995] verglich die Abtötung von *E. coli* in Sahne und Gemüsebrei mit derjenigen in Verdünnungsmedium (Ringerlösung). Die Keimzahlreduktion in Sahne und Gemüsebrei war vermindert. Begründet wurde dies für die Sahne mit einem günstigeren osmotischen

Druck. Bei *Micrococcus luteus* wurde jedoch kein Unterschied in der Abtötung zwischen Sahne und Verdünnungsmedium festgestellt, d. h. nicht jeder Mikroorganismus wird im gleichen Ausmaß durch ein Lebensmittel geschützt [OXEN-BODENHAUSEN, 1995]. Auch CARLEZ ET AL. [1993] stellten für *L. innocua*, aber nicht für *Citrobacter freundii*, eine protektive Wirkung der Fleischbestandteile fest. GERVILLA ET AL. [2000] bestimmten die Abtötungskinetiken für verschiedene Testmikroorganismen in Ringerlösung und Schafsmilch mit 0 %, 6 % und 50 % Fett bei unterschiedlichen Temperaturen und Drücken. Sie konnten geringe Unterschiede in der Keimzahlreduzierung in Schafsmilch mit 0 %, 6 % und 50 % Fettgehalt für bestimmte Mikroorganismen bei einer speziellen Druck- und Temperaturkombination feststellen und faßten die Ergebnisse wie folgt zusammen: Alle Testmikroorganismen werden in der Verdünnungslösung besser abgetötet als in der Schafsmilch mit 0 % Fett. Die Abtötung von *E. coli* wird durch den Fettgehalt in der Schafsmilch nicht beeinflusst. Bei *Staphylococcus aureus* und *Lactobacillus helveticus* wird die Barosensitivität unabhängig von der Fettmenge durch Fett erhöht. Bei *L. innocua* kommt es bei 50 % Fett zu einer geringeren Abtötung als bei 6 % und bei *Pseudomonas fluorescens* wird im Gegensatz dazu die Abtötung durch den höheren Fettgehalt begünstigt.

Als Fazit von den oben angeführten Untersuchungen läßt sich festhalten: Ein vom Lebensmittel ausgehender Schutzeffekt gegenüber einer Hochdruckbehandlung ist nicht nur bei fetthaltigen Lebensmitteln, sondern auch bei nicht fetthaltigen Lebensmitteln, wie Gemüsebrei [OXEN-BODENHAUSEN, 1995] oder Schafsmilch (mit 0 % Fett) [GERVILLA ET AL., 2000] feststellbar. Ob und wie der Fettgehalt die Keimzahlreduzierung beeinflusst hängt von der Mikroorganismenart, von den anderen Lebensmittelbestandteilen, von der Temperatur und vom Druck ab und muß individuell bestimmt werden.

Durch eine Druckbehandlung kommt es neben der Abtötung auch zu einer subletalen Schädigung der Mikroorganismen. Diese können sich bei günstigen Bedingungen wieder regenerieren und zum Verderb des Produktes führen. Andererseits kann ihr Wachstum bei ungünstigen Bedingungen, wie bei einer Kühlagerung oder einem nicht optimalen pH-Wert, unterbunden werden [RADEMACHER, 1999]. Es kann sogar zum Absterben der Mikroorganismen kommen [GÄNZLE ET AL., 2001].

Weil durch Druck die pH-Resistenz von Mikroorganismen beeinflusst wird [KILIMANN, 2005], wurde auch untersucht, ob die *L. innocua*-Zellen durch eine Hochdruckbehandlung bei 500 MPa so stark subletal geschädigt werden, daß sie empfindlicher auf die konservierenden Inhaltsstoffe der Mayonnaise (pH-Wert, Salz- und Zuckergehalt) reagieren und daher während der Lagerung von 24 h bei 7°C verstärkt absterben. Ein erhöhtes Absterben konnte nicht beobachtet werden. Dies zeigt, daß der pH-Wert der Mayonnaise eher eine untergeordnete Rolle bei der Inaktivierung spielt. GÄNZLE ET AL. [2001] dagegen konnten nachweisen, daß für *Lactobacillus plantarum* in Bier eine subletale Schädigung der Zellen ausreichend war, um die Bakterien abzutöten.

Lactobacillus plantarum verlor durch die Hochdruckbehandlung seine Hopfenresistenz, und es kam innerhalb von 24 h zu einer Keimzahlreduktion um fünf Zehnerpotenzen, während bei nicht-druckbehandelten Zellen die Keimzahl konstant blieb [GÄNZLE ET AL., 2001]. Es wird vermutet, daß es sich bei der druckinduzierten Inaktivierung von vegetativen Zellen um einen kontinuierlichen Prozeß handelt, bei dem die Zellen mehrere Stadien unterschiedlich starker Zellschädigung durchlaufen [RADEMACHER, 1999; GÄNZLE, 2002]. Nach RADEMACHER [1999] können diese Zellzustände durch folgende physiologische Reaktionen charakterisiert werden: Bei einer leichten Schädigung („sublethal injury“) findet eine Vermehrung nur unter optimalen Bedingungen statt, die Lag-Phase wird verlängert und es kommt zu Membranschädigungen. Die schwere Schädigung („lethal injury“) ist gekennzeichnet durch den Verlust der Vermehrung selbst unter optimalen Bedingungen, einzelne physiologische Funktionen, z. B. die Säurebildung, bleiben noch vorhanden.

Einfluß von Konservierungsstoffen

Durch die Zugabe von 0,2 % des Konservierungsstoffes Natriumbenzoat konnte die Inaktivierung von Mikroorganismen in Mayonnaise nicht verbessert werden. Die lebensmittelrechtlich zulässige Menge liegt für Mayonnaise bei maximal 0,15 % Benzoesäure (nach der Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken). Natriumbenzoat ist das Alkalisalz der Benzoesäure. Der Angriffspunkt der Benzoesäure ist zum einen die Zellwand, zum anderen die Enzyme des Citratzyklus (α -Ketoglutaräuredehydrogenase, Bernsteinsäuredehydrogenase) und der Phosphorylierung [BELITZ UND GROSCH, 1992]. Auch die Hochdruckbehandlung wirkt vorwiegend auf die Zellwand und Enzyme. Da nur eine einzige Konservierungsstoffkonzentration, kombiniert mit einer Druckhöhe von 500 MPa getestet wurde, ist es nicht möglich generelle Aussagen zu treffen, ob synergistische Effekte durch den Einsatz von klassischen Konservierungsstoffen bei der Hochdruckbehandlung von Mayonnaise erzielt werden können, wie es bei der thermischen Behandlung der Fall ist [CERNY UND HENNLICH, 1983].

Über die Wirkung von klassischen Konservierungsstoffen in Kombination mit Hochdruck ist nur wenig bekannt. Durch den Zusatz von 0,25 % Natriumsulfit konnte OXEN-BODENHAUSEN [1995] die Abtötung von *E. coli* in Ringerlösung steigern. Es existieren einige Publikationen über synergistische Effekte bei der Hochdruckbehandlung mit verschiedenen, antimikrobiell wirkenden Proteinbestandteilen. Zum Beispiel wird eine verbesserte Abtötung durch die Zugabe von Nisin [PONCE ET AL., 1998; TER STEEG ET AL., 1999], Pediocin [KALCHAYANAND ET AL., 1998] oder durch die Kombination von Bakteriocinen [ALPAS UND BOZOGLU, 2000] sowie durch Lysozym [OXEN-BODENHAUSEN, 1995; MASSHALCK ET AL., 2001] und dem Lactoperoxidase-System [GRACIA-GRALLS ET AL., 2000] erreicht. Des weiteren wird durch Chitosan [PAPINEAU ET AL., 1991] oder Wasserstoffperoxid [ISIKER ET AL., 2003] die Hochdruckwirkung unterstützt.

5.4.4 Strukturelle Veränderungen durch Hochdruck

Die Effekte einer Hochdruckbehandlung auf Lebensmittel sind vielfältig. Es werden unter hohem Druck solche Reaktionen gefördert, die mit einer Volumenabnahme verbunden sind, wie zum Beispiel Dissoziationsvorgänge, Ringbildung, Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen oder Bildung von hydrophoben Bindungen. Die Druckbehandlung allein ist aber nicht in der Lage kovalente Bindungen zu spalten, jedoch können chemische Reaktionen (z. B. auch Bindungsspaltungen) durch Druck beschleunigt oder verlangsamt werden [PISTER ET AL., 2000].

