

# **Untersuchungen zur Hitzeresistenz von Bakteriensporen und zum Pasteurisieren von oberflächlich verkeimten Lebensmitteln**

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)  
an der Fakultät für Chemieingenieurwesen der  
Universität Fridericiana Karlsruhe  
(Technische Hochschule)

genehmigte

**Dissertation**

von

Dipl.-Ing. Rainer Bültermann  
aus Rheinfeldern

Tag des Kolloquiums: 12.07.1997  
Referent: Prof. Dr.-Ing. habil. H. Schubert  
Korreferent: Prof. Dr.-Ing. C. Posten



1	Einleitung	1
2	Stand des Wissens	7
2.1	Verderb von Lebensmitteln durch sporenbildende Mikroorganismen	7
2.1.1	Eigenschaften sporenbildender Mikroorganismen	7
2.1.1.1	Ursachen der Hitzeresistenz von Sporen	11
2.1.1.2	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	11
2.1.2	Einflüsse auf die Hitzeresistenz von Sporen	12
2.1.2.1	Sporulationsbedingungen	13
2.1.2.2	Wasseraktivität des Erhitzungsmediums	13
2.1.2.3	Glazustand	15
2.1.2.4	pH -Wert des Erhitzungsmediums	16
2.1.2.5	Chemische Zusammensetzung des Erhitzungsmediums	20
2.1.2.6	Einfluß der Nachweismethoden auf die beobachtete Abtötungsrate	22
2.1.2.7	Weitere Einflußfaktoren	22
2.1.3	Reaktionskinetische Modelle zur Beschreibung der Hitzeinaktivierung von Sporen	23
2.1.3.1	Inaktivierungs-Modell 1. Ordnung	23
2.1.3.2	Aktivierungs-Inaktivierungs-Modell	28
2.1.4	Technische Realisierung der Erhitzung von Sporensuspensionen	31
2.1.4.1	Quasiisotherme Versuchsbedingungen	32
2.2	Oberflächlich verkeimte Lebensmittel am Beispiel von schwarzem Pfeffer	34
2.2.1	Die Pfefferpflanze	34
2.2.2	Inhaltsstoffe	36
2.2.2.1	Eigenschaften der ätherischen Öle	37
2.2.3	Mikrobiologische Belastung von schwarzem Pfeffer	40
2.2.4	Physikalische Eigenschaften von Pfeffer	42
3	Material und Methoden	43
3.1	Diskontinuierliche Kapillarrohranlage	43
3.1.1	Versuchsablauf	44
3.2	Kontinuierliche Kapillarrohrstrecke	47
3.2.1	Unterschiede zu der von HAAS verwendeten Anlage	52

3.2.2	Versuchsdurchführung	54
3.3	Entwicklung eines Verfahrens zur Heißgasbehandlung von Pfefferkörnern	57
3.3.1	Fallrohranlage	57
3.3.2	Anlage zum Pasteurisieren einzelner Pfefferkörner	60
3.4	Untersuchungsmethoden und mikrobiologische Arbeiten	65
3.4.1	Vorbereitung der Sporensuspension	65
3.4.2	Methoden zur Bestimmung der Keimzahl	66
3.4.2.1	Kochsches Plattengußverfahren	66
3.4.2.2	Most-Probable-Number-Technik	66
3.4.2.3	Membranfilterverfahren	68
3.4.2.4	Bestimmung der Keimzahl von Pfefferkörnern und Modellpartikeln	69
3.4.2.5	Verwendete Nährböden, Herstellung der Ringer-Lösung	70
3.4.3	Monoseptische Kontamination von Pfefferkörnern und Glaskugeln	71
3.4.4	Bestimmung des Gehalts an ätherischen Ölen	72
3.4.5	Farbmessung	74
4	Ergebnisse	75
4.1	Einfluß von pH-Wert und verwendeter Säure auf die Hitzeresistenz	75
4.1.1	Voruntersuchungen	75
4.1.2	Abtötungsergebnisse	76
4.2	Hitzeresistenz im Bereich $\vartheta > 140$ °C	81
4.2.1	Laminare Strömung bei größeren Kapillardurchmessern	88
4.3	Agglomerat-Modell	91
4.4	Pasteurisieren oberflächlich verkeimter Lebensmittel am Beispiel von schwarzem Pfeffer	102
4.4.1	Pasteurisationsversuche mit Pfefferkörnern	102
4.4.2	Pasteurisationsversuche mit kontaminierten Glaskugeln und Einfluß einer Befeuchtung der Oberfläche vor dem Erhitzen	109
4.4.3	Veränderungen des Pfeffers durch die Heißgasbehandlung	113
4.4.3.1	Optische Veränderungen	113
4.4.3.2	Gewichtsverlust bei der Heißgasbehandlung	114
4.4.3.3	Verlust an ätherischen Ölen	115

	<b>Inhalt</b>	<b>III</b>
4.4.3.4	<b>Sensorische Beurteilung des behandelten Pfeffers</b>	<b>118</b>
4.4.4	<b>Industrielle Umsetzung des Verfahrens</b>	<b>119</b>
5	<b>Zusammenfassung</b>	<b>120</b>
6	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>125</b>
	<b>Anhang</b>	<b>135</b>

## Verwendete Formelzeichen

### Großbuchstaben

$C_1$	Anpassungsparameter	$^{\circ}\text{C}$
$D$	dezimale Reduktionszeit	min
$D_{\text{app}}$	scheinbarer D-Wert	min
$E(t)$	Dichteverteilung der Verweilzeit	1/s
$E_A$	Aktivierungsenergie	kJ/mol
$E_I$	Inaktivierungsenergie	kJ/mol
$F_A$	Faktor im Agglomerat-Modell	-
$M$	Zahl der ruhenden Sporen	KBE/g
$N$	Keimzahl	KBE/g
$N$	Zahl der aktivierten Sporen	KBE/g
$N_{\text{Agges}}$	Gesamtzahl der Agglomerate	-
$N_I$	Zahl der Inaktivierten Sporen	KBE/g
$N_0$	Anfangskeimzahl	KBE/g
$P_V$	volumenbezogener Leistungseintrag	W/ml
$R$	universelle Gaskonstante	8,314 J/mol·K
$R$	Kugelradius	m
$T$	Temperatur	K
$T_A$	Temperatur des Aufheizbades	$^{\circ}\text{C}$
$T_g$	Glasübergangstemperatur	$^{\circ}\text{C}$
$V$	Volumen	ml
$\dot{V}$	Volumenstrom	ml/min
$V_{\text{HHZ}}$	Heißhaltevolumen	ml
$x$	Radius	m

### Kleinbuchstaben

$a$	Temperaturleitfähigkeit	$\text{m}^2/\text{s}$
$a_w$	Wasseraktivität	-
$b$	Anpassungsparameter	-
$c_p$	spezifische Wärmekapazität	kJ/kg
$d$	Durchmesser	mm

Formelzeichen

V

i	Sporenanzahl in einem Agglomerat	-
$k_A$	Aktivierungskonstante	1/s
$k_I$	Inaktivierungskonstante	1/s
$k_{I0}$	präexponentieller Faktor des Arrheniusansatzes	1/s
$k_0$	Geschwindigkeitskonstante im Aktivierungs- -Inaktivierungs-Modell	1/s
$k_\infty$	Geschwindigkeitskonstante im Aktivierungs- -Inaktivierungs-Modell	1/s
l	Länge	m
m	Faktor im Differenzenverfahren	-
n	Überlebensrate	-
p(t)	Überlebenswahrscheinlichkeit	-
q(t)	Abtötungswahrscheinlichkeit	-
$q_0(i)$	Agglomerat-Anzahlgrößendichteverteilung	-
r	Korrelationskoeffizient	-
t	Zeit	s
$\bar{t}$	mittlere Verweilzeit	s
$t_0$	Zeitversatz (Anpassungsparameter)	s
$v_{\text{leer}}$	Leerrohrgeschwindigkeit	m/s
$y_0$	y-Achsen-Abschnitt	-
z	dezimale Reduktionstemperatur	°C

**Griechische Buchstaben**

$\alpha$	Faktor im Aktivierungs-Inaktivierungs-Modell	-
$\Delta$	Differenz	
$\vartheta$	Temperatur	°C
$\theta$	dimensionslose Temperatur	-
$\rho$	Dichte	kg/m <sup>3</sup>
$\tau$	Faktor im Aktivierungs-Inaktivierungs-Modell	-
$\tau$	dimensionslose Zeit, Fourier-Zahl	-
$\xi$	dimensionsloser Radius	-

**Abkürzungen und Indizes**

A	ohne innere Durchmischung
AHZ	Aufheizzone
AKZ	Abkühlzone
B	mit idealer innerer Durchmischung
B	Thermostatisierbad
Bi	Biotzahl
DNA	Desoxynucleinsäure
EHT	extrem hohe Temperaturen
HHZ	Heißhaltezone
i	bezogen auf Agglomerate der Größe i
k	Nummer der Schale der Kugel beim Differenzenverfahren
K	Kapillare
KBE	keimbildende Einheiten
max	Maximalwert
P	Pneumatikzylinder
PK	Pfefferkorn
Re	Reynoldszahl
RNA	Ribonucleinsäure
S	Sporen
S <sub>I</sub>	inaktivierte Sporen
T-Stück	bezogen auf das T-Stück
UHT	ultra hohe Temperaturen
VWZ	Vorwärmzone
0	zum Zeitpunkt t = 0



## 1 Einleitung

Lebensmittel für möglichst lange Zeit in ihrer Qualität zu erhalten, ist schon seit langem ein elementares Ziel der Menschen und damit eine wichtige Aufgabe der Lebensmittelverfahrenstechnik. Der Befall durch Mikroorganismen ist die häufigste Ursache für den Verderb von Nahrungsmitteln. Dabei kann es sich um offensichtliche Veränderungen von Farbe, Geruch oder Form, aber auch äußerlich nicht erkennbare Veränderungen handeln. Gerade diese können beim Verbraucher zu Erkrankungen, unter Umständen mit Todesfolge führen. In den letzten Jahren hat dies am Beispiel der Salmonelleninfektionen wieder die Beachtung der Öffentlichkeit gefunden.

Um den Verderb durch Mikroorganismen zu vermeiden, ist die Abtötung oder die Hemmung des Wachstums der Verderberreger, zum Beispiel durch Kühlen, Gefrieren oder Trocknen, notwendig.

Die wichtigste Methode zur Abtötung von Mikroorganismen in Lebensmitteln ist die Hitzebehandlung. Man unterscheidet zwischen Pasteurisieren und Sterilisieren. Beim Pasteurisieren werden nahezu alle vegetativen Keime, nicht aber deren Sporen, abgetötet. In pasteurisierten Lebensmitteln sollen keine pathogenen Keime mehr vorkommen. Nach der Sterilisation sollen alle lebensfähigen Formen von Mikroorganismen abgetötet und alle unerwünschten Enzyme inaktiviert sein. Vollständige Keimfreiheit aller sterilisierten Produkte ist nicht möglich. Die Untersuchungen zum Abtöten von Mikroorganismen haben gezeigt, daß es sich hierbei um einen Prozeß handelt, für den lediglich vorausgesagt werden kann, daß ein bestimmter Bruchteil der Ausgangsmenge an Mikroorganismen in endlicher Zeit abgetötet wird. Deshalb wurde der Begriff der praktischen Sterilität eingeführt, bei der alle verderberregenden, pathogenen und toxinbildenden Mikroorganismen mit einer bestimmten, vorgegebenen Wahrscheinlichkeit inaktiviert werden. Die Fähigkeit von Mikroorganismen, eine Hitzebehandlung zu überleben, wird als Hitzeresistenz bezeichnet. Die Hitzeresistenz von Mikroorganismen ist eine wichtige Information zur Auslegung von Hitzesterilisations- und Pasteurisierungsprozessen beim Haltbarmachen von Lebensmitteln. Die Hitzeresistenz wird oft

durch die dezimale Reduktionszeit (D-Wert) charakterisiert. Das ist die Zeit, die benötigt wird, um die Zahl der Mikroorganismen um eine Zehnerpotenz auf 10 % des Anfangswertes zu reduzieren.

Mit der Kenntnis der Hitzeresistenz und der Abtötungskinetik kann der thermische Inaktivierungsprozeß so ausgelegt werden, daß die wertvollen, temperaturempfindlichen Inhaltsstoffe, zum Beispiel die Vitamine, möglichst wenig geschädigt werden. Die Abtötungsreaktion und die chemischen Reaktionen (z.B. Vitaminabbau) haben unterschiedlich starke Temperaturabhängigkeiten. Im Arrhenius-Ansatz ist die Aktivierungsenergie der chemischen Reaktion (etwa 80 kJ/mol) kleiner als diejenige der Abtötungsreaktion (etwa 250 kJ/mol). Deshalb ist es wünschenswert, die thermische Konservierung bei möglichst hohen Temperaturen und kurzen Zeiten durchzuführen.

Einige Bakterien bilden unter ungünstigen Wachstumsbedingungen resistente Dauerformen, die Sporen, aus. Sporen sind auch nach langer Lagerung noch in der Lage auszukeimen und das Lebensmittel zu verderben. Zur Beurteilung der Sterilisation wird oft die Reduktion der Zahl an *Bacillus stearothermophilus* Sporen geprüft.

Sporen der Art *Bacillus stearothermophilus* besitzen die höchste Hitze-resistenz der in Lebensmitteln vorkommenden Mikroorganismen. *Bacillus stearothermophilus* vermehrt sich bei Temperaturen von 40 - 65 °C und kann durch leichtes Ansäuern zum "flat-sour" Verderb von Konserven führen. Bei Konserven wird er deshalb als Leitkeim verwendet und eine Reduktion seiner Sporen um vier Zehnerpotenzen gefordert. Dieser Keim wurde deshalb auch für diese Arbeit verwendet.

Die Hitzeresistenz von Sporen hängt von vielen Einflußgrößen, vor allem vom pH-Wert, dem  $a_w$ -Wert und der chemischen Zusammensetzung des umgebenden Mediums (Erhitzungsmedium), ab. Bisher wurden zur Bestimmung des pH-Wert-Einflusses auf die Hitzeresistenz Untersuchungen meist mit Pufferlösungen als Erhitzungsmedium und bei niedrigen Temperaturen bis 121 °C durchgeführt. Die Übertragung dieser Ergebnisse auf die Behandlung von Lebensmitteln mit gleichem pH-Wert kann zu Irrtümern führen und ist daher nicht ratsam [1].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb der Einfluß von Milch-, Zitronen-, Essig- und Ascorbinsäure als Erhitzungsmedium bei  $\text{pH} = 5$  und  $\text{pH} = 4$  auf die Hitzeresistenz von *Bacillus stearothermophilus* Sporen untersucht. Diese vier Säuren werden als Säuerungsmittel in der Lebensmittelindustrie, vor allem bei Gemüse-, Fleisch- oder Fischkonserven und Saucen, eingesetzt.

Milchsäure ist Bestandteil von vielen Milchprodukten, vor allem von Sauermilcherzeugnissen, die oft pasteurisiert oder sterilisiert werden. Auch bei der Herstellung von Trockensauer zur Brotbereitung und in Limonadensirupen wird Milchsäure verwendet.

Zu den in Früchten enthaltenen Fruchtsäuren gehört die Zitronensäure. In der Getränkeindustrie wird zur Herstellung von Säften und Limonaden, in der Süßwarenindustrie bei der Herstellung von Bonbons und Fruchtgummis und bei der Erzeugung von Vitamin- und Mineralpräparaten Zitronensäure als Zusatzstoff eingesetzt.

Essig ist im wesentlichen verdünnte wäßrige Essigsäure mit einem Gehalt an reiner Essigsäure von 5 - 15 g/100 ml. Essigsäure kommt in vielen Feinkostprodukten vor, zum Beispiel in Salatsaucen.