Fette und Öle

Es kommt während einer Hochdruckbehandlung bei Fetten zu reversiblen Veränderungen der Phasenübergangstemperatur (Schmelzpunkt steigt) und dem Kristallisationsverhalten. Fett kristallisiert unter Hochdruck, weil das spezifische Volumen von kristallisiertem Fett kleiner ist als dasjenige von flüssigem. β -Kristalle werden bevorzugt vor β' - und α -Kristallen gebildet, da diese eine dichtere und stabilere Kristallstruktur besitzen [CHEFTEL, 1992]. Die kompressionsbedingte Erwärmung von Fetten hängt von der Art und von der Ausgangstemperatur des Fettes ab. Bei Raumtemperatur und einer Druckbehandlung von 100 MPa kommt es z. B. bei Stearinsäure zu einer Erwärmung um 6,4 K, bei Rapsöl um 8,5 K, bei Kokosnußfett um 10,8 K [BUCHHEIM ET AL., 1999]. Für Olivenöl und Sojaöl wurde eine Temperaturerhöhung um ca. 8 K pro 100 MPa von RASANAYAGAM ET AL. [2003] bestimmt. Die Erwärmung von Fetten ist somit bedeutend höher als jene von Wasser (ca. 2 – 3 K pro 100 MPa) [RASANAYAGAM ET AL., 2003].

Auch irreversible Veränderungen treten auf. Eine Hochdruckbehandlung kann die Autoxidation von reinen Ölen und Fetten verhindern, aber auch begünstigen. Denn durch hohe Drücke wird zum einen die Radikalisierung neuer Moleküle unterbunden, zum andern werden jedoch die Folgereaktionen bei der Oxidation von Fetten beschleunigt. In einer Studie von SEVERINI ET AL.* [zitiert nach PISTER ET AL., 2000] wies druckbehandeltes Olivenöl eine verkürzte Induktionszeit der Fettoxidation, dagegen Soja- und Maiskeimöl eine verlängerte Induktionszeit auf. Jedoch wurden in Sojaöl durch eine Hitzebehandlung (120°C, 10 min) mehr sekundäre Oxidationsprodukte gebildet als durch eine Hochdruckbehandlung (700 MPa, 10 min).

Während der Lagerung kann die Autoxidation der Lipide bei druckbehandelten, fetthaltigen Lebensmitteln stärker ansteigen als bei konventionell hergestellten Lebensmitteln [PISTER ET AL., 2000].

Die Druckbehandlung von Ölen, Fetten und fetthaltigen Lebensmitteln hat somit sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf die Haltbarkeit.

* Literaturquelle auf italienisch: High pressure effects on lipid oxidation of extra virgin olive oils and seed oils. Italian Journal of Food Science, 9 (1997) 3, 183-191

Emulsionen

Durch die Hochdruckbehandlung kommt es zur Koaleszenz der Fetttröpfchen in der Mayonnaise und es scheint, daß die Fetttröpfchen dichter gepackt sind (vgl. Abb. 4-22, S. 69). Auch steigt die dynamische Viskosität an. Eine Hochdruckbehandlung von 15 min bei 500 MPa verursacht dabei einen stärkeren Anstieg der Viskosität als eine Hitzebehandlung bei 60°C für 30 min. Die stabilere Struktur wird möglicherweise durch die Denaturierung und Vernetzung der im Eigelb vorhandenen Proteine verursacht. Eine Phasentrennung konnte bei den geringen Mengen an Mayonnaise (pro Tube ca. 1,7 ml) visuell nicht festgestellt werden. Es scheint, daß Mayonnaise eine Druckbehandlung bei 500 MPa für 15 min übersteht.

Emulsionen können je nach Zusammensetzung weit höheren Drücken standhalten. Nach SIMPSON UND GILMOUR [1997] sind O/W-Emulsionen mit 30 % Olivenöl und 0,75 % Lezithin nach 30 min bei 900 MPa immer noch stabil. Die Stabilität wird nach KARBSTEIN ET AL. [1992] vom pH-Wert der Emulsion beeinflusst: O/W-Emulsionen mit 20 % Sojaöl sind bei einem pH-Wert größer als 4 und einem Druck von 600 MPa sowie einer Temperatur von 40°C stabil, Emulsionen mit einem niedrigeren pH-Wert brechen hingegen bei hohen Drücken. Allerdings wird durch einen niedrigen pH-Wert die Inaktivierung von Mikroorganismen gefördert, d. h. zur Inaktivierung von sauren Emulsionen sind geringere Drücke notwendig als für neutrale.

Die Denaturierung von Proteinen in Lebensmitteln bei gleichem mikrobiologischen Abtötungseffekt kann vermindert werden, wenn mehrere Hochdruckbehandlungen nacheinander bei niedrigem Druck und kurzer Haltezeit durchgeführt werden, statt einer Behandlung mit hohem Druck und längerer Haltezeit [HOMMA UND HAGA, 1991]. Eventuell ist das Hintereinanderschalten von mehreren Hochdruckzyklen bei niedrigem Druck eine Möglichkeit, um zu starke strukturelle Veränderungen in der Mayonnaise zu vermeiden.

5.4.5 Vergleich zwischen der thermischen Behandlung und der Hochdruckbehandlung

Die Hochdruckbehandlung wird auch als „kalte Pasteurisation“ bezeichnet, da im Unterschied zu konventionellen Pasteurisations- und Sterilisationsverfahren nur eine geringe Erwärmung stattfindet. Es kommt aber gerade bei der Inaktivierung von Bakteriensporen zur Kombination beider Verfahren, um den Abtötungseffekt zu verstärken. Vergleicht man beide Verfahren miteinander, können neben Unterschieden auch Parallelen festgestellt werden.

Inaktivierung von Mikroorganismen

Die Abtötungskinetiken sowohl der Erhitzungsversuche als auch der Hochdruckversuche verlaufen nicht immer exponentiell. Dies könnte in beiden Fällen an den vielschichtigen Inaktivierungsmechanismen liegen [vgl. Kap. 2.3.1 und 2.3.2]. Für beide Verfahren existiert kein ein-

heitlicher Angriffspunkt. Die abtötende Wirkung beruht auf dem Zusammenspiel von verschiedenen Mechanismen. Als Primärursache für die Inaktivierung wird bei der thermischen Abtötung die Schädigung der DNA sowie die Denaturierung von Enzymen und anderen Proteinen angenommen, bei der Hochdruckbehandlung vornehmlich Veränderungen an der Cytoplasmamembran: Es kommt zur Schädigung der Phospholipiddoppelschicht und der membrangebundenen Enzyme. Auch wird bei beiden Verfahren die abtötende Wirkung entscheidend von der Zusammensetzung des Umgebungsmediums beeinflusst. Lebensmittelinhaltsstoffe können dabei als Protektiva wirken (z. B. Fette, Proteine, Kohlenhydrate, Kochsalz und Saccharose in molaren Konzentrationen). Eng verbunden mit der Zusammensetzung eines Produktes ist der a_w -Wert. Für beide Konservierungsverfahren gilt: Je niedriger der a_w -Wert bzw. der Wassergehalt ist, desto schlechter fällt die Abtötung von Mikroorganismen aus. Dies wurde bei der Pasteurisation des Öls und der Mayonnaise deutlich. Vergleicht man die Inaktivierungsergebnisse in Wasser und in Mayonnaise, welche mit Hitze und Druck behandelt wurden, so kann gefolgert werden, daß wahrscheinlich von Fetten und Ölen bei der Hochdruckinaktivierung eine noch stärkere Schutzwirkung ausgeht als bei der thermischen Behandlung. Bei *L. innocua* wurde zwar keine verbesserte Abtötung durch Hitze bestimmt aber für *Lc. lactis*. So entspricht bei *Lc. lactis* in wäßriger Lösung eine Erhitzung auf 60°C einer Hochdruckbehandlung bei 300 MPa, da in beiden Fällen nach 5 min keine Laktokokken mehr nachweisbar waren. Für Mayonnaise gilt bei entsprechender Temperatur- (60°C, 15 min) und Druckbehandlung (300 MPa, 15 min) folgendes: Durch die Erhitzung konnten vegetative Bakterien um dreieinhalb Zehnerpotenzen und durch die Hochdruckbehandlung um zwei Zehnerpotenzen abgetötet werden.

Zur Absicherung vorangegangener Vermutung sollten aber noch weitere Versuche mit anderen Mikroorganismen und unterschiedlichen Drücken und Haltezeiten durchgeführt werden.

Nach FRANKE ET AL. [1993] können Lebensmittel mit Wassergehalten unter 25 % und a_w -Werten unter 0,86 nur noch mit sehr geringem Erfolg, meist aber gar nicht mehr durch Hochdruck entkeimt werden.

Erklärt wird die erhöhte Druckresistenz bei herabgesetzter Wasseraktivität durch verschiedene Ansatzpunkte. Nach KNORR [1995] erreichen vegetative Zellen bei einem a_w -Wert nahe 0,9 einen sogenannten Ruhezustand („dormant state“) und sind durch Modifikationen an der Zellmembran druckresistenter. Auch kommt es zu einer Verminderung der Stoffwechselaktivität der Zelle, da bei vielen biochemischen Prozessen Wasser als Transportmittel dient. Durch die verringerte Stoffwechsellätigkeit wird die Druckresistenz erhöht [OXEN-BODENHAUSEN, 1995]. Ähnliches gilt auch für Zellen aus der stationären Wachstumsphase, die ebenfalls eine erhöhte Barotoleranz aufweisen als Zellen aus der exponentiellen Phase. PALOU ET AL. [1997] vertreten die Theorie, daß durch Wasserabgabe und der damit verbundenen Schrumpfung der Zelle eine dickere Zellwand entsteht. Eine Möglichkeit der a_w -Wert-Erniedrigung ist die Zugabe von osmotischaktiven Substanzen. Bei gleichem a_w -Wert geht bei der thermischen Inaktivierung von Zucker eine

höhere Schutzwirkung aus als von Salz [CERNY, 1986]. Durch Saccharose kommt es zur Ausbildung einer schützenden Hydrathülle um die Proteine und der D/H-Austausch (= „deuteriumhydrogen“ Austausch) sowie der Übergang des Ordnungsgrades der Proteine von strukturiert zu unstrukturiert wird verzögert [PECHER, 1989; PECHER UND CERNY, 1989; KILIMANN, 2005]. Auch bei der Hochdruckinaktivierung wird bei gleicher Wasseraktivität die Abtötungsreaktion durch Zucker stärker beeinflusst als durch die Anwesenheit von NaCl [RADEMACHER, 1999; MOLINA-HÖPPER, 2002]. Nach FUJII ET AL. [1996] wird durch Zucker die Denaturierung von Proteinen verzögert, da es zu einer Änderung der intermolekularen Struktur von Wasser durch Anlagerung und Strukturausbildung an den OH-Gruppen der Zucker kommt. Dadurch werden Makromoleküle und Membranen stabilisiert. Die Phasenübergangstemperatur der Membranen wird herabgesetzt. Die intrazelluläre Anreicherung von Saccharose schützt die metabolischen Enzyme und Membranlipide [MOLINA-HÖPPER, 2002]. Nach MOLINA-HÖPPER [2002] wirkt Saccharose protektiv auf die Stoffwechselaktivität, die Membranintegrität und die Aktivität des membrangebundenen Enzyms LmrP. Die Wirkung der einzelnen Zucker ist bei der Hochdruckbehandlung unterschiedlich [RADEMACHER, 1999]. So legten FUJII ET AL. [1996], welche die Wirkung von Zucker auf die Druckstabilität von *S. cerevisiae* untersuchten, folgende Rangordnung beginnend mit dem Zucker, der den geringsten Einfluß ausübt, fest: Fructose, Galactose, Glucose, Saccharose, Trehalose.

Kochsalz soll, auf ähnliche Weise wie Zucker, die Anordnung der Wassermoleküle und damit die Druckdenaturierung von Eiweißen beeinflussen [RADEMACHER, 1999]. Nach MOLINA-HÖPPER [2002] beruhen die baroprotektiven Effekte von NaCl auf der Akkumulation von Laktose und unbekanntem Bestandteilen des Milchpulvers („compatible solutes“). Durch Zugabe von Glycinbetain zu Milchpulver konnte die Schutzwirkung von NaCl gesteigert werden. NaCl besitzt anders als Saccharose keine schützende Wirkung auf die Stoffwechsel- und die LmrP-Aktivität [MOLINA-HÖPPER, 2002].

Beeinflussung der Inhaltstoffe und der Struktur von Lebensmitteln

Grundsätzlich zeigen hochdruckinduzierte Veränderungen an Biomolekülen gewisse makroskopische Parallelen mit thermisch induzierten Veränderungen, auf molekularer Ebene sind sie jedoch oft unterschiedlich und neuartig [SCHEIBENZUBER, 2003].

Vorteile der Hochdruckbehandlung sind die geringen unerwünschten Veränderungen im Produkt, wie Vitaminverluste, Verringerung der Bioverfügbarkeit von essentiellen Aminosäuren, Aromaverluste, Geschmacks- und Farbveränderungen [PFISTER ET AL., 2000]. Die mögliche Entstehung eines Fehlgeschmacks, der bei der thermischen Behandlung auftritt, wird verhindert. Die Lebensmittel behalten weitgehend ihren natürlichen Geschmack. Auch bleibt die natürliche Funktionalität, hervorgerufen durch sekundäre Inhaltsstoffe mit antimutagenen und antioxidativen Eigenschaften, bestehen [FERNANDEZ GARCIA ET AL., 2001; BUTZ ET AL., 2002; BUTZ ET AL., 2003].

Bei der Hochdruckbehandlung von proteinreichen Produkten kann es durch Proteindenaturierung zur Verfestigung oder zur Entfärbung kommen (wie z. B. bei Schweinefleisch), im Vergleich zu der thermischen Behandlung sind diese Veränderungen aber sehr gering [FRANKE ET AL., 1993]. Diese druckbehandelten Proteine werden oft leichter durch proteolytische Enzyme abgebaut als die jeweiligen Roh-Proteine oder die thermisch denaturierten Proteine [PFISTER ET AL., 2000]. Da Proteine durch Druck in einem geringeren Ausmaß denaturiert werden, gehen PFISTER ET AL. [2000] davon aus, daß das allergene Potential von druckbehandelten Produkten tendenziell zwischen der von nativen und thermisch behandelten Lebensmitteln liegt. Nach SCHEIBENZUBER [2003] können durch eine Hochdruckbehandlung bei 100 MPa die allergischen Reaktionen von Äpfeln deutlich gesenkt werden, und es wird eine verbesserte Verträglichkeit im Vergleich zu rohen Äpfeln erzeugt. Auch trat bei keiner Testperson eine verstärkte Reaktion auf das hochdruckbehandelte Lebensmittel auf, d. h. das allergene Potential wurde durch eine Druckbehandlung nicht erhöht.

Die Veränderungen an Makromolekülen können auch gezielt genutzt werden, um neuartige Strukturen und Produkte zu erzeugen. Es wäre denkbar, daß bei mayonnaiseartigen Produkten mit niedrigem Fettgehalt aufgrund von Strukturveränderungen auf den Einsatz von Stabilisatoren verzichtet werden kann. Weil hydrostatischer Druck ohne Zeitverzögerung und homogen wirkt, läßt sich durch eine Hochdruckanwendung eine gleichmäßigere Behandlung des Lebensmittels realisieren als durch herkömmliche thermische Verfahren [FÖRST, 2001].

Relevanz für die industrielle Praxis

Die Kosten für eine Hochdruckanlage sind im Vergleich zu konventionellen, thermischen Verarbeitungsanlagen verhältnismäßig hoch [FRANKE ET AL., 1993]. Auch besitzen Hochdruckanlagen eine hohe Störanfälligkeit wegen der extremen Materialbeanspruchung. Die Betriebs- und Energiekosten einer Hochdruckanlage sind jedoch gering. Der Energiebedarf wird weitgehend durch den Druckaufbau und die damit einhergehende Kompression des Produktes bestimmt. Vergleicht man den Energiebedarf für den Druckaufbau mit dem der thermischen Behandlung, so entspricht z. B. die Kompression von 1 kg Wasser auf 800 MPa einer Temperaturerhöhung um ca. 13 K [FÖRST, 2001].

Bei der Inaktivierung von vegetativen Bakterien in Mayonnaisen scheint die thermische Behandlung geringfügig effektiver zu sein als die Behandlung mit Hochdruck. Daher ist die Inaktivierung von Mayonnaise durch Hochdruck nur interessant, wenn durch die Behandlung mit Druck weitere positive Effekte erreicht werden, wie zum Beispiel ein besseres „Mundgefühl“ durch eine veränderte Konsistenz der Mayonnaise oder eine Erhaltung des Gehalts an ernährungsphysiologisch wichtigen Inhaltsstoffen. Allerdings neigen Mayonnaisen auf Eigelbbasis bei zu starker Pasteurisation (> 70°C) zum Brechen der Emulsion [CERNY UND HENNLICH, 1983], was bei der Hchdruckbehandlung weitgehend verhindert werden kann.