Ascorbinsäure (Vitamin C) ist in Obst und Gemüse enthalten. Reich an Vitamin C sind Zitrusfrüchte, Hagebutten, Kohl und Kartoffeln. Wegen ihrer antioxidativen Wirkung und zur Vitaminanreicherung wird Ascorbinsäure als Zusatzstoff verwendet, zum Beispiel in Fleisch- und Wurstwaren.

Ein  $\text{pH}$ -Wert von 5 und 4 wurde gewählt, weil zu den leichtsauen ( $5,3 < \text{pH} < 7,0$ ) oder mittelsauren Lebensmitteln ( $4,5 < \text{pH} < 5,3$ ) viele Nahrungsmittel gehören, die zum Haltbarmachen sterilisiert werden können: Gemüse wie Bohnen, Spargel, Rote Bete, Kohl, Karotten, Spinat und Fertiggerichte wie Tomatensuppe und Ravioli.

Zum anderen wurde untersucht, mit welchem kinetischen Ansatz die Sporenabtötung in physiologischer Kochsalzlösung bei extrem hohen Temperaturen (EHT) beschrieben werden kann. Der Bereich der EHT-Erhitzung (Temperaturen über  $140\text{ °C}$ ) schließt sich an den Bereich der UHT-Erhitzung (ultra hohe Temperaturen bis ca.  $140\text{ °C}$ ) an. In der

Praxis wird oft mit dem Abtötungsmodell erster Ordnung gerechnet [2]. Dieses Modell betrachtet die Abtötung von Mikroorganismen als statistischen Prozeß. Das führt zur Vorhersage einer exponentiellen Abnahme der Keimzahl mit der Zeit analog dem radioaktiven Zerfall. Bei der üblichen logarithmischen Auftragung der Überlebenskeimzahl über der Zeit liefert dieses Modell Geraden. Frühere Versuche [3] haben gezeigt, daß es im EHT-Bereich zu starken Abweichungen der Überlebenskurven von der Geraden, die das Modell erster Ordnung vorhersagt, kommt. Ein Modell, daß die Abweichung erklären kann, ist das Aktivierungs-Inaktivierungs-Modell. Dieses Modell postuliert zwei Zustände lebender Sporen. Aktivierte Sporen können direkt in vegetatives Wachstum übergehen, wenn die Milieuzusammensetzung dies erlaubt. Sie können auch direkt thermisch inaktiviert werden. Ruhende Sporen befinden sich in einem Zustand, aus dem sie nicht direkt in vegetatives Wachstum übergehen können. Sie können auch nicht direkt thermisch inaktiviert werden; das kann erst erfolgen, nachdem sie in den aktivierten Zustand bei ausreichend hohen Temperaturen überführt worden sind. Ziel war es zu prüfen, ob die Abtötungskinetik im EHT-Bereich mit dem Aktivierungs-Inaktivierungs-Modell beschrieben werden kann und, falls notwendig, ein neues Modell zu entwickeln.

Neben der Sporenabtötung im schon fertig komponierten Lebensmittel bei hohen Temperaturen und kurzen Zeiten, die in den ersten beiden Teilen der Arbeit untersucht wurde, ist das Sterilisieren der Einzelkomponenten vor dem Mischen der Rezeptur eine Möglichkeit, die Produktqualität zu erhöhen. Es kann dann für jede Komponente ein auf die Art der Verkeimung optimiertes Verfahren angewandt werden.

Sporen werden oft über Gewürze, die im Laufe ihrer Verarbeitung oder ihres Wachstums von sporenbildenden Mikroorganismen besiedelt worden sind, in das Lebensmittel eingebracht. Für diese Arbeit wurde das in Deutschland meistverwendete Gewürz schwarzer Pfeffer herausgegriffen. In Lebensmitteln wird es bis zu einer Konzentration von 1 % eingesetzt und stellt mit einer Belastung von bis zu  $5 \cdot 10^7$  keimbildenden Einheiten pro Gramm (KBE/g) somit eine bedeutende

Kontaminationsquelle dar. Diese Verkeimung ist für die Anwendung im privaten Haushalt nicht problematisch, da es bei den kurzen Lagerungszeiten nicht zu starker Vermehrung der Mikroorganismen kommt. Andere Voraussetzungen gelten bei der Herstellung von Dauer- und Rohwürsten sowie von Konserven. Bei Konserven werden lange Lagerungszeiten bis zu fünf Jahre garantiert. Der Trend in der Lebensmittelindustrie geht zu Produkten, die keine Konservierungsstoffe mehr enthalten. Das Auskeimen der Sporen wird dann nicht mehr gehemmt. Deshalb können diese langen Haltbarkeitszeiten nur durch Sterilisieren des Produktes erreicht werden. In Konserven verpackte Lebensmittel können nicht mit einem UHT/EHT-Verfahren sterilisiert werden, da die Aufheiz- und Abkühlzeiten sehr lang sind. Die Abtötung sämtlicher vorhandener Sporen führt deshalb unweigerlich zu Qualitätseinbußen. Die Verwendung von entkeimten Gewürzen ist folglich wünschenswert.

Gewürze und andere oberflächlich verkeimte Stoffe können z.B. durch Begasen mit Ethylenoxid oder Ozon entkeimt werden. Das Begasen mit Ethylenoxid ist in vielen Ländern wegen des Verdachts krebserregender Rückstände verboten. Ozon erwies sich als ungeeignet, da es wegen seiner stark oxidierenden Wirkung die ätherischen Öle und andere Inhaltsstoffe der Gewürze oxidiert. Das führt zu Farb- und zu Geschmacksveränderungen, die nicht mehr toleriert werden können [4]. Ein sehr gut geeignetes Verfahren stellt die Behandlung mit ionisierenden Strahlen dar. Vorteilhaft ist, daß die Gewürze in der Verpackung behandelt werden können. Das Risiko der Wiederverkeimung nach der Behandlung ist dadurch reduziert. Dieses Verfahren wird aber von den Verbrauchern nur in geringem Maße akzeptiert, obwohl viele Untersuchungen die Unbedenklichkeit des Verfahrens belegen [5]. Hochdruckverfahren, die statische Drücke von einigen kbar verwenden, erreichen nur geringe Abtötungsraten bei bakteriellen Sporen. Die Gerätekosten sind ebenfalls sehr hoch. Diese Verfahren sind zum jetzigen Zeitpunkt nicht konkurrenzfähig.

Die Entkeimung oberflächlich verkeimter Stoffe wurde im Rahmen dieser Arbeit am Beispiel von schwarzem Pfeffer und Modellpartikeln aus Glas untersucht. Für diese Stoffe stellt die Behandlung in einem

Heißgasstrom eine Alternative zu den oben erwähnten Verfahren dar. Grundidee des Verfahrens ist die schnelle Aufheizung der Oberfläche durch einen mit größerer Geschwindigkeit durch den Verfahrensraum strömenden heißen Gasstrom. Das Innere des Produktes wird sich dabei kaum erhitzen, so daß dort keine thermisch bedingte Produktschädigung auftritt. Es wurde eine Anlage zur Heißgasbehandlung stückiger Güter entwickelt und aufgebaut, mit der Gastemperaturen bis 600 °C erreicht werden können.

## **2 Stand des Wissens**

### **2.1 Verderb von Lebensmitteln durch sporenbildende Mikroorganismen**

Sporenbildende Mikroorganismen sind ein bedeutender Faktor für den Verderb von Lebensmitteln. Die Inaktivierung von vegetativen Zellen ist in der Regel möglich, oft überleben jedoch die widerstandsfähigeren Sporen im Lebensmittel eine Konservierungsbehandlung. Dies trifft auf chemische, physikalische und thermische Verfahren zu. Die Sporen können dann während der Lagerung auskeimen und durch ihre Vermehrung das Lebensmittel verderben. Die Lebensmittel werden häufig durch sensorische Veränderungen ungenießbar. Einige Mikroorganismen sind pathogen, d.h. sie verursachen Infektionen (z.B. *Salmonellen*) oder produzieren Toxine, die für den Menschen giftig sind (z.B. *Clostridium botulinum*).

#### **2.1.1 Eigenschaften sporenbildender Mikroorganismen**

Bakteriensporen sind metabolisch inaktive, ruhende Zellen. Sie sind die unter Nährstoffmangel oder bei Anreicherung wachstumshemmender Stoffwechselprodukte gebildeten Dauerformen von Bakterien [6]. Sie sind gegenüber physikalischen und chemischen Einwirkungen äußerst resistent. Daher können Bakterien in diesem Zustand latenten Lebens lange Zeit überdauern. In trockenen Bodenproben verlieren 90 % der Sporen erst innerhalb von 50 Jahren Aufbewahrung ihre Lebensfähigkeit [6]. Aus dem Mageninhalt von in Bernstein eingeschlossenen Bienen konnten noch lebensfähige Sporen isoliert und vermehrt werden. Diese Sporen haben 25 - 40 Millionen Jahre überdauert [7].

Unter günstigen Umgebungsbedingungen keimen Sporen aus; sie werden zu vegetativen Zellen, vermehren sich und können bei Lebensmitteln durch Stoffwechselprodukte Verderb oder Vergiftung hervorrufen. Gefährdete Lebensmittel werden deshalb durch Erhitzen, wobei die Hitzeresistenz der Sporen überwunden werden muß, sterilisiert.

Hitzeresistente Sporen werden nur von wenigen Gattungen grampositiver Stäbchenbakterien gebildet. Zu den aerob beziehungsweise fakultativ anaerob wachsenden Sporenbildnern gehört die Gattung *Bacillus*, zu den streng anaeroben die Gattungen *Clostridium* und *Desulfotomaculum* [8, 9].

Sporen werden im Inneren der Bakterienzellen gebildet. Mit der Ansammlung von proteinhaltigem Material (DNA und RNA) im entstehenden Sporenbereich beginnt die Sporulation (Abb. 2-1). Durch Einschnüren der Cytoplasmamembran wird ein Teil des Kernmaterials der Mutterzelle abgetrennt. Der entstandene Sporenprotoplast wird von der Cytoplasmamembran der Mutterzelle eingehüllt. Die Membran des Sporenprotoplasten synthetisiert nach außen die Keimzellwand, die von der Mutterzelle stammende Membran synthetisiert nach innen die Sporenrinde (Cortex). Diese besteht aus einem vielschichtigen Gerüst von Peptidoglykanen, das sich von dem der vegetativen Zelle unter anderem durch den Vernetzungsgrad unterscheidet. Die mehrlagige, äußere Sporenhülle wird von der Mutterzelle gebildet; sie besteht weitgehend aus Polypeptiden, die reich an Disulfidbrücken sind. Diese Hüllen machen etwa 50 % der Trockenmasse der reifen Spore aus. Beim Reifen der Spore verdichtet sich die Sporenhülle, die Lichtbrechung, ein Zeichen entwässerten Proteins, und die Hitzeresistenz nehmen zu. Durch Autolyse der Mutterzelle wird die reife Spore freigesetzt (Abb. 2-2). Einen Anteil von 10 bis 15 % der Trockenmasse der Spore kann die während der Sporulation gebildete Dipicolinsäure erreichen. Sie kommt in vegetativen Zellen nicht vor. Meist ist sie in einem Chelatkomplex mit Calcium, das während der Synthese der Dipicolinsäure bevorzugt aufgenommen wird, gebunden [6, 8, 3].

Unter geeigneten Bedingungen entwickelt sich aus der Spore wieder eine vegetative Zelle. Dieser Vorgang wird in der Literatur meist in drei Teilschritte unterteilt: die Aktivierung, die Keimung und das Auswachsen.

Aktivieren, das Herstellen der Keimungsbereitschaft, geschieht häufig durch kurzzeitige Hitzeeinwirkung. Für *Bacillus stearothermophilus* sind 80 °C für 10 Minuten oft gewählte Aktivierungsbedingungen, doch wurde für einen Stamm dieser Bakterien bei einer Temperatur von



115 °C für drei Minuten die beste Aktivierung gefunden [10]. Der Vorgang der Aktivierung ist jedoch nicht unbedingt für die Keimung erforderlich. Auch die Lagerungszeit und die Lagerungsbedingungen sind Einflußgrößen, so daß gealterte Sporen in einem geeigneten Milieu sofort auskeimen können [6]. Ist kein entsprechendes Umfeld für die Spore vorhanden, ist die Hitzeaktivierung reversibel.

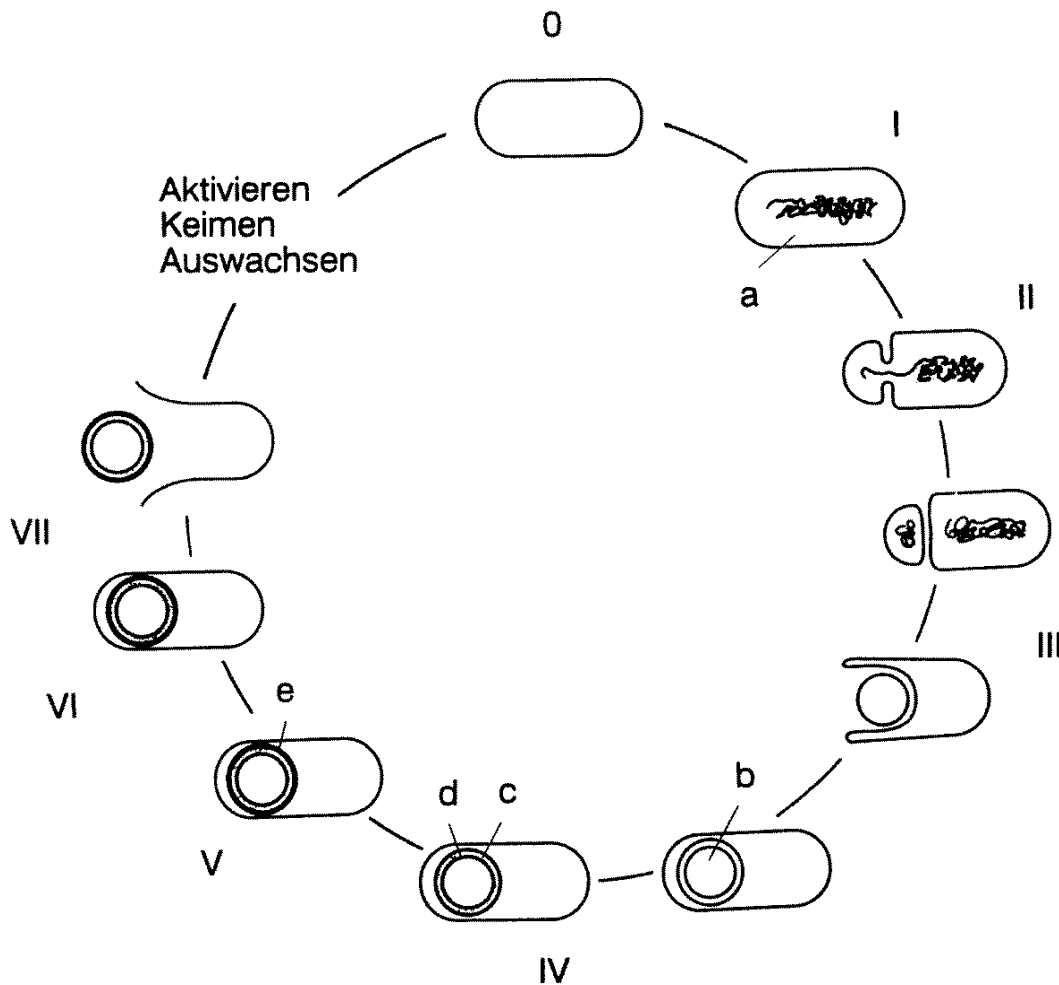


Abb. 2-1: Entwicklungsstadien bei der Sporenbildung [3]:

- |                          |                              |
|--------------------------|------------------------------|
| 0 Vegetative Zelle       | IV Synthese der Cortex       |
| I Axiale Filamentbildung | V Synthese der Sporenhülle   |
| II Septumbildung         | VI Reifung                   |
| III Einhüllen der        | VII Autolyse der Mutterzelle |
- a = DNS; b = Vorspore; c = Cortex; d = Keimzellwand;  
e = Sporenhülle

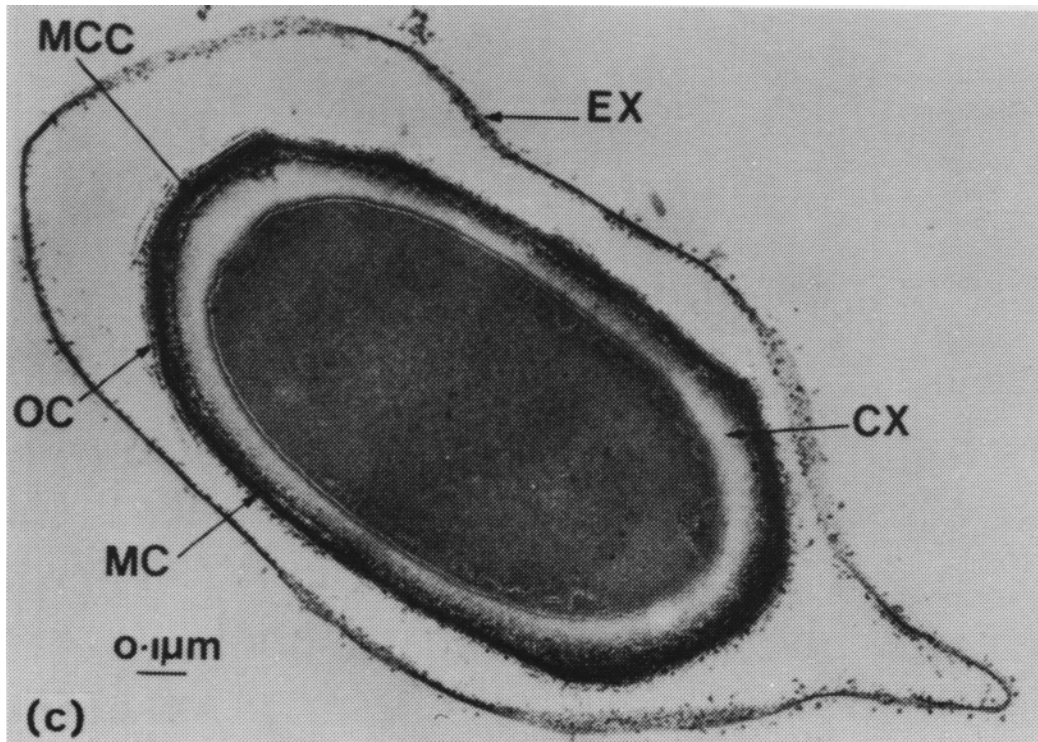


Abb. 2-2: Schnitt durch eine reife *Bacillus cereus* Spore; C = Cytoplasma; CX = Cortex; MC = Sporenhüllen; EX = Exosporium [11]

Die Keimung, der Verlust der Sporeneigenschaften, ist dagegen irreversibel. Dieser Prozeß wird durch verschiedene physikalische oder chemische Stimulationen ausgelöst. Zum Beispiel fand SILLA [12], daß die Anwesenheit bestimmter Substanzen, zum Beispiel von Harnstoff, oder das Einwirken ionisierender Strahlung die Keimung initiieren kann. Bei der Keimung nimmt die Spore Wasser auf, und es werden die Sporenhülle und der Cortex enzymatisch abgebaut. Dabei werden Aminosäuren, Peptide, Calcium und Dipicolinsäure ausgeschieden. Die Keimung ist gekennzeichnet durch den Verlust der Widerstandsfähigkeit gegen Hitze, Chemikalien und Strahlung und durch die Abnahme der Lichtbrechung und der Trockenmasse um 25 - 30 % [6, 12].

Mit Auswachsen wird das Umwandeln der Spore in eine vegetative Zelle, ihr Wachstum und die Vermehrung der Zellen bezeichnet [12]. Für diesen Vorgang müssen geeignete Nährstoffe anwesend sein.

### 2.1.1.1 Ursachen der Hitzeresistenz von Sporen

Die Mechanismen der Hitzeresistenz von Bakteriosporen sind bislang noch nicht vollständig geklärt. Die meisten Autoren, z.B. RUSSEL [11], geben als Ursache für die Hitzeinaktivierung eine Denaturierung von Proteinen (DNA) an. Der geringe Wassergehalt der Sporen (etwa 15 % der Gesamtmasse) im Vergleich zur vegetativen Zelle (70 - 75 % Wasseranteil) wird als eine Ursache für die Hitzeresistenz genannt [6, 11]. Die in der Spore enthaltene Menge an Calcium und Dipicolinsäure konnte von MALLIDIS und SCHOLEFIELD [13] sowie MURRELL und WARTH [14] mit der Hitzeresistenz korreliert werden. Bei einem höheren Gehalt dieser Substanzen wurde eine größere thermische Widerstandsfähigkeit gemessen [11, 13, 14]. In Anwesenheit von Dipicolinsäure und Calcium-Chelatkomplexen dieser Säure wurde in vitro eine Reduzierung der normalen molekularen Beweglichkeit der DNA gefunden. Bei höheren Konzentrationen wurde keine Beweglichkeit mehr beobachtet [15]. SAPRU und LABUZA [16, 17] haben mit Hilfe der "Polymer Glass-Transition" Theorie einen glasartigen Zustand für das Protoplasma von Bakteriosporen vorhergesagt. Demnach liegt oberhalb der Glasübergangstemperatur  $T_g$  der Protoplast in viskosem, flüssigem, unterhalb in einem amorphen, glasartigen Zustand vor. Nach ihren Berechnungen entspricht die Temperatur  $T_g$  in etwa der Aktivierungstemperatur der jeweiligen Sporenart. Nach diesem Modell ist die Temperaturabhängigkeit der Hitzeinaktivierungsrate durch die WLF-Gleichung (WILLIAMS, LANDEL und FERRY) [18] beschreibbar, die zuerst bei rheologischen Eigenschaften glasartiger Polymere verwendet wurde. Es ist bisher aber noch nicht gelungen, diese Hypothese durch Messungen an Sporen zu belegen. Der genaue Zustand des Protoplasten ist unbekannt und bisher der direkten Messung nicht zugänglich.

### 2.1.1.2 *Bacillus stearothermophilus*

*Bacillus stearothermophilus* ist eine Art der Gattung *Bacillus*, die zur Familie der *Bacillaceae* gehört. *Bacillus stearothermophilus* ist ein sporenbildendes, grampositives Stäbchen. Es ist ellipsoid geformt mit einer Breite von 0,6 - 1  $\mu\text{m}$  und einer Länge zwischen 2  $\mu\text{m}$  und 3,5  $\mu\text{m}$ .

Die Sporen werden in der Mutterzelle endständig gebildet und besitzen eine sehr große Hitzeresistenz ( $D(121\text{ °C}) = 250\text{ s}$ ; D-Wert: vergleiche Kapitel 2.1.3.1). Wachstum findet bei aerobem Stoffwechsel im neutralen pH-Bereich bei Temperaturen von 40 - 65 °C mit einem Optimum bei 56 °C statt. In Böden, in heißen Quellen, im Wüstensand, sogar in arktischen Gewässern, im Meeresboden, in Lebensmitteln und in Kompost kommen Sporen von *Bacillus stearothermophilus* vor [8]. Für Mensch oder Tier sind Bakterien der Art *Bacillus stearothermophilus* nicht pathogen. In Konserven kann bei einer Lagerung über 40 °C ein "flat-sour" Verderb durch geringe Säuerung ohne Gasbildung auftreten [9].

Bei der Sterilisation wird *Bacillus stearothermophilus* wegen der großen Hitzeresistenz seiner Sporen als Leitkeim verwendet. Zur Beurteilung des Sterilisationsvorganges kann in Laboruntersuchungen die Reduktion der Zahl seiner Sporen geprüft werden. Für den Einsatz im Labor ist es von Vorteil, daß der Keim nicht pathogen ist.

### **2.1.2 Einflüsse auf die Hitzeresistenz von Sporen**

Die Einflußfaktoren auf die Hitzeresistenz von Sporen sind vielfältig. In den folgenden Kapiteln sind die wichtigsten Parameter beschrieben. Grundsätzlich bilden Bacillusarten mit höheren optimalen Wachstumstemperaturen auch Sporen mit größerer thermische Widerstandsfähigkeit [11]. Auch Sporen von verschiedenen Stämmen einer Art können bei gleicher optimaler Wachstumstemperatur eine unterschiedliche Hitzeresistenz aufweisen [19]. Weiter wird die in Versuchen bestimmte Hitzeresistenz von der Aktivierung der Sporen und der Art des Erhitzens beeinflusst [10, 19]. Die Hitzeresistenz wird im folgenden durch die dezimale Reduktionszeit  $D$  charakterisiert. Der  $D$ -Wert ist die Zeit, die man benötigt, um 90 % einer Population unter den angegebenen konstanten Bedingungen abzutöten. Größere Hitzeresistenz bedeutet größere dezimale Reduktionszeit.

### 2.1.2.1 Sporulationsbedingungen

Werden *Bacillus stearothermophilus* Sporen auf festen Nährböden gezüchtet, ist ihre Hitzeresistenz größer als diejenige der in einem flüssigen Nährmedium gleicher Zusammensetzung gezüchteten Sporen [20]. COOK und GILBERT [21] konnten für Sporen dieser Art eine Zunahme der thermischen Widerstandsfähigkeit bei Erhöhung der Sporulationstemperatur zeigen. MURRELL und WARTH [14] beobachteten dies auch bei Sporen anderer Arten. Auch die Zusammensetzung des Sporulationsmediums verändert die Hitzeresistenz der Sporen. Bei Zugabe von Calcium und Mangan wurde ein Anstieg, bei Anreicherung mit Phosphat eine Reduzierung der Hitzeresistenz beobachtet [11, 22]. Das veränderte Absterbeverhalten durch die unterschiedlichen Bedingungen der Sporulation wird auf unterschiedliche Zusammensetzung und Struktur der Sporen zurückgeführt [19].

### 2.1.2.2 Wasseraktivität des Erhitzungsmediums

Die Wasseraktivität ( $a_w$ -Wert) des Erhitzungsmediums hat einen starken Einfluß auf die Hitzeresistenz der Sporen. In Abbildung 2-3 ist das am Beispiel von *Bacillus subtilis* Sporen dargestellt. Die Hitzeresistenz steigt bei  $a_w = 0,2$  auf das  $10^8$ -fache gegenüber  $a_w = 1$  an. Das Maximum im Bereich der  $a_w$ -Werte 0,2 - 0,4 ist für alle Arten von Sporen typisch [23, 24, 25]. MURRELL und SCOTT [23] vermuten, daß diese Maxima dadurch entstehen, daß alle in der Spore vorkommenden Wassermoleküle die Proteine und Proteinkomplexe als Hydratwasser stabilisieren. Sinkt der  $a_w$ -Wert weiter ab, wird ein Teil dieses Hydratwassers der Spore entzogen, und es kommt zu einer größeren Beweglichkeit der Proteinmoleküle, während bei einer Zunahme des Wassergehalts in der Spore die Proteine und Proteinkomplexe infolge der Verdünnung beweglicher sind. An diesen Maxima liegt der Unterschied in der Hitzeresistenz zwischen den verschiedenen Arten nur noch beim Faktor 10. Bei  $a_w = 1$  variiert die Hitzeresistenz zwischen den verschiedenen Arten um den Faktor  $10^5$  [23].

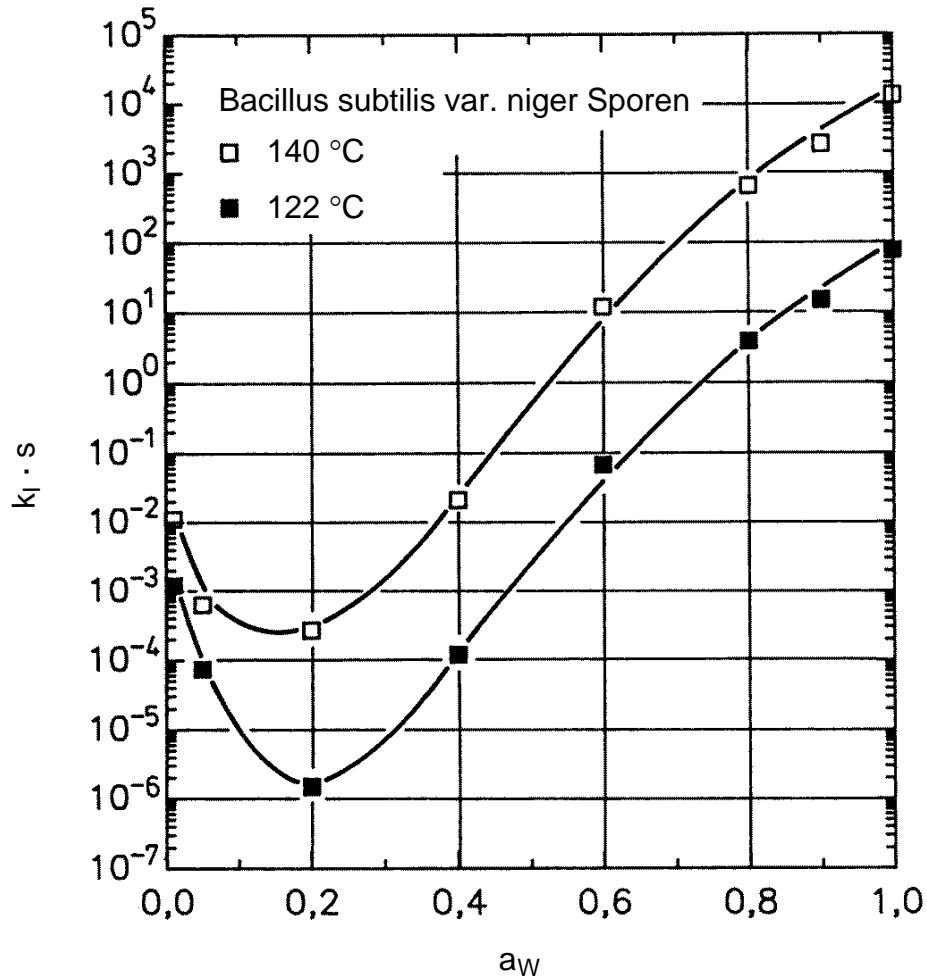


Abb. 2-3: Hitzeresistenz (Geschwindigkeitskonstante  $k_I$  der Inaktivierungsreaktion) von *Bacillus subtilis* var. niger Sporen für  $a_w$ -Werte von 0 bis 1 [26].

Bei gleichen  $a_w$ -Werten wurden für Sporen eines Stammes Unterschiede der Hitzeresistenz gefunden, wenn verschiedene Substanzen zur Einstellung der Wasseraktivität verwendet wurden [23, 25, 27]. Verantwortlich gemacht wird dafür die chemische Struktur des osmotisch aktiven Stoffes [27].

### 2.1.2.3 Glaszustand

Eine weitere Ursache für die große Hitzeresistenz bakterieller Sporen bei niedrigen Wasseraktivitäten kann sein, daß das Protoplasma einen amorphen, glasartigen Zustand annimmt (glassy state). Der Wasserentzug verstärkt die Wechselwirkungen zwischen den Komponenten des Protoplasmas. Das führt zu einer spezifischen Stabilisierung und einer Erhöhung der Glasübergangs-Temperatur. Dipicolinsäure (DPA) und Kalziumdipicolinat (CaDPA), ein Chelatkomplex, werden in der Literatur als stabilisierende Substanzen genannt [28, 29, 30].