6 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY

Zusammenfassung

Die Inaktivierung von Mikroorganismen zur Haltbarmachung von Lebensmitteln wird durch zahlreiche endo- und exogene Faktoren beeinflusst. Zu letzteren zählt unter anderem die chemische Zusammensetzung des Umgebungsmediums. Vielfach nachgewiesen ist die protektive Wirkung von Fetten und Ölen. Dabei müssen die Mikroorganismen in die Ölphase gelangen, wobei die Hydrophobizität der Zelloberfläche eine ausschlaggebende Rolle spielt.

Die Hydrophobizität der Zelloberfläche wurde durch die Kontaktwinkelmessung und den MATH-Test bestimmt und mit den Ergebnissen der Verteilungsversuche in O/W-Emulsionen verglichen. Eine eindeutige Beziehung zwischen der mit dem MATH-Test bestimmten Hydrophobizität und der Verteilung der Mikroorganismen in Emulsionen konnte nicht festgestellt werden. Da sich eine Kontaktwinkelmessung in dieser Arbeit nur bei drei Mikroorganismen durchführen ließ, kann diese Methode auch nicht generell zur Bestimmung der tatsächlichen Verteilung von Mikroorganismen in den Phasen der Emulsionen herangezogen werden.

Um ein besseres Verständnis für die schützende Funktion von Lipiden zu bekommen, wurde zunächst bei verschiedenen Mikroorganismen deshalb deren Verteilung in O/W-Emulsionen und W/O-Emulsionen ohne Emulgator bei gleichem Wasser- und Ölanteil untersucht. Hierzu wurde eine neue Methode erarbeitet. Die Schimmelpilzkonidien von *Aspergillus niger* und *Penicillium glabrum* sowie die Sporen von *Bacillus subtilis* befanden sich verstärkt in der Ölphase. Bei den Sporen von *Alicyclobacillus acidoterrestris* und *Bacillus stearothermophilus* sowie den Zellen von *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Lactococcus lactis*, *Pichia anomala* und *Saccharomyces cerevisiae* wurde mehr als die Hälfte in der Wasserphase wiedergefunden. Dies galt für beide Emulsionstypen. Es hatte jedoch den Anschein, daß bei den W/O-Emulsionen der Übergang ins Öl geringfügig erschwert war. Für einzelne Mikroorganismenarten wurden noch weitere Einflußfaktoren bei der Verteilung in O/W-Emulsionen untersucht. Durch den Zusatz von Natriumdodecylsulfat als Emulgator wurde das Verteilungsverhältnis nur geringfügig verändert. Die Wachstumsphase (stationär oder exponentiell) und die Ölsorte (Sonnenblumen-, Raps-, und Olivenöl) hatten ebenfalls nur einen geringen Einfluß auf die Verteilung der Mikroorganismen. Durch die Erhöhung der Elektrolytkonzentration in der Wasserphase wurde der Übergang von *Escherichia coli* in die Ölphase deutlich begünstigt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde am Beispiel von Mayonnaise die Auswirkungen eines hohen Ölanteils bei der Lagerung und Haltbarmachung von Lebensmitteln untersucht. Zuerst wurde die Lagerstabilität der Mikroorganismen in Sonnenblumenöl und Mayonnaise bei 7°C bestimmt. *Listeria innocua* wies in Sonnenblumenöl eine ähnliche Lagerstabilität wie in Phosphatpuffer auf. In reinen Sonnenblumenöl überlebten mehr Listerien als in der Mayonnaise. Bei *Lactococcus*

lactis entsprach die Überlebensrate in diesem Öl derjenigen von Mayonnaise und lag unter derjenigen von Phosphatpuffer. Bei *Aspergillus niger* konnte innerhalb von 35 Tagen (Versuchsdauer) kein Rückgang der Keimzahl in Mayonnaise und Sonnenblumenöl festgestellt werden.

Für die Inaktivierung von *Listeria innocua* und *Lactococcus lactis* in wäßriger Lösung, Mayonnaise und Sonnenblumenöl durch Hitze und Druck wurde folgendes festgestellt: Die thermische Inaktivierung in Mayonnaise verläuft deutlich langsamer als in Phosphatpuffer und schneller als in Sonnenblumenöl. Bei höheren Temperaturen (um 60°C) kam es in der Mayonnaise zur Ausbildung eines Stagnationsplateaus. Für *Listeria innocua* konnten geringe Unterschiede in der Abtötung aufgrund der Ölsorte (Sonnenblumenöl, Rapsöl und Olivenöl) festgestellt werden. Durch die Zugabe von Ölsäure, Caprinsäure und Monolaurin als natürliche Konservierungsstoffe in Konzentrationen bis zu 2 % wurde die Hitzeabtötung der Mikroorganismen in Mayonnaise nicht verbessert. Von Ölsäure ging sogar eine geringe Schutzwirkung aus.

Auch bei der Hochdruckbehandlung fand in Phosphatpuffer eine bessere Abtötung als in Mayonnaise statt. In Sonnenblumenöl konnte nur eine sehr geringe Abtötung bestimmt werden. Bei einem Druck von 500 MPa kam es bei beiden Bakterienarten innerhalb von 15 min zu einer Reduzierung der Keimzahl um eine halbe Zehnerpotenz. Durch eine Druckerhöhung auf 800 MPa konnte in Sonnenblumenöl, allein durch den Druckauf- und Druckabbau, keine signifikante Verbesserung in der Abtötung festgestellt werden.

In Mayonnaise kam es für beide Bakterien zur Ausbildung eines Stagnationsplateaus. Bei einem Druck von 500 MPa und einer Haltezeit von 15 min reduzierte sich die Keimzahl von *Listeria innocua* um zwei Zehnerpotenzen, bei *Lactococcus lactis* innerhalb von 5 min um mehr als sechs Zehnerpotenzen. Durch den Zusatz von 0,2 % Natriumbenzoat zur Mayonnaise konnte bei einem Druck von 500 MPa innerhalb von 15 min die Inaktivierung von *Listeria innocua* nicht verbessert werden. Es wurde auch die Lagerstabilität von *Listeria innocua* in Mayonnaise nach einer Hochdruckbehandlung bei 500 MPa untersucht. Die *Listeria innocua*-Zellen reagierten nicht empfindlicher auf die konservierend wirkenden Inhaltsstoffe der Mayonnaise, da bei einer anschließenden Lagerung von 24 h kein verstärktes Absterben auftrat.

Es kam sowohl bei der erhitzten als auch bei der hochdruckbehandelten Mayonnaise zu strukturellen Veränderungen.

Es scheint, daß zur Haltbarmachung von Mayonnaise eine thermische Behandlung effektiver ist als die Behandlung mit Hochdruck. Dies muß aber noch an weiteren Mikroorganismen und bei verlängerter Druckhaltezeit überprüft werden. Bei beiden Verfahren hat der hohe Ölanteil und der niedrige a_w -Wert einen entscheidenden Einfluß auf die Inaktivierung von Mikroorganismen. Die Hochdruckbehandlung bietet somit bezüglich der Keimzahlreduzierung in Mayonnaise keinen Vorteil gegenüber der thermischen Behandlung, möglicherweise aber eine bessere Qualitätserhaltung.

Summary

The inactivation of microorganisms for preservation of foodstuffs is influenced by many endo- and exogenous factors. Among the exogenic factors the chemical composition of the medium plays significant role. The protective effects of fat and oil are well known. The microorganisms must enter the oil phase, whereby the hydrophobicity of the microbial surface plays a major part.

The hydrophobicity of the microbial surface was determined by contact angle measurement and the MATH-test (microbial adhesion to hydrocarbons test) and compared with the results of the dispersion experiments in oil-in-water-emulsions. A significant relation between the hydrophobicity determined by the MATH-test and the distribution of microorganisms in emulsions could not be established. Since the contact angle measurement could only be performed for three microorganisms, this method cannot be used generally to determine the actual distribution in the emulsions.