Es gibt einige Faktoren, die mit der hohen Hitzeresistenz in Verbindung gebracht werden, die auch für den Glaszustand zutreffen. So schloß MURRELL [31] aus dem Vergleich von Röntgen-Stuktur-Analysen von Sporenprotoplasten und Material aus Sporenhüllen von *Bacillus subtilis* und *Bacillus stearothermophilus*, daß es kaum Anzeichen für eine kristalline Struktur im Protoplasma gibt. Die von KADOTA und IJIMA [32] beobachtete kristalline Struktur führt er darauf zurück, daß eine direkte Untersuchung des Protoplasten mittels Röntgen-Stuktur-Analyse bei Sporen mit Sporenhülle infolge der kristallinen Struktur der Sporenhülle unmöglich ist. MURRELL [31] vermutet, daß KADOTA und IJIMA [32] die kristalline Struktur der Sporenhülle als Protoplasmastruktur interpretiert haben. Eine Kristallisation des Sporenprotoplasten während der Trocknung würde darüber hinaus zu ungewöhnlich hohen Spannungen führen, die die Lebensfähigkeit der Sporen bedrohen [17].

CARSTENSEN et al. [33] konnten durch Untersuchung der dielektrischen Eigenschaften von Sporen zeigen, daß Ionen und kleine gelöste Moleküle im Protoplasma vor der Keimung immobilisiert sind. Im Glaszustand ist die Mobilität von gelösten Stoffen stark eingeschränkt [34].

<sup>31</sup>P-NMR (Nuclear Magnetic Resonance) Untersuchungen zeigen, daß die Anwesenheit von DPA- und CaDPA die Torsionsbeweglichkeit der DNA reduziert [30]. Bei hohen DPA und CaDPA-Konzentrationen konnte selbst bei  $a_w = 0,98$  keine Beweglichkeit der DNA mehr festgestellt werden [15]. Dies deutet auf einen starren Komplex aus DPA und

der Nukleotidkette hin. Gehen Polymere in den Glaszustand über, kann ebenfalls keine Beweglichkeit der Moleküle festgestellt werden [34].

Die Beziehung zwischen Wassergehalt und Glasübergangs-Temperatur, die in Abbildung 2-4 dargestellt ist, veranschaulicht, daß bei der Erhitzung von Sporen in einem trockenen Heißgasstrom der Glaszustand auch bei hohen Temperaturen erhalten bleiben kann, wenn der Wassergehalt schnell genug abnimmt [35].

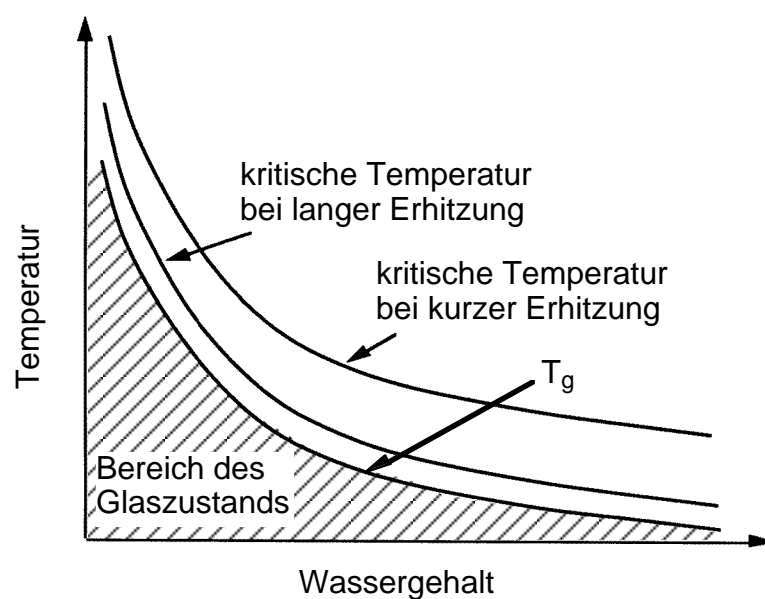


Abb. 2-4: Zusammenhang zwischen Wassergehalt und Glasübergangs-Temperatur  $T_g$ . Der Glaszustand geht bei Überschreiten der Glas-Übergangs-Temperatur verloren, das Material verhält sich dann wie eine Schmelze. Kurzzeitig kann diese Temperatur jedoch überschritten werden, ohne daß der Glaszustand verlassen wird [35].

#### 2.1.2.4 pH-Wert des Erhitzungsmediums

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Hitzeresistenz der Sporen ist sehr stark. In Tabelle 2-1 sind für *Bacillus stearothermophilus* Sporen D- und z-Werte (siehe Kapitel 2.1.3.1) bei verschiedenen pH-Werten aus der Literatur zusammengestellt.



Tabelle 2-1 D- und z-Werte bei verschiedenen pH-Werten für *Bacillus stearothermophilus*.

Autor	Stamm	Erhitzungsmedium	pH	(°C)	D (s)	z (°C)
MAYOU JEZESKI, 1977 [36]	NCA 1518	0,01 M PO <sub>4</sub> -Puffer	6,5		228	
		0,01 M PO <sub>4</sub> -Puffer	7,2		234	
		rekonstituierte Magermilch	6,5		144	
		rekonst. Magermilch	7,2	121	252	
		Magermilch	6,0		150	
		Magermilch	6,5		210	
		Magermilch	7,2		312	
PFLUG und SMITH, 1977 [37]	ATCC 7953	5 % Glucose + 0,9 % NaCl	4,7		78	11,4
		5 % Glucose	5,0		145	10,3
		5 % Glucose+ Ringerlsg. + Lactat	5,1		127	11,3
		Wasser		121	179	8,4
		Sörensen PO <sub>4</sub> -Puffer	7,0		202	7,6
		Butterfield PO <sub>4</sub> -Puffer	7,2		283	9,3
SRIMANI + LONCIN, 1980 [38]		entmineralis. Wasser	7,2		16200	
		Mc Ilvaine-Puffer	6,5		10020	
		Mc Ilvaine-Puffer	5,9	100	5880	
		Mc Ilvaine-Puffer	5,7		4500	
		Mc Ilvaine-Puffer	4,8		1140	
MICHIELS et al., 1985 [39]			8,0		288	7,5
			7,0		204	7,1
			6,2	121	132	7,9
			5,2		102	7,2
			4,0		54	9,5
			3,2		18	10,5
COOK und GILBERT, 1968a [21]	NCIB 8919	Mc Ilvaine-Puffer	8,0		462	
		Mc Ilvaine-Puffer	7,0		552	
		Mc Ilvaine-Puffer	6,0	115	444	
		Mc Ilvaine-Puffer	5,0		252	
		0,066 M Sörensen-Puffer	7,0		678	
		0,066 M Sörensen-Puffer	6,0		648	
CERNY, 1980 [40]	Merck 11499	0,1 NaOH / Glycin	9,0		90	8,1
		Phosphat-Puffer	7,0	121	70	8,0
		Phosphat-Puffer	5,0		35	9,1
		0,1 m Glycin / HCl	3,0		15	11,4
HAAS [3], 1992	Merck 11499	Mc Ilvaine-Puffer	7,0		106,1	8,1
		Mc Ilvaine-Puffer	5,0	121	41,0	9,5
		Mc Ilvaine-Puffer	3,0		15,9	14,9
BEHRINGER + KESSLER, 1992 [41]	DSM 1550	Magermilch + Milchsäure	6,28		168	7,38
		Magermilch	6,68	120	246	7,54
		Magermilchkonzentrat	6,28		154	7,89
		Magermilchk. + NaOH	6,68		170	7,47

### Hitzeresistenz bei unterschiedlichen pH-Werten

Mit zunehmender Acidität nimmt die Hitzeresistenz der Sporen ab [21, 24, 38, 40, 41, 42, 43]. SRIMANI und LONCIN [38] konnten für *Bacillus stearothermophilus* Sporen eine exponentielle Abhängigkeit der Hitzeresistenz vom pH-Wert zeigen.

In alkalischen Lösungen ist die Hitzeresistenz ebenfalls geringer als im neutralen Bereich, der Abfall der Hitzeresistenz ist jedoch bezogen auf die pH-Wert-Änderung geringer als in sauren Lösungen [21, 27].

Über die Auswirkungen der Wasserstoffionenkonzentration auf die Temperaturabhängigkeit der Hitzeresistenz (z-Werte, siehe Kapitel 2.1.3.1) werden in der Literatur [1, 3, 19, 40] widersprüchliche Angaben gemacht. CONDON und SALA [1] fanden für Lebensmittel keinen Einfluß, aber für Mc Ilvaine-Pufferlösungen eine Erhöhung der z-Werte bei niedrigeren pH-Werten.

### Hitzeresistenz bei konstanten pH-Werten

Wie beim  $a_w$ -Wert ist auch bei gleichen pH-Werten ein Einfluß der chemischen Struktur der zum Ansäuern eingesetzten Substanzen zu beobachten. Bei konstantem pH-Wert werden Sporen von *Bacillus stearothermophilus* in Mc Ilvaine-Zitronensäure-Phosphat-Puffer schneller abgetötet (D (115 °C) = 444 s) als in 0,066 M Sörensen-Puffer (D (115 °C) = 648 s) [21]. STEINBUCH [44] stellte bei pH = 3,5 in 0,06 M Milchsäure eine stärkere Abtötungswirkung auf *Bacillus stearothermophilus* Sporen als in 0,026 M Salzsäure fest. Bei Untersuchungen mit erhöhten Konzentrationen von Milchsäure und durch Zusatz puffernder Stoffe bei pH = 3,5 fand er eine drastische Erhöhung der Abtötungsgeschwindigkeit. Das Ergebnis war unabhängig von der Art der puffernden Substanzen. ANDERSON et al. [24] führten mit Sporen von *Bacillus thermoacidurans* Versuche in Tomatensaft durch, der mit Milch-, Essig- und Zitronensäure auf einen pH-Wert von 3,8 eingestellt wurde. Die ermittelte Letalrate sank dabei von Essig- über Milch- zu Zitronensäure ab.

### Mögliche Mechanismen

Zu den Auswirkungen des Säuregehaltes des Erhitzungsmediums auf die Hitzeresistenz von Sporen gibt es verschiedene Überlegungen. BEHRINGER und KESSLER [41] stellen zwei Erklärungen vor. Eine ist, daß das Absenken des pH-Wertes die Neutralisation von negativ geladenen Carboxylgruppen der Peptidoglykane in der Sporencortex bewirkt (Abb. 2-5).

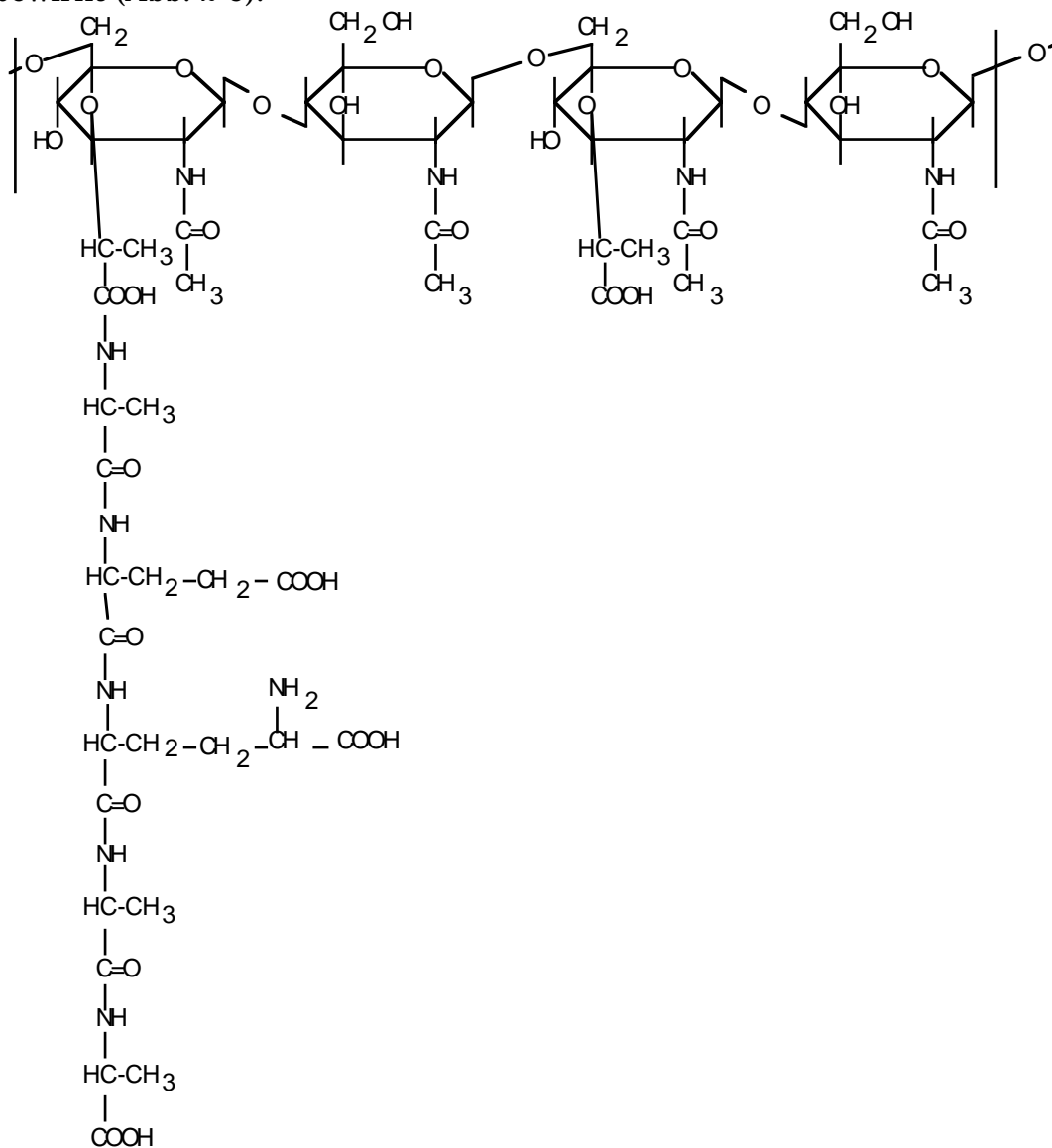


Abb. 2-5: Struktur vom Peptidoglykan der Sporencortex [14].

Die Reduzierung der Zahl geladener Gruppen vergrößert den osmotischen Druckunterschied an der Protoplasmamembran, so daß sich der

Wassergehalt in der Spore erhöht und deren Zerstörung ermöglicht. Diese Erklärung geht von der Voraussetzung aus, daß der geringe Wassergehalt der Sporen für die Hitzeresistenz verantwortlich ist. Die andere Überlegung sieht die Destabilisierung der Enzyme des Keimungsmechanismus durch die Absenkung des pH-Wertes als Begründung an [41].

SILLA [12] und HUTTON et al. [43] sehen die Ursache in einer durch die sauren Bedingungen hervorgerufenen, teilweisen Demineralisierung der Sporen. Da die Konfiguration und Stabilität von Nukleinsäuren durch eine ionische Umgebung beeinflußt wird, könnte der Verlust von Ionen die DNA destabilisieren und ihre Hitzeempfindlichkeit steigern.

Aus ihren Versuchen bei konstanten pH-Werten schließen STEINBUCH [44] und ANDERSON et al. [24] auf die toxische Wirkung der undissoziierten Säure, die aufgrund der polaren Struktur der Sporenhülle weniger stark zurückgehalten wird als die dissoziierte Säure.