For a better understanding of the protective effect of lipids, the distribution of different microorganisms in oil-in-water and water-in-oil emulsions was first tested without addition of emulsifying agents at a water to oil ratio of 1:1. For this purpose a new method was developed. The conidia of *Aspergillus niger* and *Penicillium glabrum* and the spores of *Bacillus subtilis* were mainly found in the oil phase. The spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Bacillus stearothermophilus* as well as the cells of *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Lactococcus lactis*, *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae* dominated the water phase. Similar results were determined in oil-in-water as well as in water-in-oil-emulsions. In the water-in-oil emulsions the migration of microbes into the oil appeared, however slightly reduced. For some kinds of microorganisms further factors influencing the distribution in oil-in-water emulsions were tested. Addition of the emulsifying agent sodiumlaurylsulfate led only to a minor change in the distribution ratio. The growth phase (stationary or log-phase) and the type of oil (sunflower, rapeseed, olive) influenced only slightly the distribution of the microorganisms between the phases. By increasing the concentration of electrolytes in the water phase the shift of *Escherichia coli* into the oil phase was significantly intensified.

The second part of the thesis presents the effects of oil on the storage and preservation of foodstuffs shown by the example of mayonnaise. The survival of different microorganisms in sunflower oil and in mayonnaise was determined at a storage temperature of 7°C. The viability of *Listeria innocua* in sunflower oil was similar to those in phosphate buffer. *Listeria* survived in sunflower oil to a higher amount compared with mayonnaise. The survival rate of *Lactococcus lactis* in oil was the same as in mayonnaise, but appeared lower if compared with phosphate buffer. Within 35 days (time of experiment) no reduction in the cell counts of *Aspergillus niger* could be detected, both in mayonnaise and sunflower oil.

The inactivation of *Listeria innocua* and *Lactococcus lactis* in water solutions, mayonnaise and sunflower oil by heat and by high pressure treatments showed the following results:

Inactivation in mayonnaise due to heat was significantly slower than in phosphate buffer but faster than in sunflower oil. At higher temperatures (about 60°C) the rate of destruction of the microorganisms stagnated at distinct levels in case of mayonnaise. A slight difference in the destruction of *Listeria innocua* could be detected dependent on the type of oil (sunflower, rapeseed, olive). The addition of oleic acid, capric acid and monolaurin, which act as natural preservation agents, up to concentrations of 2 % did not enhance on the thermal reduction of microorganisms. In contrast, oleic acid was even found to exert some protective effect.

Similar to the results shown above, high pressure treatment of microorganisms was more effective in phosphate buffer than in mayonnaise. In sunflower oil only tiny destructive effects could be noticed at 500 MPa. The cell counts of both bacteria species were reduced by half a log cycle within 15 min in sunflower oil. A further increase in pressure up to 800 MPa in sunflower oil did not result in improved lowering of cell counts as a result of pressure build-up and release without holding time. The high pressure treatment in mayonnaise resulted in tailing inactivation curves for both microorganisms. Microbial counts of *Listeria innocua* were reduced by 2 log cycles after 15 min of pressure treatment at 500 MPa and the counts of *Lactococcus lactis* by more than 6 log cycles after 5 min respectively. Addition of 0,2 % sodium benzoate to mayonnaise did not stimulate high pressure inactivation of *Listeria innocua*. Moreover the viability of *Listeria innocua* in mayonnaise after high pressure treatment survival at 500 MPa was examined: The cells were not obstructed by constituents of the mayonnaise during a following storage for 24 h at 7°C.

The emulsion structure of mayonnaise was changed after both thermal and high pressure treatment, resulting in oil droplet diameter increase.

It may be concluded that microbial stabilisation of mayonnaises by thermal treatment is more effective than high pressure treatment. Further tests including other microorganisms and longer pressure holding times would be necessary. But both preservation methods were significantly influenced by the high amount of oil and the low water activity. In conclusion, the high pressure treatment might not result in a better microbial inactivation compared with traditional pasteurisation but might offer better quality preservation.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Ababouch, L. H.; Gritmit, L.; Eddafry, R.; Busta, F. F.: Thermal inactivation kinetics of *Bacillus subtilis* spores suspended in buffer and in oils. *J. Appl. Bacteriol.*, 78 (1995) 6, 669 – 676.

Ababouch, L.; Dirka, A.; Busta, F. F.: Thermal survivor curves of clostridial spores heated in edible oils. *J. Appl. Bacteriol.*, 62 (1987), 503 – 511.

Abraham, W.-R.; Meyer, H.; Yakimov, M.: Novel glycine containing glucolipida from the alkane using bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1393 (1998), 57 - 62.

Ahimou, F.; Paquot, A.; Jacques, P.; Thonart, P.; Rouxhet, P. G.: Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Methods*, 45 (2001), 199 – 126.

Alpas, H. and Bozoglu, F.: The combined effect of high hydrostatic pressure, heat and bacteriocins on inactivation of foodborne pathogens in milk and orange juice. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 16 (2000) 4, 387 - 392.

Andersson A.; Rönner, U.: Adhesion and removal of dormant heat-activated, and germinated spores of three strains of *Bacillus cereus*. *Biofouling*, 13 (1998) 1, 51 – 67.

Andersson A.; Rönner, U.; Granum, P. E.: What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *Int. J. Food Microbiol.*, 28 (1995), 145 - 155.

Archibald, A. R.; Hancock, I. C.; Harwood, C. R.: *Bacillus subtilis* an other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. ASM Press, Washington DC, 1993.

Bast, E. (Hrsg): Mikrobiologische Methoden. Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg und Berlin, 2001.

Baumgart, J.; Weber, B.; Hanekamp, B.: Mikrobiologische Stabilität von Fleischerzeugnissen. *Fleischwirts.*, 63 (1983) 1, 93 – 94.

Baumgart, J.: Öle, Fette und fettreiche Lebensmittel. In: Müller, G.; Holzappel, W.; Weber, H. (Hrsg.): *Lebensmittel pflanzlicher Herkunft*, Behrs` Verlag, Hamburg, 1997, 357 – 369.

Baumgart, J. (Hrsg): Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Behr´s Verlag, Hamburg, 1990.

Belitz, H.-D.; Grosch, W.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 4. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1992.

Bellon-Fontaine, M.-N.; Rault, J.; Van Oss, C. J.: Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron donor/electron acceptor a Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 7 (1996), 47 – 53.

Bergsson, G.; Arnfinnsson, J.; Steingrimsson, O.; Thormar, H.: In Vitro Killing of *Candida albicans* by Fatty Acids and Monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (2001), 3209 – 3212.

Bockisch, M.: Handbuch der Lebensmitteltechnologie, Nahrungsfette und -öle, Ulmer Verlag, Stuttgart, 1993, 76 – 215.

Brocklehurst, T. F.; Parker, M. L.; Gunning, P. A.; Coleman H. P.; Robins M. M.: Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsion: II – Effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth. *J. Appl. Bact.*, 78 (1995), 609 – 615.

Brocklehurst, T. F.; Parker, M. L.; Gunning, P. A.; Robins M. M.: FEATURE Microbiology of food emulsions: physiochemical aspects. *Lipid Technology*, 78 (1993), 83 – 88.

Bröker, U.; Spicher, G.; Ahrens, E.: Zur Frage der Hitzeresistenz der Erreger der Schimmelbildung von Backwaren. *Getreide Mehl und Brot*, 41 (1987) 11, 344 – 351.

Buchheim, W.; Frede, E.; Wolf, M.; Baldenegger, P.: Solidification and Melting of Some Edible Fats and Model Lipid Systems Under Pressure. In: Ludwig, H. (Hrsg.): *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1999, 153 – 156.

Bunt, C. R.; Jones, D. S.; Tucker, I. G.: The effects of pH, ionic strength and organic phase on the bacterial adhesion to hydrocarbons (BATH) test. *Int. J. Pharmaceutics*, 99 (1993), 93 - 98.

Butz, P.; Edenharter, R.; Fernandez Garcia, A.; Fister, H.; Merkel, C.; Tauscher, B.: Changes in functional properties of vegetables induced by high pressure treatment. *Food Research International*, 35 (2002) 2-3, 295 - 300.

Butz, P.; Fernandez Garcia, A.; Lindauer, R.; Dieterich, S.; Bogner, A.; Tauscher, B.: Influence of ultra high pressure processing on fruit and vegetable products. *Journal of Food Engineering*, 56 (2003) 2-3, 233 - 236.

Carlez, A.; Rosec, J.-P.; Richard, N.; Cheftel, J.-C.: High Pressure Inactivation of *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* in Inoculated Minced Beef Muscle. *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.*, 26 (1993), 357 – 363.

Cerny, G.: Abhängigkeit der thermischen Abtötung von Mikroorganismen vom pH-Wert der Medien. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 170 (1980), 170 – 179.