### **2.1.2.5 Chemische Zusammensetzung des Erhitzungsmediums**

Die chemische Zusammensetzung des Erhitzungsmediums (Medium, in dem die Sporen während des Erhitzens suspendiert sind) hat großen Einfluß auf die Hitzeresistenz von Sporen, wie schon für Bedingungen konstanter pH-Werte und konstanter  $a_w$ -Werte beschrieben wurde. Weitere Einflußgrößen sind hierbei die Ionenstärke beziehungsweise der Salzgehalt, das Redoxpotential und der Fettgehalt des Erhitzungsmediums.

#### Ionenstärke, Salzgehalt

ORDAL und LECHOWICH [22] erhielten deckungsgleiche Abtötungskurven für das Erhitzen von *Bacillus coagulans* var. *thermoacidurans* in 0,025 M Phosphat-Puffer und 0,005 M Phosphat-Puffer, dem bis zur Ionenstärke des 0,025 M Puffers NaCl, KCl, NaSO<sub>4</sub> und Na<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> zuge-

setzt worden war. Die Abtötung in 0,025 M Phosphat-Puffer war geringer als diejenige in höher und niedriger konzentrierten reinen Phosphat-Puffern. Sie schließen daher auf den Einfluß der Ionenstärke und des osmotischen Druckunterschieds zwischen Lösung und Protoplasma in der Spore.

### Redoxpotential

Das Redoxpotential einer Substanz ist ein Maß für ihr Vermögen, einen anderen Stoff zu oxidieren beziehungsweise zu reduzieren.

Wasserstoffperoxid, ein starkes Oxidationsmittel, tötet Sporen nach einer Reaktionskinetik 1. Ordnung ab. Mit steigender Temperatur erhöht sich die Abtötungsrate, jedoch führen hohe Temperaturen zum Zersetzen von  $H_2O_2$  und damit zu einem Absinken der Abtötungsrate. Wasserstoffperoxid löst die Sporenhülle auf und zerstört so die Sporen. Aktivierte Sporen werden schon vor dem Auflösen der Sporenhülle abgetötet [45].

Reduzierende Stoffe können die Disulfidbrücken der Sporenhülle aufbrechen und so ihre Empfindlichkeit gegenüber dem Einwirken chemischer Substanzen erhöhen. Das erhöht die Abtötungsgeschwindigkeit bei chemischen Desinfektionvorgängen. Ein Vermindern der Hitzeresistenz in Anwesenheit reduzierender Stoffe konnte nicht beobachtet werden. [45].

### Fette

Die Hitzeresistenz von Sporen in fetthaltigen Gemischen ist größer als in bis auf den Fettanteil gleichen Gemischen [46, 47]. SENHAJI und LONCIN [46] konnten dies auf den Wassergehalt des Fettes zurückführen. Entscheidend für die erzielbare Abtötungsgeschwindigkeit ist unter anderem die Wasseraktivität in unmittelbarer Umgebung der Spore. Der Diffusionskoeffizient des Wassers in Öl ist etwa drei Zehnerpotenzen kleiner als die Temperaturleitfähigkeit des Öls, deshalb sinkt beim Erhitzen die Wasseraktivität in der Fettphase stark ab, was

die Hitzeresistenz erhöht [48]. Nach RUSSEL [11] wird die Sporenabtötung in trockener Hitze (wasserfrei) durch Oxidationsreaktionen verursacht. Der Einfluß der Temperatur auf diese Reaktion ist geringer als auf die Mikroorganismenabtötung in wäßrigen Lösungen. Die Aktivierungsenergie im Arrhenius-Ansatz ist für die chemische Reaktion (etwa 80 kJ/mol) kleiner als für die Mikroorganismenabtötung in wäßrigen Lösungen (etwa 250 kJ/mol). Die Sporenabtötung in Fetten hat etwa die gleiche Aktivierungsenergie wie chemischen Reaktionen [47]. ABABOUC und BUSTA [47] fanden ebenfalls eine Abhängigkeit vom  $a_w$ -Wert, aber eine unterschiedliche Hitzeresistenz in verschiedenen Ölen mit der gleichen Wasseraktivität. Aus ihren Ergebnissen schlossen sie auf einen Einfluß der Konzentration an freien Fettsäuren.

#### **2.1.2.6 Einfluß der Nachweismethoden auf die beobachtete Abtötungsrate**

Die Bedingungen, unter denen die hitzebehandelten Sporen auskeimen, auswachsen und sich vermehren, beeinflussen ebenfalls das Resultat von Abtötungsversuchen. Die Überlebendkeimzahl wird im wesentlichen durch die Nährstoffzusammensetzung, den pH-Wert und den Salzgehalt des Nachweismediums sowie die Dauer und Temperatur der Bebrütung beeinflusst [21, 49, 50, 11, 43, 42].

#### **2.1.2.7 Weitere Einflußfaktoren**

Auswirkungen auf die Ergebnisse von Untersuchungen der Hitzeresistenz von Sporen können die Geschwindigkeit und die Höhe der Temperaturänderung von der Umgebungs- auf die Erhitzungstemperatur [51] und die Ausgangskonzentration der Sporen im Erhitzungsmedium [52] haben. Eine Absenkung der Vorlagentemperatur bei gleichbleibender Erhitzungstemperatur führt zur Abnahme der Resistenz [51]. Für zwei verschiedene Sporenarten wurde eine Zunahme der thermischen Widerstandsfähigkeit mit höherer Ausgangskonzentration an Sporen beobachtet [52]. Die Autoren geben keine Ursachen für dieses Verhalten an.

### 2.1.3 Reaktionskinetische Modelle zur Beschreibung der Hitzeinaktivierung von Sporen

Am häufigsten wird zur Beschreibung der Reaktionskinetik der thermischen Abtötung von Mikroorganismen das Inaktivierungs-Modell verwendet. Es geht von einer Reaktion 1. Ordnung aus. Bei Untersuchungen zur Abtötung von Bakteriensporen wurden zum Teil Abweichungen von dieser Kinetik gefunden [11, 45], was zu einer Vielzahl von Reaktionsmodellen führte (vergleiche HAAS [3]). Für Sporen von *Bacillus stearothermophilus* hat sich bisher das Aktivierungs-Inaktivierungs-Modell als geeignet erwiesen [53, 54, 3, 55, 51].

#### 2.1.3.1 Inaktivierungs-Modell 1. Ordnung

Sporen (S) werden nach einer Reaktion 1. Ordnung (statistischer Ansatz) mit dem Geschwindigkeitsfaktor  $k_I$  inaktiviert ( $S_I$ ).



Der Geschwindigkeitsfaktor  $k_I$  ist von der Temperatur abhängig. Die Reaktion wird durch die folgende Gleichung beschrieben:

$$\frac{dN}{dt} = -k_I(T) \cdot N \quad (2-2)$$

$N$  ist die Anzahl der in einer Masseinheit enthaltenen Sporen. Nach Integration für eine konstante Inaktivierungstemperatur in den Grenzen von 0 bis  $t$  und  $N_0$  bis  $N$ , mit

$$N_0 = N(t = 0) \quad (2-3)$$

folgt:

$$\ln \frac{N}{N_0} = -k_I(T) \cdot t \quad (2-4)$$

beziehungsweise:

$$n = \lg \frac{N}{N_0} = -\frac{t}{D(T)} \quad (2-5)$$

mit  $n$  = Überlebensrate

$$D(T) = \frac{\ln 10}{k_I(T)} \quad (2-6)$$

$D$  ist die dezimale Reduktionszeit, die Zeit, die nötig ist, um die Zahl der Sporen bei festgelegten konstanten Bedingungen (Temperatur, pH-Wert,  $a_w$ -Wert usw.) um eine Zehnerpotenz zu reduzieren. Im sogenannten Überlebensdiagramm, dem  $\lg(N/N_0)$  -  $t$  - Diagramm, ergibt sich aus Gleichung (2-5) eine lineare Überlebenskurve mit der Steigung  $-1/D$  (Abb. 2-6).

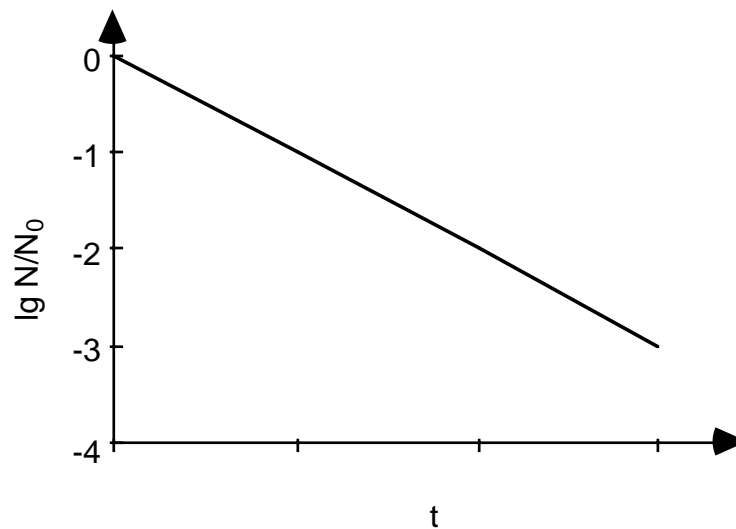


Abb. 2-6: Schematischer Verlauf der Überlebensrate  $n = \lg(N/N_0)$  in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  bei Inaktivierung nach einer Reaktion 1. Ordnung.

Die Temperaturabhängigkeit des Geschwindigkeitsfaktors  $k_I$  wird durch den Arrhenius-Ansatz beschrieben:

$$k_I(T) = k_{I0} \cdot \exp\left(-\frac{E_I}{RT}\right) \quad (2-7)$$



$k_{I0}$  ist der präexponentielle Faktor,  
 R die allgemeine Gaskonstante und  
 $E_I$  die Inaktivierungsenergie, d.h. die Aktivierungsenergie der Inaktivierungsreaktion.

Die Inaktivierungsenergie kann aus der Steigung im Arrhenius-Diagramm ermittelt werden. In diesem Diagramm wird der Geschwindigkeitsfaktor logarithmisch über der reziproken Temperatur aufgetragen (Abb. 2-7).

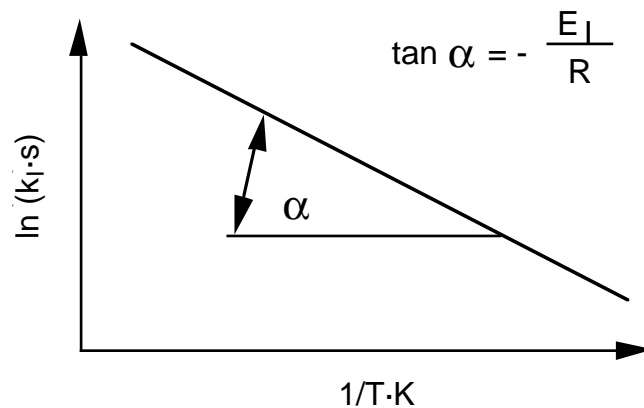


Abb. 2-7: Arrhenius-Diagramm, Bestimmung der Inaktivierungsenergie.

Die Temperaturerhöhung  $\Delta T = T_1 - T_2$ , die notwendig ist, um den D-Wert auf 1/10 zu reduzieren, wird als z-Wert bezeichnet:

$$z = \frac{T_1 - T_2}{\lg \frac{D(T_2)}{D(T_1)}} \quad (2-8)$$

Mit

$$\lg \frac{D(T_2)}{D(T_1)} = \lg \frac{k_I(T_1)}{k_I(T_2)} \quad (2-9)$$

und

$$\lg \frac{k_I(T_1)}{k_I(T_2)} = \frac{E_I \cdot (T_1 - T_2)}{\ln 10 \cdot R \cdot T_1 \cdot T_2} \quad (2-10)$$

folgt

$$z = \frac{\ln 10 \cdot R \cdot T_1 \cdot T_2}{E_I} \quad (2-11)$$

$T_1$  wird als Referenztemperatur, in der Regel 121,1 °C, vorgegeben.

Im Gegensatz zum Arrhenius-Konzept wird beim z-Wert-Konzept die Temperaturabhängigkeit des z-Wertes vernachlässigt. Nach Gleichung (2-8) gilt

$$\lg \frac{D(T_2)}{D(T_1)} = \frac{T_1 - T_2}{z} \quad (2-12)$$

Der z-Wert wird als konstant angenommen (Abb. 2-8). Diese Annahme ist nur für geringe Temperaturunterschiede in guter Näherung zulässig.

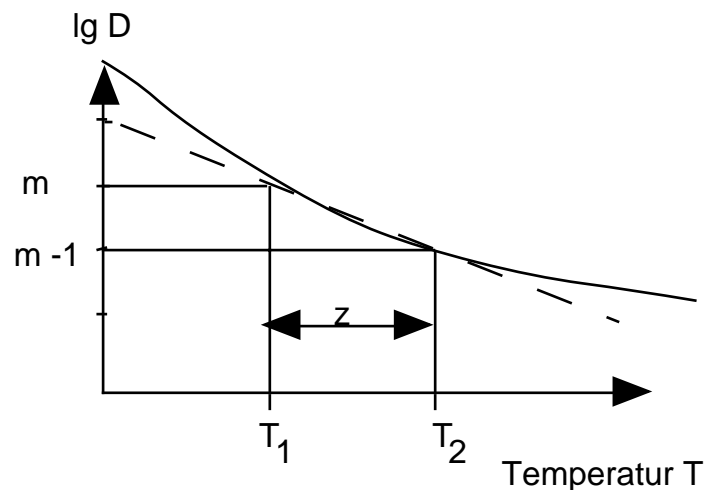


Abb. 2-8: Temperaturabhängigkeit der dezimalen Reduktionszeit, Bestimmung des z-Wertes. Gestrichelte Linie: z-Wert-Konzept, durchgezogene Linie: Arrhenius-Konzept.

Die nach dem Arrhenius- und dem z-Wert-Konzept berechneten D-

Werte unterscheiden sich in Abhängigkeit von der gewählten Referenztemperatur und der Differenz zwischen Halte- und Referenztemperatur. Die nach dem Arrhenius-Konzept berechneten D-Werte sind immer größer als diejenigen nach dem z-Wert-Konzept ermittelten.

Vom linearen Verlauf der Überlebenskurve abweichende Messungen werden in der Praxis häufig gefunden [11, 45, 3]. Einige typische Verläufe sind in Abbildung 2-9 zusammengestellt.

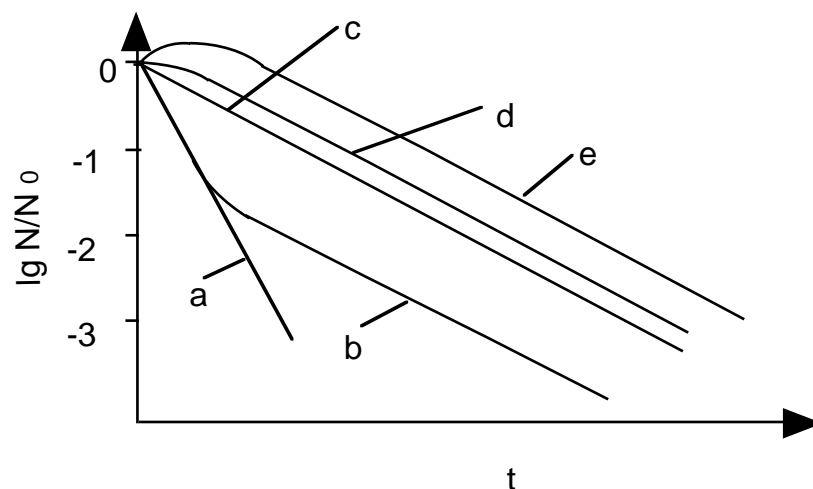


Abb. 2-9: Häufig auftretende Überlebenskurven [53]:

Typ a, c: Reaktion 1. Ordnung;

Typ b: biphasige Kurve;

Typ d, e: Schulterkurven

Kurven des Typs b ergeben sich beispielsweise bei der Mischung zweier Bakterienstämme unterschiedlicher Hitzeresistenz. Dieser Kurvenverlauf wird auch als biphasig bezeichnet. Der erste lineare Teil der Kurve beschreibt hauptsächlich den Organismus mit geringerer Hitzeresistenz, der zweite, flachere lineare Teil denjenigen mit der größeren thermischen Widerstandsfähigkeit. Schulterkurven (Typ d, e) nähern sich für lange Zeiten einer Geraden an. In Anlehnung an das Inaktivierungs-Modell 1. Ordnung werden diese Kurven oft durch den scheinbaren D-Wert ( $D_{app}$ ), der aus der Steigung der Näherungsgeraden für lange Zeiten bestimmt wird, und der für diese Gerade bestimmten extrapolierten Überlebensrate  $n_{ex}$  bei  $t = 0$  beschrieben [53, 51, 54].

### 2.1.3.2 Aktivierungs-Inaktivierungs-Modell

Während das Inaktivierungs-Modell von der Annahme ausgeht, daß alle in einer Sporensuspension enthaltenen Sporen auch durch die Keimzahlbestimmung erfaßt werden, erklären SHULL et al. [54] Schulterkurven (Abb. 2-9 Typ d, e) durch die Hitzeaktivierung ruhender ("dormant") Sporen und dem gleichzeitigen Abtöten aktivierter Sporen. Die ruhenden Sporen sind zwar lebensfähig, aber unter den herrschenden Bedingungen nicht aktiviert, das heißt, sie können nicht auskeimen. Daher werden sie bei einer Keimzahlbestimmung nicht nachgewiesen. Die Existenz solcher Sporen konnte HAAS [3] durch Vergleich von Keimzahlbestimmungen nach dem Plattengußverfahren und mittels einer Zählkammer unter dem Mikroskop für Sporen von *Bacillus stearothermophilus* bestätigen. Es bleibt aber die Unsicherheit, ob es sich dabei um ruhende oder während der Lagerung abgestorbene Sporen handelt.

Beim Aktivierungs-Inaktivierungs-Modell wird von einer Zahl  $N$  in einer Keimzahlbestimmung nachweisbarer, aktivierter Sporen und der Zahl  $M$  nicht in einer Keimzahlbestimmung nachweisbarer, ruhender Sporen ausgegangen. Aktivierung und Inaktivierung werden durch Reaktionen 1. Ordnung mit den Geschwindigkeitsfaktoren  $k_A$  und  $k_I$  beschrieben.



mit  $M$  = Zahl der ruhenden Sporen,  
 $N$  = Zahl der aktivierten Sporen,  
 $N_I$  = Zahl der inaktivierten Sporen

$$dM = -M \cdot k_A \cdot dt \quad (2-14)$$

$$dN_I = -N \cdot k_I \cdot dt \quad (2-15)$$

Für den Zeitpunkt  $t = 0$  gilt:

$$N_0 = N(t = 0) \quad (2-16)$$

$$M_0 = M(t = 0) \quad (2-17)$$

Die Änderung der Zahl der nachweisbaren Sporen wird beschrieben durch:

$$dN = dN_I - dM \quad (2-18)$$

Mit (2-14) und (2-15) ergibt sich

$$dN = -N \cdot k_I \cdot dt + M \cdot k_A \cdot dt \quad (2-19)$$

Integration von Gleichung (2-14) für die Anfangsbedingung (2-17) liefert

$$M = M_0 \cdot \exp(-k_A \cdot t) \quad (2-20)$$

Damit folgt für Gleichung (2-19)

$$\frac{dN}{dt} + N \cdot k_I = k_A \cdot M_0 \cdot \exp(-k_A \cdot t) \quad (2-21)$$

Die Integration dieser Gleichung mit der Anfangsbedingung (2-16) ergibt

$$N = \frac{k_A}{k_I - k_A} \cdot M_0 \cdot \exp(-k_A \cdot t) + \left(N_0 - \frac{k_A}{k_I - k_A} M_0\right) \cdot \exp(-k_I \cdot t) \quad (2-22)$$

Wird mit  $\tau$  das Ruheverhältnis, das Verhältnis der Zahl der ruhenden zu der Zahl der aktivierten Sporen zum Zeitpunkt  $t = 0$ , bezeichnet

$$\tau = \frac{M_0}{N_0} \quad (2-23)$$

$\tau =$  Ruheverhältnis

und der Faktor  $\alpha$  eingeführt

$$\alpha = 1 - \frac{k_A}{k_I - k_A} \cdot \tau \quad (2-24)$$

folgt für das Überlebensverhältnis:

$$\frac{N}{N_0} = (1 - \alpha) \cdot \exp(-k_A \cdot t) + \alpha \cdot \exp(-k_I \cdot t) \quad (2-25)$$

ABRAHAM et al. [53] können ihre experimentellen Ergebnisse zur Hitzeresistenz von *Bacillus stearothermophilus* mit Gleichungen der Art

$$\frac{N}{N_0} = y_0 \cdot \exp(-k_\infty \cdot t) + (1 - y_0) \cdot \exp(-k_0 \cdot t) \quad (2-26)$$

unter der Voraussetzung

$$k_\infty < k_0 \quad (2-27)$$

darstellen.  $k_\infty$  ist die Steigung des linearen Teils der Überlebenskurve (Schulterkurve),  $k_0$  ist die Anfangssteigung bei  $t = 0$  und  $y_0$  ist der aus dem linearen Teil der Kurve bis  $t = 0$  extrapolierte Wert des Überlebensverhältnisses.  $k_0$  und  $k_\infty$  können die Geschwindigkeitsfaktoren  $k_A$  und  $k_I$  zugeordnet werden, da das Ruheverhältnis unabhängig von der Inaktivierungstemperatur ist. Dabei müssen zwei Fälle unterschieden werden:

Fall 1: Die Inaktivierung ist die langsamere und damit geschwindigkeitsbestimmende Reaktion.

$$k_I = k_\infty \quad (2-28)$$

$$k_A = k_0 \quad (2-29)$$

$$\alpha = 1 - y_0 \quad (2-30)$$

Fall 2: Die Aktivierung ist die langsamere und damit geschwindigkeitsbestimmende Reaktion.

$$k_A = k_\infty \quad (2-31)$$

$$k_I = k_A \quad (2-32)$$

$$\alpha = y_0 \quad (2-33)$$

Mit diesem Modell können lineare, konvexe und konkave sowie Schulterkurven beschrieben werden (Abb. 2-9). Für  $k_I > k_A$  ergeben sich

verschiedene theoretische Überlebenskurven [53]:

- a: Reaktion 1. Ordnung (Steigung:  $-k_I$ ),  $\tau = 0$ ;
- b: biphasige Kurve (Mischpopulation),  $0 < \tau < (k_I/k_A) - 1$ ;
- c: Gerade mit der Steigung  $-k_A$ ,  $\tau = (k_I/k_A) - 1$ ;
- d: Schulterkurve,  $\tau = (k_I/k_A)$ ;
- e: Schulterkurve,  $\tau > (k_I/k_A)$

Bei den von ABRAHAM et al. [53] und HAAS [3] ermittelten Schulterkurven für *Bacillus stearothermophilus* ist die Aktivierung die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion. Das Ruheverhältnis beträgt circa 8 (ABRAHAM et al.) beziehungsweise 7,2 (HAAS).

#### **2.1.4 Technische Realisierung der Erhitzung von Sporensuspensionen**

Zur Bestimmung der Hitzeresistenz wird die Sporensuspension entweder direkt oder indirekt, kontinuierlich oder diskontinuierlich erhitzt.

##### Indirekte Methoden des Erhitzens

Beim indirekten Erhitzen sind Heizmedium und Sporensuspension durch eine Wärmeübertragerfläche räumlich voneinander getrennt. Erwärmt werden kann absatzweise durch Eintauchen von verschlossenen Ampullen oder Röhrchen in Heizbädern oder kontinuierlich unter Verwendung von Röhren- oder Plattenwärmeübertragern. Durch unterschiedlich lange Verweilzeiten wird bei der kontinuierlichen Methode die Haltezeit variiert.

##### Direkte Methoden des Erhitzens

Zum Aufheizen der Sporensuspension wird diese bei der direkten Erhitzungsmethode in unmittelbaren Kontakt mit einem Heizmedium gebracht. Als solches kann eine Flüssigkeit, zum Beispiel Wasser, das Erhitzungsmedium selbst oder ein Gas, zum Beispiel Wasserdampf,

benutzt werden.

Bei diskontinuierlichen Verfahren werden kleine Mengen der Proben in ein großes Volumen des temperierten Heizmediums gegeben. Die Probe kann durch Zugabe in ein entsprechend gekühltes Verdünnungsmedium abgekühlt werden.

Bei kontinuierlichen Versuchsanlagen wird ein als idealer Rührkessel ausgelegter Mischer verwendet oder die Sporensuspension in einen vorerhitzten Flüssigkeitsstrom eingespritzt. Durch Verdampfen eines Teils der Flüssigkeit in einer evakuierten Expansionskammer kann bei kontinuierlicher und diskontinuierlicher Betriebsweise abgekühlt werden.

Beim Erhitzen der Sporensuspension mit Dampf wird dessen latente Wärme ausgenutzt. Der Dampf kann in die Sporensuspension injiziert oder diese in einer Dampfkammer versprüht werden. Die nachfolgende Abkühlung in einer Expansionskammer wird so geführt, daß sich die Konzentration der Sporensuspension im Vergleich zur Ausgangskonzentration nicht ändert.

Eine Verdünnung der Sporensuspension muß bei der Keimzahlbestimmung berücksichtigt werden. Diese Änderung der Zusammensetzung des Erhitzungsmediums kann die Hitzeresistenz beeinflussen. Für Injektionssysteme sind zudem der Aufheizvorgang und damit auch sein Einfluß auf die Abtötung der Sporen nur schwer beschreibbar.

#### **2.1.4.1 Quasiisotherme Versuchsbedingungen**

Die Abtötung von Mikroorganismen beginnt bei der letalen Temperatur  $T_L$ . Abtötungsversuche zur Bestimmung der Hitzeresistenz werden bei Temperaturen  $T_H$ , die größer als die letale Temperatur sind, durchgeführt. In der Aufheiz- und der Abkühlphase, ab Erreichen der letalen Temperatur  $T_L$ , findet eine Abtötung von Mikroorganismen statt, die bei der Bestimmung der kinetischen Kennwerte berücksichtigt werden muß. Zudem kommt es beim Aufheizen und Abkühlen zur Ausbildung von Temperaturprofilen in der Sporensuspension, die abhängig von der



Form der Probenbehälter und von den Strömungsverhältnissen sind.

Sollen die reaktionskinetischen Parameter direkt aus der Haltezeit, unter Vernachlässigung der Aufheiz- und Abkühlphasen, ermittelt werden, müssen quasiisotherme Prozeßbedingungen herrschen. Diese Bedingungen liegen definitionsgemäß dann vor, wenn weniger als 21 % der Sporen beim Aufheizen und Abkühlen abgetötet werden ( $n > -0,1$ ) [3]. Dieser Fehler ist angesichts der Fehler bei der Keimzahlbestimmung und der Schwankungen der Hitzeresistenz der Mikroorganismen trotz praktisch gleicher Vorgeschichte noch tolerierbar.

## 2.2 Oberflächlich verkeimte Lebensmittel am Beispiel von schwarzem Pfeffer

Die Oberflächen pflanzlicher Lebensmittel, dazu zählen auch Gewürze, werden während des Wachstums oder der Verarbeitung von Mikroorganismen besiedelt. Ein Gewürz mit besonders hoher Keimbelastung ist schwarzer Pfeffer.

### 2.2.1 Die Pfefferpflanze

Pfeffer ist die Steinfrucht eines immergrünen Kletterstrauches (*Piper nigrum* L. aus der Familie *Piperaceae*), der in Südwestindien (Malabar) beheimatet ist, heute jedoch in den Tropenländern beider Hemisphären kultiviert wird.

Die heutigen Hauptanbaugebiete liegen in Indien, Indonesien, Malaysia und Brasilien. Die Bundesrepublik Deutschland importierte 1988 12.558 t Pfeffer. Damit ist Pfeffer das meistverwendete Gewürz. Der jährliche Pro-Kopf-Verbrauch liegt bei 200 g. Pfeffer wird in verschiedenen Zuständen (gemahlen, geschrotet und ganz) als reines Gewürz gehandelt. Ebenso ist Pfeffer Bestandteil vieler Gewürzmischungen. In der Lebensmittelindustrie wird Pfeffer in Konzentrationen bis zu 1 Gew.% eingesetzt. Bei einigen Salami-Sorten liegt der Anteil noch höher. Etwa 75 % der Weltpfefferproduktion (Exportmenge 1987: 110.000 t) entfällt auf schwarzen Pfeffer [56].

Schwarzer Pfeffer wird aus den noch unreifen, grünen, aber schon voll entwickelten, ungeschälten Früchten gewonnen. Sobald sich die ersten Beeren rötlich verfärben, werden die Fruchtstände abgeschnitten und auf Matten oder direkt auf dem Boden in der Sonne ausgebreitet. Beim Trocknen verfärbt sich die grüne Fruchtschale durch enzymatische Oxidationsprozesse schwarz. Die Beeren schrumpfen, und die Oberfläche entwickelt die typische, runzelige Struktur. Der Gewürzertrag aus 100 kg frischen Früchten beträgt 35 kg Handelsware. Nach der Trocknung werden die Beeren durch Abreiben oder Stampfen von den Fruchtstengeln gelöst. Schon beim Wachstum können die Beeren z.B. durch Vogelkot oder luftgetragene Mikroorganismen kontaminiert werden. Beim Trocknungsvorgang ist meist direkter Bodenkontakt

vorhanden, so daß im Erdboden vorkommende Mikroorganismen die Oberfläche der Beeren besiedeln und sich auf der noch feuchten Fruchtschale vermehren können.

Schwarzer Pfeffer riecht charakteristisch aromatisch und schmeckt scharf und brennend. Abbildung 2-10 zeigt den Querschnitt durch die Fruchtwand. Die äußerste Schicht ist eine Epidermis aus leicht tangential gestreckten Zellen mit dicker Außenwand und dunklem Zellinhalt (= Exokarp). Darauf folgt die äußere Steinzellschicht und weiter nach innen ein wenige Zellen breites Parenchym, dessen polygonal gerundeten Zellen Stärke und Harz enthalten. Daran schließt sich eine Schicht tangential gestreckter Parenchymzellen an, die von der 1 bis 2 Zellen breiten Ölzellschicht gefolgt wird. Sie besteht aus großen, polygonal gerundeten Zellen, die Öltropfen enthalten. Weiter nach innen folgt die innere Steinzellschicht (= Endokarp). Sie umschließt die aus einer Lage schmaler, tangential gestreckter Zellen bestehende Samenschale, die den Samenkern enthält [57].

Der weiße Pfeffer wird aus reifen, bei der Ernte gelben bis roten Früchten hergestellt, indem man die Beeren zuerst wäscht und im Anschluß fermentiert. Dabei weicht die harte Fruchtschale auf und läßt sich leicht mechanisch entfernen. Nach nochmaligem Waschen und Trocknen an der Sonne erhält man weißen Pfeffer. Hochwertiger weißer Pfeffer besteht aus glatten, gelblichen bis schmutzigweißen, etwa gleich großen Körnern. Im Vergleich zu schwarzem Pfeffer wird der Geschmack als feiner und die Schärfe als geringer bezeichnet.