Cerny, G.: Mikrobielle Haltbarkeit von Fleischsalat bei Raumtemperatur. 1. Teil: Untersuchungen zur stabilisierenden Wirkung von Konservierungsstoffen. *ZFL*, 34 (1983a) 6, 506 – 510.

Cerny, G.: Mikrobielle Haltbarkeit von Fleischsalat bei Raumtemperatur. 3. Teil: Pasteurisieren von Fleischsalat im Ultraschall bzw. unter Verwendung hitzestabiler Emulatoren und Stabilisatoren. *ZFL*, 34 (1983b) 8, 700 – 704.

Cerny, G.; Fink, A.: Untersuchungen zur Abhängigkeit der thermischen Abtötung von Mikroorganismen von Viskosität und Wasseraktivität der Erhitzungsmediums. *ZFL*, 37 (1986) 2, 110 – 115.

Cerny, G.; Hennlich, W.: Mikrobielle Haltbarkeit von Fleischsalat bei Raumtemperatur. 2. Teil: Pasteurisieren hitzeempfindlicher Mayonnaisen unter vorheriger Konservierungsstoffzugabe. *ZFL*, 34 (1983) 7, 610 - 616.

Cheftel, J. C.: Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology International*, (1995) 1, 75 – 90.

Cheftel, J.-C.: Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: An overview. In: Balny, C.; Hayashi, R.; Heremans, K.; Masson, P.: *High Pressure and Biotechnology*. John Libbey Eurotext, Montrouge, 1992, 195 – 206.

- Chilton, P.; Isaacs, N. S.; Mackey, B.; Stenning, R.:** The Effects of high hydrostatic pressure on bacteria. In: Heremans, K. (Hrsg.): High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology. Leuven University Press, Leuven, 1997, 225 – 228.
- Daffonchio, D.; Thaveesri, J.; Verstraete, W.:** Contact angle measurement and cell hydrophobicity of granular sludge from upflow anaerobic sludge bed reactors. Appl. Environ. Microbiol., 61 (1995), 3676 – 3680.
- Dickson, J.; Koochmaraie, M.:** Cell surface charge characteristics and their relationships to bacterial attachment to meat surfaces. Appl. Environ. Microbiol., 55 (1989) 4, 832 – 836.
- Donlon, B. Colleran, E.:** A comparison of different methods to determine the hydrophobicity of acetogenic bacteria. J. Microbiol. Methods, 17 (1993), 27 – 37.
- Doyle, R. J., Rosenberg, M. (Hrsg):** Microbial Cell Surface Hydrophobicity. American Society for Microbiology, Washington, 1990.
- Doyle, R. J.; Rosenberg, M.:** Measurement of Microbial Adhesion to Hydrophobic Substrata. Methods in Enzymology, 253 (1995), 242 - 551.
- Dudek, C.:** Einflußfaktoren auf die Verteilung von Mikroorganismen in Emulsionen. TU-München/Weihenstephan, Fachgebiet Haushalts- und Betriebshygiene, Diplomarbeit, 2004.
- Fiedler, S.; Sattler, K.:** Hydrophobie und mikrobielle Leistung: 2. Bestimmung des Hydrophobiegrades oleophiler Mikroorganismen. Zentralb. Mikrobiol., (1992), 5 – 14.
- Flückinger, W.:** Zur Technologie der Mayonnaise und mayonnaiseähnlichen Emulsionen. Fette, Seifen, Anstrichmittel, 68 (1966) 2, 139 – 145.
- Först, P.:** In-situ Untersuchungen der Viskosität fluider, komprimierter Lebensmittel-Modellsysteme. TU-München/Weihenstephan, Lehrstuhl für Fluidmechanik und Prozeßautomation, Diss., 2001.
- Franke, V.; Weber, H.; Dehne, L. I.; Bögl, K. W.:** Entkeimung und Entwesung von Lebensmitteln mittels Druck. Institut für Sozialmedizin und Epidemiologie des Bundesgesundheitsamtes (SozEp-Heft 7), Berlin, 1993.
- Fernandez Garcia, A.; Butz, P.; Bogner, A.; Tauscher, B.:** Antioxidative capacity, nutrient content and sensory quality of orange juice and an orange-lemon-carrot juice product after high pressure treatment and storage in different packaging. European Food Research and Technology 213 (2001), 290 - 296.
- Gänzle (= Gaenzle), M. G.; Ulmer, H.-M.; Vogel, R.-F.:** High pressure inactivation of *Lactobacillus plantarum* in a model beer system. J. Food Sci., 66 (2001) 8, 1174 - 1181.
- Gänzle (= Gaenzle), Vogel, R.-F.:** On-line fluorescence determination of pressure mediated outer membran damage in *Escherichia coli*. Systematic and Applied Microbiology, 24 (2001), 477 - 485.
- Gänzle, M. G.:** Control of Lactic Acid Bacteria in Food Fermentation and Food Spoilage. TU-München/Weihenstephan, Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, Habil., 2002.
- Garcia-Graells, C.; Valckx, C.; Michiels, C. W.:** Inactivations of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in milk by combined treatment with high pressure and the peroxidase system. Appl. Environ. Microbiol., 66 (2000), 4173 – 4179.

- Gaze, J. E.:** The effect of oil on the heat resistance of *Staphylococcus aureus*. Food Microbiology, (1985) 2, 277 - 283.
- Gervilla, R.; Ferragut, V.; Guamis, B.:** High Pressure Inactivation of Microorganisms Inoculated into Ovine Milk of Different Fat Contents. J. Dairy Sci., 83 (2000) 4, 647 – 682.
- Gould, G. W. (Hrsg.):** Mechanisms of action of food preservation procedures. Elsevier Applied Science, London und New York, 1989.
- Hansen, N.-H.; Rieman, H.:** Factors Affecting the Heat Resistance of Nonsporing Organisms. J. appl. Bact., 26 (1963) 3, 314 – 333.
- Hazen, K. C.; Hazen, B. W.:** A polystyrene microsphere assay for detecting surface hydrophobicity variations within *Candida albicans* populations. J. Microbiol. Methods, 6 (1987), 289 – 299.
- Hazen, K. C.; Plotkin, B. J.; Klimas, D. M.:** Influence of growth conditions on cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Infect. Immun., 54 (1986), 269 – 271.
- Henriques, M.; Gasparetto, K.; Azeredo, A.; Oliveira, R.:** Experimental methodology to quantify *Candida albicans* cell surface hydrophobicity. Biotechnology Letters, 24 (2002), 1111 – 1115.
- Herdegen, V.:** Hochdruckinaktivierung von Mikroorganismen in Lebensmitteln und Lebensmittelreststoffen. TU-München/Weihenstephan, Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, Diss., 1998.
- Homma, K.; Haga, N.:** Effect of high pressure treatment on sterilization and physical properties of egg white. In: Hayashi, R. (Hrg.): High Pressure Science for Food. San-Ei Pub. Co., Kyoto, 1991, 317 – 324.
- Husmark, U.:** Adhesion mechanisms of bacterial spores to solid surfaces. Chalmers University of Technology and SIK (The Swedish Institute for Food Research), Göteborg, Schweden, Ph.D. thesis, 1993.
- Husmarkt, U.; Rönner, U.:** The influence of hydrophobic electrostatic and morphologic properties on the adhesion of *Bacillus spores*. Biofouling, 5 (1992), 335 – 344.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications of Foods):** Microbial ecology of food commodities, Blackie, London u. a., (1998), 390 - 417.
- Ikawa, Miyoshi:** Toxic and Ecological Effects of Fatty Acids on Animals and Microorganisms. In: Kabara, J. J. (Hrsg): The Pharmacological Effects of Lipids III, Role of Lipids in Cancer Research, American Oil Chemists' Society: Champaign, Illinois (1988), 39 – 45.
- Isaacs, C. E.; Litov, R. E.; Thormar, H.:** Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk. J. Nutr. Biochem., 6 (1995), 362 – 366.
- Isiker, G.; Gurakan, G. C.; Bayindirli, A.:** Combined effect of high hydrostatic pressure treatment and hydrogen peroxide on *Salmonella enteritidis* in liquid whole egg. Eur. Food Res. Technol., 217 (2003), 233 – 248.
- Jabra-Rizk, M. A.; Falkler, W. A.; Merz, W. G.; Meiller, T. E.:** New Assay for Measuring Cell Surface Hydrophobicities of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. Clin. Diagn. Lab. Immunol., (2001), 585 – 587.

Jensen, L. B.: Microbiology of Meats. The Garrard Press, Champaign, Illinois, 1942.

Kabara, J. J.: Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents - A review. In: Kabara, J. J. (Hrsg): The Pharmacological Effect of Lipids. American Oil Chemists' Society, Champaign IL, 1978, 1 - 14.

Kabara, J. J.; Swieczkowski, D. M.; Conley, A. J.; Truant, J. P.: Fatty Acids and Derivates as Antimicrobial Agents. Antimicrob. Ag. Chemother., 2 (1972) 1, 23 – 28.

Kalchayanand, N.; Sikes, A.; Dunne, P. C.; Ray, B.: Factors influencing death an injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurisation. Food Microbiology, 15 (1998), 207 – 214.

Karbstein, H.; Schubert, H.; Scigalla, W.; Ludwig, H.: Sterilisation of emulsions by means of high pressure. In: Balny, C.; Hayashi, R.; Heremans, K.; Masson, P.: High Pressure and Biotechnology. John Libbey Eurotext, Montrouge, 1992, 345 – 347.

Kilimann, K. V.: High Pressure Inactivation of Bacteria: Mathematical and Microbiological Aspects. TU-München/Weihenstephan, Lehrstuhl für Fluidmechanik und Prozessautomation, Diss. 2005.

Knorr, D.: Hydrostatic pressure treatment of food microbiology. In: Gould, G. W. (Hsg.): New methods of food preservation, Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall, London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, 1995, 159 – 175.

Kocková-Kratochvílová, A. (Hrsg): Yeasts and Yeast-like Organisms. VCH Verlags-Gesellschaft, Weinheim u. a., 1990.

Kohlweyer, U.: Isolierung und Charakterisierung eines Tetrahydrofuran abbauenden Stamms *Pseudonocardia* sp.. Martin-Luther-Univeristät/Wittenberg, Diss. 2000.

Konrich, F.: Die bakterielle Keimabtötung durch Wärme: Grundlagen, Technik und Anwendungsbereiche der Desinfektion und Sterilisation durch Wärme. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1963, 141 – 146.

Korhonen, T. K.; Lounatmaa, K.; Ranta, H.; Kuusi, N.: Characterization of Type 1 Pili of *Salmonella typhimurium* LT2. J. Bacteriol., (1980) 11, 800 – 805.

Kowalski, E.; Ludwig, H.; Tauscher, B.: Hydrostatic high pressure applied to food sterilisations II: Application to black pepper grains and powder. High Pressure and Biotechnology, 224 (1992), 341 – 343.

Krämer, J. (Hrsg): Lebensmittelmikrobiologie. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 2002.

Lee, Ji-Young; Kim, Yong-Suk.; Shin, Dong-Hwa: Antimicrobial Synergistic Effect of Linolenic Acid and Monoglyceride against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. J. Agric. Food Chem., 50 (2002), 2193 – 2199.

Lee, K.-K.; Yii, K.-C.: A comparison of three methods for assaying hydrophobicity of pathogenic vibrios. Letters in Applied Microbiology, 23 (1996), 339- 342.

Leuscher, R. G. K.; Zamparini, J.: Effects of spices on the growth and survival of *Escherichia coli* 0157 and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broth model systems and mayonnaise. Food Control, 13 (2002) 399 – 404.

- Lindhal, M.; Faris, A.; Wadstrom, T.; Hjerten, S.:** A new test based on salting out to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochemica et biophysica acta*, 677 (1981), 471-476.
- Martienssen, M.:** Leistungen immobilisierter Mikroorganismen bei der Eliminierung von Umweltschadstoffen. Martin-Luther-Universität/Wittenberg, Habil. 2001.
- Masschalk, B.; van Houdt, R.; van Haver, E. G. R.; Michiels, C. W.:** Inactivation of Gram-Negative Bacteria by Lysozyme, Denatured Lysozyme, and Lysozyme Derived Peptides under High Hydrostatic Pressure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 (2001) 1, 339 – 344.
- Moats, W. A.; Dabbah, R.; Edwards, V. M.:** Interpretation of nonlogarithmic survivor curves of heated bacteria. *Journal of Food Science*, 36 (1971), 523 – 526.
- Molin, N.; Snygg, G. B.:** Effect of Lipid Material on Heat Resistance of Bacterial Spores. *Appl. Microbiol.*, 15 (1967) 6, 1422 – 1426.
- Molina-Gutierrez, A.; Stippl, V. Delgado, A., Gaenzle, M. G.; Vogel, R. F.:** In situ determination of the intracellular pH of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus plantarum* during pressure treatment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (2002), 4399 – 4406.
- Molina-Höppner, A.:** Physiological response of *Lactococcus lactis* to high pressure. TU-München/Weihenstephan, Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, Diss., 2002.
- Mozes, N.; Handley, P. S.; Busscher, H.J.; Rouxhet, P. G. (Hrsg.):** Microbial Cell Surface Analysis: Structural and Physicochemical Methods. VCH Verlags-Gesellschaft, Weinheim u. a., 1991.
- Mozes, N.; Rouxhet, P. G.:** Methods for measuring hydrophobicity of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, (1987), 99 - 112.
- Mudd, S. M. D.; Mudd, E. B. H. :** A kinetic mechanism in interface. *The Journal of experimental medicine* 40 (1924), 633 – 647.
- Mudd, S. M. D.; Mudd, E. B. H. :** Certain interfacial Tension relations and the behaviour of bacteria in films. *Journal of experimental medicine*, 40 (1924), 647- 660.
- Müller, G.; Weber, H. (Hrsg):** Mikrobiologie der Lebensmittel Grundlagen, Behr's Verlag, Hamburg, 1996.
- Nesbitt, W. E.; Doyle, R. J.; Taylor, G. K.:** Hydrophobic Interaction and the Adherence of *Streptococcus sanguis* to Hydroxylapatite. *Infection and Immunity*, 38 (1982) 2, 637 – 644.
- Neufeld, R. J.; Zajia, J. E.; Gerson, D. F.:** Cell surface measurements in hydrocarbon and carbohydrate fermentations. *App. Environ. Microbiol.*, 39 (1980), 511 – 517.
- Oxen-Bodenhausen, P.:** Hochdruckeinfluß auf Mikroorganismen und die medienabhängigen Veränderungen ihrer Druckempfindlichkeit. TU-Berlin, Diss., 1995.
- Palou, E.; López-Malo A.; Barbosa-Canovas, G. V.; Welti-Chanes, J.; Swansos, B. G.:** Effect of water activity on high hydrostatic pressure inhibition of *Zygosaccharomyces bailii*. *Letters in Applied Microbiology*, 24 (1997) 5, 417 – 420.
- Papineau, A. M.; Hoover, H. G., Knorr, D.; Franka, D. F.:** Antimikrobial effect of water-soluble chitosans with high pressure. *Food Biotechnology*, 5 (1991), 45 – 57.

Parker, M. L.; Brocklehurst, T. F.; Gunning, P. A.; Coleman H. P.; Robins M. M.: Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsion: I – Methods for investigating the form of growth. *J. Appl. Bact.*, 78 (1995), 601 – 608.

Paul, K. L.; Morita, R. Y.: Effect of hydrostatic pressure and temperature on the uptake and respiration of amino acids by a facultatively psychrophilic marine bacterium. *J. Bacteriol.*, 108 (1971) 2, 853 – 843.

Paulus, S.: Einflüsse auf die Hitzeabtötung von *Aspergillus niger*-Konidien und *Pichia anomala*-Zellen in Wasser, Öl und Emulsionen. TU-München/Weihenstephan, Fachgebiet Haushalts- und Betriebs-hygiene, Diplomarbeit, 2005.

Pelletier, C.; Bouley, C.; Cayuela, C.; Bouttier, S.; Bourlioux, P.; Bellon-Fontaine, M.-N.: Cell surface Characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (1997) 5, 1725 – 1731.

Pembrey, R. S.; Marshall, K. C.; Schneider, R. P.: Cell Surface Analysis Techniques: What Do Cell Preparation Protocols Do to Cell Surface Properties? *Appl. Environ. Microbiol.*, (1999) 7, 2877-2894.

Pecher, A.: Einfluß verschiedener Zucker auf die Hitzestabilität von Enzymen. *ZfL*, 40 (1989) 9, 476 – 480.

Pecher, A.; Cerny, G.: Hitzestabilität endogener Enzyme: Einfluß des Erhitzungsmediums. *ZfL*, 40 (1989) 6, 333 – 336.

Perals, I.; Garcia, M. I.: The influence of pH and temperature on the behavior of *Salmonella enteritidis* phage type 4 in home-made mayonnaise. *Lett. Appl. Microbiol.*, 10 (1990) 10, 19 – 22.