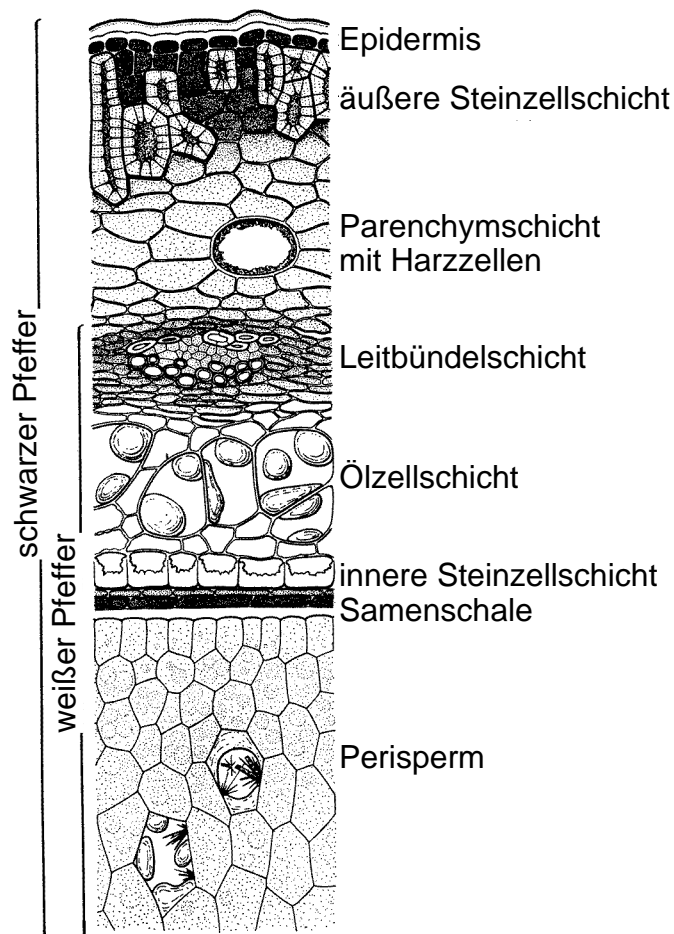


Abb. 2-10: Aufbau eines Pfefferkorns [58].

### 2.2.2 Inhaltsstoffe

Einziges einfach analytisch zu bestimmendes Qualitätsmerkmal für Pfeffer ist der Gehalt an ätherischen Ölen [59]. Das aroma- und geschmacksbestimmende ätherische Öl (Gehalt in schwarzem Pfeffer: 2,0 - 3,5 %; in weißem Pfeffer: 1,8 - 2,9 %) besteht zu 70 - 80 % aus Monoterpenen (Sabinen 21 %,  $\alpha$ -Terpinen 22 %,  $\gamma$ -Terpinen,  $\beta$ -Pinen,  $\Delta^3$ -Caren, Mycren, Limolen u.a.), oxidierten Monoterpenen (Borneol, Carvon, Carvacrol, 1,8-Cineol, Linalool u.a.), bis zu 20 - 30 % aus Sesquiterpenen ( $\beta$ -Caryophyllin 17 %, Humulin,  $\beta$ -Bisabolon u.a.) und oxidierten Sesquiterpenen (Caryophyllinketon, Caryophyllinoxid u.a.). Phenylether (Eugenol, Methyleugenol, Myristicin, Safrol u.a.), Aldehyde und organische Säuren komplettieren die Zahl der bisher über 100

identifizierten Aromakomponenten. Je höher der Monoterpengehalt, desto frischer wird das Pfefferaroma bewertet. In Tabelle 2-2 sind weitere Inhaltsstoffe des Pfefferkorns aufgelistet [56].

Tabelle 2-2: Inhaltsstoffe des Pfefferkorns [56].

		Pfeffer schwarz	Pfeffer weiß
Wasser	[Gew.%]	11	12
Protein	[Gew.%]	11	10,5
Fett	[Gew.%]	3,5	2,0
Ätherisches Öl	[Gew.%]	2,2 - 3,6	1,8 - 2,9
Kohlenhydrate	[Gew.%]	65	69
Rohfaser	[Gew.%]	14	4,3
Asche	[Gew.%]	3,9	1,0
Calcium	[mg/100g]	400	130
Kalium	[mg/100g]	1130	40
Natrium	[mg/100g]	15	5

### 2.2.2.1 Eigenschaften der ätherischen Öle

Ätherische Öle stellen ein Gemisch chemisch unterschiedlicher Substanzen dar. Neben einer großen Zahl miteinander verwandter Terpene und Terpenabkömmlinge finden sich Phenole, Phenolether, Kohlenwasserstoffe, Alkohole, Aldehyde, Ester und Sulfide. Die Vielfalt dieser Stoffe schließt die Möglichkeit aus, auf chemischer Grundlage allgemein gültige Methoden zur Bestimmung der ätherischen Öle zu entwickeln [60]. Meist wird der Gehalt an ätherischen Ölen mittels Wasserdampfdestillation bestimmt. Dabei dient Wasserdampf als Schlepptmittel für die höhersiedenden ätherischen Öle.

Bedingt durch ihre chemische Struktur, z.B. den in den genannten Aromastoffen enthaltenen Doppelbindungen, sind ätherische Öle sehr

reaktionsfreudig. Um dies zu veranschaulichen, ist in Abbildung 2-11 der Molekülaufbau von Isopren gezeigt, von dem sich die Terpene ableiten:

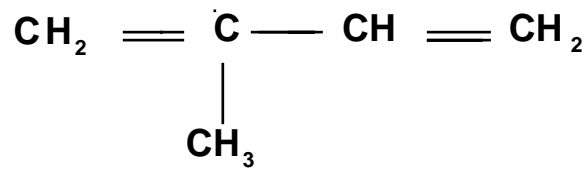


Abb. 2-11: Molekülstruktur von Isopren.

Daher können bei der Wasserdampfdestillation Reaktionen wie Esterverseifungen, Ringschlüsse und Oxidationen stattfinden, die zu Produkten führen, die sich von den im Ausgangsmaterial vorhandenen Komponenten des Öles unterscheiden [60]. Mit Wasserdampf bilden ätherische Öle azeotrope Gemische, die sich beim Abkühlen des Dampfes wieder in zwei Phasen trennen, deshalb können diese Öle einer Matrix mit Wasserdampf entzogen werden. Es wurde festgestellt, daß aus einer Wasserdampfdestillation gewonnene ätherische Öle mehr als doppelt soviel niedrige Terpene, aber nur 2/3 der Sesquiterpene eines Extraktöles enthalten [61]. Sesquiterpene sind Terpen-Polymere, deren Grundbaustein aus 1 - Terpenmolekülen besteht.

Die Wasserlöslichkeit ätherischer Öle hängt von ihrer Zusammensetzung ab. Ein hoher Anteil hydrophiler Substanzen wie Ester, Phenole und Alkohole erhöht die Wasserlöslichkeit. Solche Öle, die wie die des Pfeffers überwiegend Terpene enthalten, zeigen sehr geringe Löslichkeit. Im Zusammenhang mit Destillationen ist außerdem zu beachten, daß die Wasserlöslichkeit eine Temperaturfunktion ist [60].

Eine weitere Eigenschaft der ätherischen Öle des Pfeffers, vor allem von  $\alpha$ -Pinen, ist die Fähigkeit zur Autoxidation. Dabei entsteht eine Vielzahl von Verbindungen;  $\alpha$ -Pinen wird hauptsächlich zu trans-Verbenol, trans-Carvenol, Verbenon und  $\alpha$ -Pinen-Oxid umgesetzt [62]. Aufgrund der molekularen Struktur solcher Komponenten hat Pfeffer selbst eine hohe antioxidative Aktivität. So wurden zusätzlich zu einigen Phenol-Verbindungen und Tocopherolen fünf phenolische Amide isoliert, die starke Antioxidantien sind. Die Wirkungsweise der pheno-

lischen Inhaltsstoffe auf das Lebensmittel beruht auf der Hemmung der Autoxidation ungesättigter Fettsäuren [63]. Manche dieser Komponenten dürften genauso effektiv sein wie synthetische Antioxidantien, die gewöhnlich zur Haltbarmachung von Lebensmitteln eingesetzt werden, z.B. Butyl-Hydroxy-Anisol (BHA) und Butyl-Hydroxy-Toluol (BHT) [64].

Erste quantitative Ergebnisse zum Einfluß des Erhitzens auf Gewürz- aromen wurden von THIEßEN und HOFMANN [65] publiziert. Unmittelbar nach dem Erhitzen wurden Sensoriktests sowie Versuche zu qualitativen und quantitativen Veränderungen der mit Wasser flüchtigen Komponenten mit Hilfe der Gaschromatographie durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die ursprüngliche Menge an Terpenen und terpenähnlichen Substanzen beträchtlich abnahm. Dafür traten neue, höhersiedende Verbindungen auf, von denen angenommen wurde, daß sie Reaktionsprodukte darstellten.

Die Schärfe des Pfeffers wird in erster Linie durch das Alkaloid Piperin bestimmt. In Abbildung 2-12 ist die Strukturformel von Piperin dargestellt. Es können sich vier Stereoisomere bilden. Den überragenden Anteil zur Schärfe trägt das trans-trans-Piperin (=Piperin) bei. Die drei weiteren möglichen Isomere cis-trans-Piperin (Isopiperin), trans-cis-Piperin (Isochavicin) und cis-cis-Piperin (Chavicin) besitzen nur geringe bis fast keine Schärfewirkung. Weitere Pfefferalkaloide sind Piperlonguminin, Piperylin, Piperanin, Piperettylin und Piperettin. Der Alkaloidgehalt liegt zwischen 3,5 - 6 % berechnet als Piperin [56].

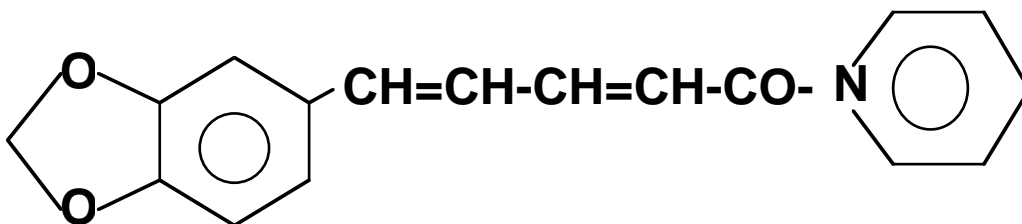


Abb. 2-12: Strukturformel von Piperin.

### 2.2.3 Mikrobiologische Belastung von schwarzem Pfeffer

Wie schon erwähnt, gehört schwarzer Pfeffer zu den stark keimhaltigen Nahrungsmitteln. Liegt die Keimbelastung pro Gramm unter  $10^4$ , spricht der Gewürzhandel bereits von keimarmen Gewürzen [61]. Hauptsächlich sind Bakterien und Schimmelpilze auf der Kornoberfläche zu finden. Unter den Bakterien sind Formen der Gattung *Bacillus* am häufigsten vertreten, innerhalb dieser Gattung wiederum die Arten *Bacillus cereus* und *Bacillus subtilis* [66, 67, 68, 69, 70]. Die Sporen aerober mesophiler Sporenbildner können einen Anteil von 50 % der gesamten Mikroflora erreichen [71]. Bei 108 Proben von schwarzem Pfeffer lag die mesophile aerobe Keimzahl bei 50 % der Proben zwischen  $10^6$  und  $10^7$  keimbildenden Einheiten pro Gramm (KBE/g), bei 42 % der Proben sogar über  $10^7$  KBE/g [72, 73]. Sporen thermotoleranter aerober Sporenbildner können einen Anteil zwischen 1 und 10 % der gesamten Sporenpopulation einnehmen. Strikt anaerobe Sporenbildner und nicht sporenbildende Bakterien sind nur in geringem Maße vertreten. Salmonellen finden sich nur selten. 1981/82 verursachte in Norwegen mit *Salmonella oranienburg* kontaminierter Pfeffer allerdings eine Massenerkrankung [61]. Neben Bakterien bilden Schimmelpilze die zweite größere Gruppe der Kontaminanten mit einer mittleren Belastung von  $10^4$  KBE/g [61, 71]. In vielen Ländern wird Pfeffer heute durch Behandlung mit ionisierenden Strahlen pasteurisiert. In Deutschland ist dieses Verfahren für den inländischen Markt verboten. Allerdings dürfen z.B. in Frankreich strahlenbehandelte Gewürze für die Weiterverarbeitung in Deutschland verwendet werden. Vom Verbraucher werden strahlenbehandelte Gewürze bisher nicht akzeptiert. Eine Entkeimung mit gesättigtem Wasserdampf wird nur von wenigen Gewürzfirmen durchgeführt, da ein Teil der ätherischen Öle dabei verloren geht. Meist wird der Pfeffer unbehandelt verarbeitet und die mit dem Pfeffer eingetragenen Keime im fertigen Produkt abgetötet. Die nachfolgend dargestellten REM-Aufnahmen von Pfefferkörnern [71] zeigen verschiedene Details eines Pfefferkorns und der typischen Mikroorganismen-Population.



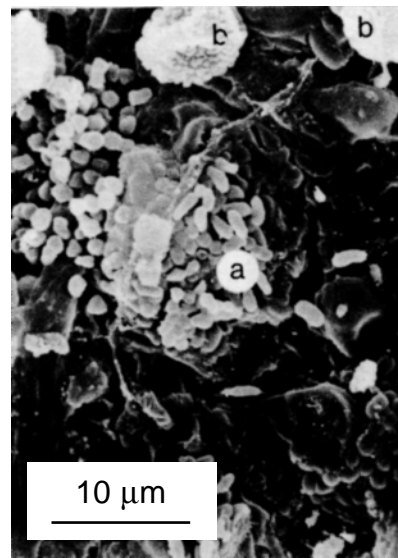
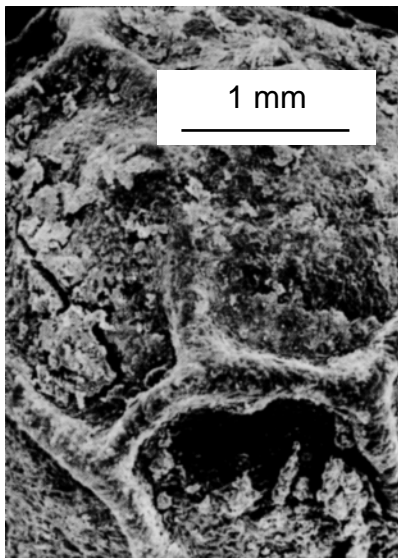


Abb. 2-13: Ganzes Pfefferkorn (PK). Abb. 2-14: Oberfläche eines PK mit Bakterien (a) und Schimmelpilzkonidien (b).

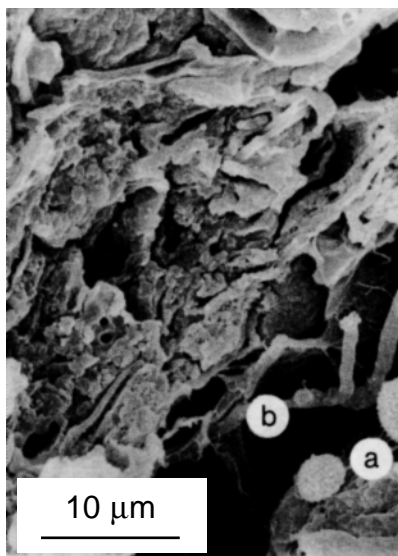


Abb. 2-15: Oberfl. eines PK mit Schimmelpilzkonidien (a) und Pilzhypen (b).

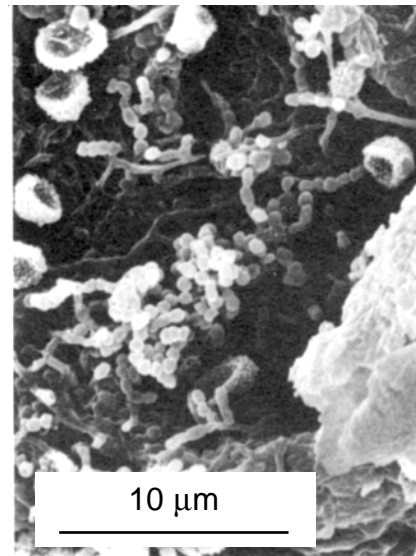


Abb. 2-16: Oberfl. eines PK mit Bakterien (-sporen) und Schimmelpilzkonidien.