Pister, K.-H. M.; Butz, P.; Dehne, I. L.: Der Einfluss der Hochdruckbehandlung auf chemische Veränderungen in Lebensmitteln. BgVV-Heft 03/2000 (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin), Berlin, 2000.

Ponce, E.; Pla, R.; Sendra, B.; Guamis, B.; Mor-Mur, M.: Combined effect of nisin and high hydrostatic pressure on destruction of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* in liquid whole egg. *Int. J. Food Microbiol.*, 43 (1998), 15 – 19.

Prändl, O.: Neue Aspekte der Hitzeinaktivierung von Mikroorganismen. In: Schriftreihe der Schweizerischen Gesellschaft für Lebensmittelhygiene (SGLH) (Hrsg.): Mikrobiologische Aspekte der Hitzekonservierung von Lebensmitteln, Chemische Rundschau, Heft 3, 1976, 15 – 19.

Rademacher, B.: Hochdruckbehandlung von Milch - Untersuchungen zur Inaktivierung von Mikroorganismen und Enzymen und deren kinetische Beschreibung. TU-München/Weihenstephan, Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, Diss., 1999.

Radford, S. A.; Board, R. G.: Review: Fate of pathogens in home-made mayonnaise and related products. *Food Microbiology*, 10 (1993), 269 – 278.

Rasanayagam, V.; Balasubramaniam, V. M.; Ting, E.; Sizer, C. E.; Busch, C.; Anderson, C.: Compression Heating of Selected Fatty Food Materials during High-pressure Processing. *Journal of Food Science*, 68 (2003) 1, 254 – 682.

Reddy, S. R.; Fogler, H. S.: Emulsion Stability: Delineation of Different Particle Loss Mechanisms. *J. Col. Interf. Sci.*, 79 (1981), 105 – 113.

- Rodenbeck, H.:** Über die Sterilisation von wasserfreien Stoffen und die Resistenz einiger Bakterien bei Erhitzung in solchen Stoffen. *Archiv für Hygiene und Bakteriologie* 109 (1933), 67 – 84.
- Römpp,** Chemie Lexikon. Falbe, J.; Regitz, M. (Hrsg.), Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 9. Auflage, 1990.
- Rosenberg, M.; Gutnick, D.; Rosenberg, E.:** Adherence of Bacteria to Hydrocarbons: A simple method für measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9 (1980), 29 – 33.
- Ruiz-Herrera, J. (Hrsg):** Fungal cell wall: Structure, Synthesis and Assembly. CRC Press, Florida, 1992.
- Santos, Y.; Bandin, I.; Nieto, T. P.; Bruno, D. W.; Ellis, A. E.; Toranzo, A. T.:** Comparison of the cell surface hydrophobicity of bacterial fish pathogens by different procedures. In: Perkins, F. O.; Cheng, T. C.: *Pathology in Marine Science*. Academic Press, San Diego, 1990, 101 – 115.
- Scheibenzuber, M.:** Molekulare und klinische Auswirkungen einer Hochdruckbehandlung von allergenen Lebensmitteln. TU-München/Weihenstephan, Lehrstuhl für Energie- und Umwelttechnik der Lebensmittelindustrie, Diss. 2003.
- Schuster, G. (Hrsg):** Emulgatoren für Lebensmittel. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1985.
- Senhaji, A.:** The protective effect of fat on the heat resistance of bacteria (II). *J. Fd Technol.* 12 (1977), 217 – 230.
- Senhaji, A.; Loncin, M.:** The protective effect of fat on the heat resistance of bacteria (I). *J. Fd Technol.*, 12 (1977), 203 – 216.
- Shibasaki, I.; Kato, N.:** Combined effects on antibacterial activity of fatty acids and their ester against gram-negative bacteria. In: Kabara, J. J. (Hrsg): *The Pharmacological Effect of Lipids*. American Oil Chemists' Society, Champaign IL, 1978, 15 - 24.
- Simpson, R. K.; Gilmour, A.:** The resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure in food. *Food Microbiology*, 14 (1997), 567 – 573.
- Slearewsky, W.:** Über die Widerstandsfähigkeit der Bakterien bei Erhitzen derselben in Fettstoffen. *Zeitschrift für Fleisch- und Milchhygiene*, 42 (1931), 30 – 32.
- Smith, J. L.; Metzger, V.; Palumbo, S. A.:** Der Einfluß des Fettes auf die thermische Destruktion von Bakterien in Brühwurstwaren. *Fleischwirt.*, 56 (1976) 5, 687 – 690.
- Stabel, J. R.; Steadham, E. M.; Bolin, C. A.:** Heat Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in Raw Milk: Are Current Pasteurization Conditions Effective? *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (1997) 12, 4975 – 4977.
- ter Steeg, P. F.; Hellemons, J. C.; Kok, A. E.:** Synergistic Actions of Nisin, Sublethal Ultrahigh Pressure, and Reduced Temperature on Bacteria and Yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (1999) 9, 4148 – 4154.
- Thremoulet, E.; Rabier, P.; Gas, G.:** Inhibition of *Bacillus stearothermophilus* Spores in a Liquid Medium by Free Fatty Acids with and without Heat: Possible Mechanisms for the Microbiological Stability of Canned Fat-Druck Liver. *Journal of Food Science*, 67 (2002) 3, 1144 – 1148.

van der Mei, H. C.; Bos, R.; Busscher, H. J.: A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (1998) 11, 213 – 221.

van der Mei, H. C.; van der Belt-Gritter, B.; Busscher, H. J.: Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity. 2. Adhesion mechanisms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (1995) 5, 117- 126.

van Loosdrecht, M. C. M.; Lyklema, J.; Norde, W.; Schraa, G.; Zehnder, A. J. B.: The Role of Bacterial Cell Wall Hydrophobicity in Adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.*, (1987a) 8, 1893- 1897.

van Loosdrecht, M. C. M.; Lyklema, J.; Norde, W.; Schraa, G.; Zehnder, A. J. B.: Electrophoretic mobility and hydrophobicity as measure to predict the initial steps of bacteria adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 (1987b), 1898 - 1901

van Loosdrecht, M. C. M.; Norde, W.; Zehnder, A. J. B.: Physical chemical description of bacteria adhesion. *J. Biomater. Applic.*, 5 (1990), 91 – 106.

van Oss, C. J.: Hydrophobicity of biosurfaces – origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (1995) 5, 91 - 110.

Vanhaecke, E. und Pijck, J.: Bioluminescence assay for measuring the number of bacteria adhering to the hydrocarbon phase in the BATH test. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 (1988) 6, 1436 – 1439.

Verrips, C. T; Zaalberg, J.: The Intrinsic Microbial Stability of Water-in-Oil Emulsions I. Theory. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (1980) 10, 187 – 196.

Welsh, J. K.; Arsenakis, R. J.; May, J. T.: Effect of Antiviral Lipids, Heat, and Freezing on the Activity of Viruses in Human Milk. *The Journal of infectious diseases*, 140 (1979) 3, 322 – 328.

Wiencek, K. M.; Klapes, N. P.; Foededing, P. M.: Hydrophobicity of *Bacillus* and *Clostridium* spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 (1990), 2600 – 2605.

Zuccaro, J. B.; Powers, J. J.; Morse, R. E.; Mills, W. C.: The thermal death times of yeast in oil and movement of the yeast between the oil and water phases of french dressing. *Food Research*, 16 (1951), 30 – 38.

Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken: http://bundesrecht.juris.de/zzulv_1998/index.html (09.12.2005)

LEBENS LAUF

Name		Rita Josefa Miller
Geburtsdatum		07.09.1975
Geburtsort		Fürth
Familienstand		ledig
1982 - 1986		Grundschule Gersthofen
1986 - 1987		Hauptschule Gersthofen
1987 - 1996		Gymnasium Gersthofen
	28.06.1996	Schulabschluß: Allgemeine Hochschulreife
1996 - 2001		Studium der Ökotrophologie an der Technischen Universität München/Weihenstephan
	08.10.2001	Studienabschluß: Diplom-Ökotrophologie (Univ.)
2001 - 2006		wissenschaftliche Angestellte am Fachgebiet Haushalts- und Betriebshygiene der Technischen Universität München/Weihenstephan unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. G. Cerny: <ul style="list-style-type: none">• Anfertigung der Dissertation• Lehrverpflichtungen im Studiengang Ökotrophologie und Lehramt an beruflichen Schulen

Adresse:

rita.miller@web.de