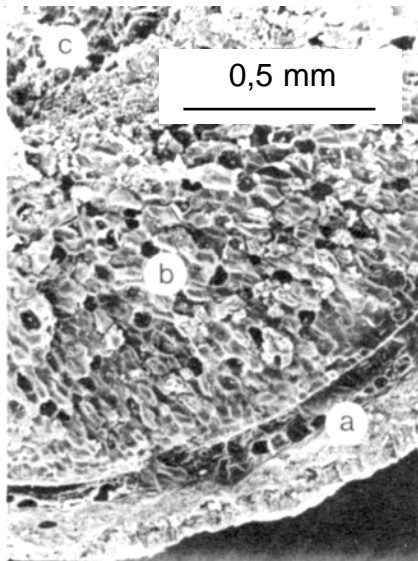


Abb. 2-17: Querschnitt durch ein PK: Fruchtschale (a), Perisperm (b), zentraler Hohlraum (c).

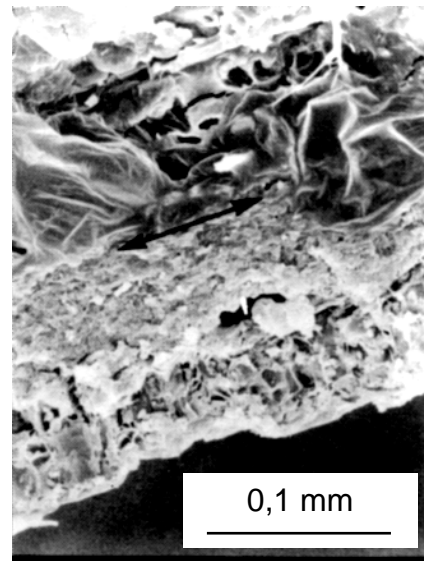


Abb. 2-18: Fruchtschale eines PK.

## 2.2.4 Physikalische Eigenschaften von Pfeffer

Tab. 2-3: Physikalische Daten des Pfeffers [74, 59].

	Symbol	Wert	Einheit
Dichte	$\rho$	$1,15 \cdot 10^3$	$\text{kg/m}^3$
Temperaturleitfähigkeit	$a$	$6 \cdot 10^{-8}$	$\text{m}^2/\text{s}$
Wärmeleitfähigkeit	$\lambda$	0,1	W/mK
spezifische Wärmekapazität	$c_p$	$1,45 \cdot 10^3$	$\text{kJ/kg}$
Schüttgewicht	L	500 - 600	g/l

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Diskontinuierliche Kapillarrohranlage

Für Versuche mit Sporensuspensionen bei Temperaturen unter 135 °C und für die Versuche mit Säurelösungen wurde eine diskontinuierliche Kapillarrohranlage verwendet, die von HAAS [3] entwickelt wurde. Die Versuchsanlage ist in Abbildung 3-1 schematisch dargestellt. Bis zu fünf Kapillarrohre (K) können in den Kapillarrohrhalter gespannt werden. Dieser wird von drei Pneumatikzylindern ( $P_1$ ) so bewegt, daß die Kapillarrohre (K) in die Bäder ( $B_1 - B_3$ ) eingetaucht werden. Für die horizontale Bewegung sind die parallel angeordneten Zylinder  $P_1$  und  $P_2$  zuständig, für die vertikale der Pneumatikzylinder  $P_3$ . Aufheizbad ( $B_1$ ) und Heißhaltebad ( $B_2$ ) werden durch je eine Regelbox mit einer Genauigkeit von 0,2 K temperiert. Das Abkühlbad ( $B_3$ ) wird durch einen Kryostaten auf eine Temperatur von etwa 10 °C eingestellt. Als Heiz- bzw. Kühlmedium in den drei Bädern wird das Wärmeträgeröl SYNTH 260 (Firma HAAKE, Karlsruhe) verwendet.

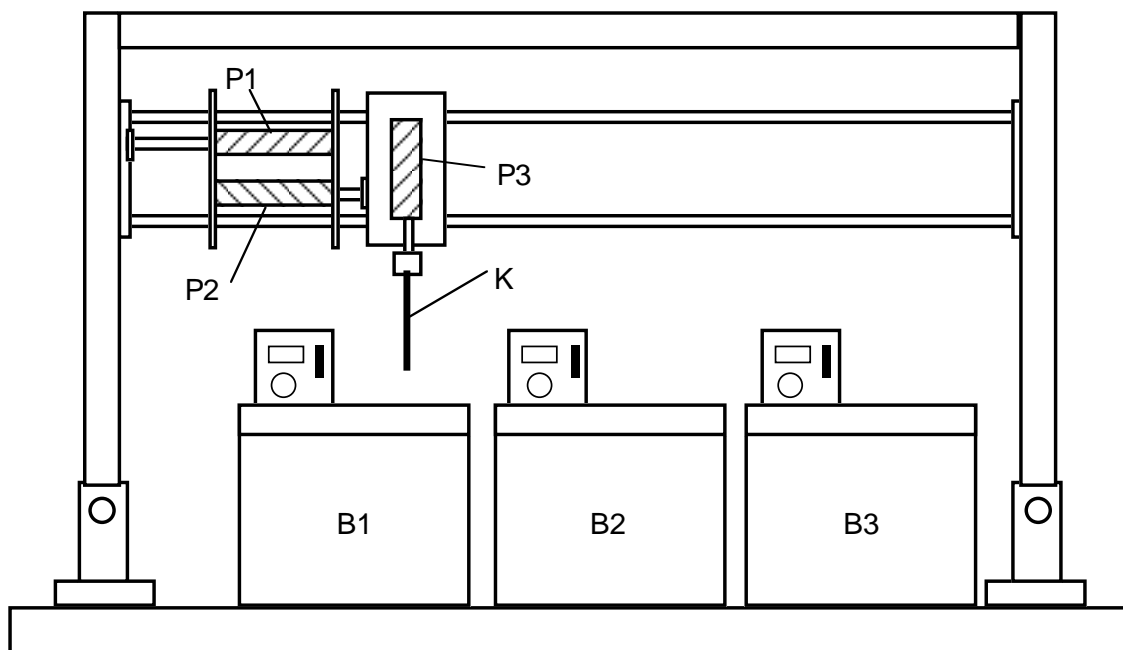


Abb. 3-1: Anlage für Inaktivierungsversuche nach der Methode des nicht durchströmten Kapillarrohres. K: Kapillarrohr;  $P_1$ : Pneumatikzylinder;  $B_1$ : Aufheizbad;  $B_2$ : Heißhaltebad;  $B_3$ : Abkühlbad.

Der Bewegungsablauf ist rechnergesteuert. Die Steuergrößen sind die Temperatur des Kapillarrohrinhaltes, die Haltezeit bei der gewünschten Inaktivierungstemperatur und die Kolbenstellung der Pneumatikzylinder. Die Temperatur im Kapillarrohr wird durch ein eingelötetes Thermoelement gemessen und über einen AD-Wandler mit einer Auflösung von 0,1 °C an den Rechner weitergegeben. Die Stellung der Zylinderkolben wird über induktive Endschalter erfaßt, die an den Pneumatikzylindern angebracht sind. Die Zeit wird durch die rechner-eigene Uhr gemessen.

Die verwendeten Kapillarrohre haben die folgenden Abmessungen:

Innenradius:	0,7 mm
	0,3 mm
Länge:	120 mm
Probenvolumen:	0,18 ml
Material:	Edelstahl (Werkstoff 1.4301)

### 3.1.1 Versuchsablauf

Zunächst werden die aktuellen Temperaturen der Bäder in einem Probedurchlauf erfaßt und gegebenenfalls manuell mit den Temperierregelboxen korrigiert. Die Temperatur des Aufheizbades liegt um 10 K höher als die des Heißhaltebades. Das Abkühlbad ist auf eine Temperatur von 10 °C geregelt. HAAS [3] hat für die hier verwendete Anlage Grenzkurven der Sporeninaktivierung beim Aufheizen berechnet. Die Temperatur des Aufheizbades wurde so gewählt, daß die Kriterien eines quasiisothermen Versuchsablaufes erfüllt sind (siehe Abb. 3-2). Für die Simulation wurde von HAAS [3] die aus früheren Versuchen bei niedrigeren Temperaturen bekannte Abtötungskinetik 1. Ordnung extrapoliert. Der zeitliche Verlauf der Aufheizung bzw. Abkühlung wurde für die zwei Grenzfälle (Fall A: keine innere Durchmischung, Fall B: ideale innere Durchmischung) berechnet. Die resultierende Abtötung während der Aufheiz- und Abkühlphase erhält man durch Kopplung von zeitlichem Temperaturverlauf und Abtötungskinetik.

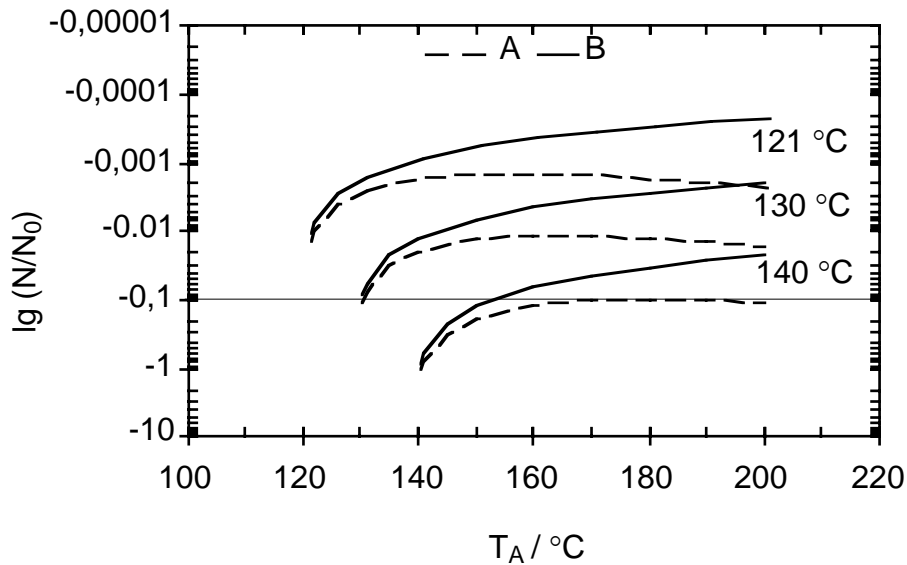


Abb. 3-2: Grenzkurven der Inaktivierung von *B. stearothermophilus* Sporen in Mc Ilvaine-Pufferlösung mit pH = 5. A: ohne innere Vermischung der Sporensuspension ( $B_{I}/B_{IA} = 51,5/0,11$ ); B: ideale innere Vermischung ( $B_{I}/B_{IA} = 0/0,11$ ) in Abhängigkeit der Wärmeträgertemperatur  $T_A$  [3].

Die Solltemperatur für das Ende der Aufheizphase, d.h. Beginn des Auftauchens aus dem Aufheizbad, wird ca. 7 K niedriger gewählt als die Heißhaltetemperatur. Diese Differenz ist notwendig, um eine Überhitzung des Kapillarrohrinhaltes durch die Verzögerung von Feststellung "Solltemperatur erreicht" bis zum Auftauchen der Kapillarrohre aus dem Aufheizbad (ca. eine Sekunde) zu minimieren.

Die Solltemperatur zum Abbrechen der Abkühlphase wird auf 25 °C eingestellt. Die letale Temperatur von 80 °C für *Bacillus stearothermophilus* Sporen ist damit deutlich unterschritten.

Die Zeit von "Solltemperatur erreicht" bis zum Eintauchen der Kapillarrohre ins Abkühlbad ist die Heißhaltezeit. Während der Überführung zwischen den Bädern (1,1 - 1,3 Sekunden) findet kein meßbares Abkühlen der Kapillaren statt.

Der eigentliche Versuch beginnt mit dem Eintauchen der mit Sporensuspension gefüllten Kapillarrohre in das Aufheizbad. Die Solltempe-

ratur im Aufheizbad ist nach etwa 3 Sekunden überschritten, zu diesem Zeitpunkt beginnt die Heißhaltezeit. Durch die Verzögerung bis zum Ausheben der Kapillarrohre kommt es zu einer Überhitzung der Sporensuspension über die Temperatur des Heißhaltebades hinaus. Die Überführung der Kapillarrohre ins Heißhaltebad dauert bei einem in den Druckluftzuleitungen eingestellten Überdruck von 4 bar 1,3 Sekunden. Die Kapillarrohre verbleiben für die Sollhaltezeit minus Überführungszeiten im Heißhaltebad. Die Überführungszeit ins Abkühlbad beträgt 1,1 Sekunden. Die Zeit ist kürzer, da die bewegte Masse kleiner ist als bei der Überführung vom Aufheiz- in das Heißhaltebad. Mit dem Eintauchen ins Abkühlbad endet die Haltezeit. Nach etwa 2,5 Sekunden ist in den Kapillarrohren eine Temperatur von 80 °C, circa 20 Sekunden später 25 °C erreicht. Die Kapillarrohre tauchen aus dem Abkühlbad auf.

Die Proben werden im Anschluß an den Versuch durch Keimzahlbestimmung ausgewertet.

### 3.2 Kontinuierliche Kapillarrohrstrecke

Bei dieser Methode wird die Sporensuspension durch eine Kapillare gepumpt, welche durch mehrere Wärmeübertrager führt, in denen das zu erhitzende Medium aufgeheizt, eine vorgewählte Zeit heißgehalten und schließlich wieder abgekühlt wird. Abb. 3-3 zeigt den schematischen Aufbau der Versuchsanlage. Die Anlage wurde von HAAS [3] entwickelt und aufgebaut und im Rahmen dieser Arbeit verbessert. Die Verbesserungen sind in Kap. 3.2.1 zusammengestellt.

Als Pumpe wird eine HPLC-Pumpe Fabrikat BESTA HD 2-200 verwendet, die einen Volumenstrom von maximal 50 ml/min bei einem Druck von maximal 300 bar fördert. Ein kurzes Kapillarstück mit 0,8 mm Innendurchmesser führt zunächst zu einem Pulsationsdämpfer, ebenfalls Fabrikat BESTA (Art.-Nr. 55072, Gesamtvolumen 1 ml), an den sich die Kapillarestrecke von durchgehend 0,2 mm Innendurchmesser anschließt. Die Kapillare führt durch vier Gegenstromwärmeübertrager, die die Strecke in vier Temperaturzonen unterteilen:

- Die Vorwärmzone (VWZ), in der auf eine Temperatur von 1 bis 2 °C unterhalb der Letaltemperatur (bei *B. stearothermophilus* Sporen 80 °C) aufgeheizt wird. Die Länge des Wärmeübertragers beträgt 200 mm.
- Die Aufheizzone (AHZ), in der die Sporensuspension auf einer Länge von 50 mm schnell auf die gewünschte Versuchstemperatur gebracht wird.
- Die Heißhaltezone (HHZ), in der die Sporensuspension auf Versuchstemperatur gehalten wird. Die Länge dieser Zone ist variabel.
- Die Abkühlzone (AKZ), in der schnell deutlich unter die Letaltemperatur abgekühlt wird. Die Länge des Wärmeübertragers beträgt 100 mm.

Unterschiedlich lange Heißhaltezeiten werden sowohl durch Variation des Volumenstroms als auch durch Variation des Heißhaltevolumens, das heißt der Länge der Kapillare im Heißhalte-Wärmeübertrager,

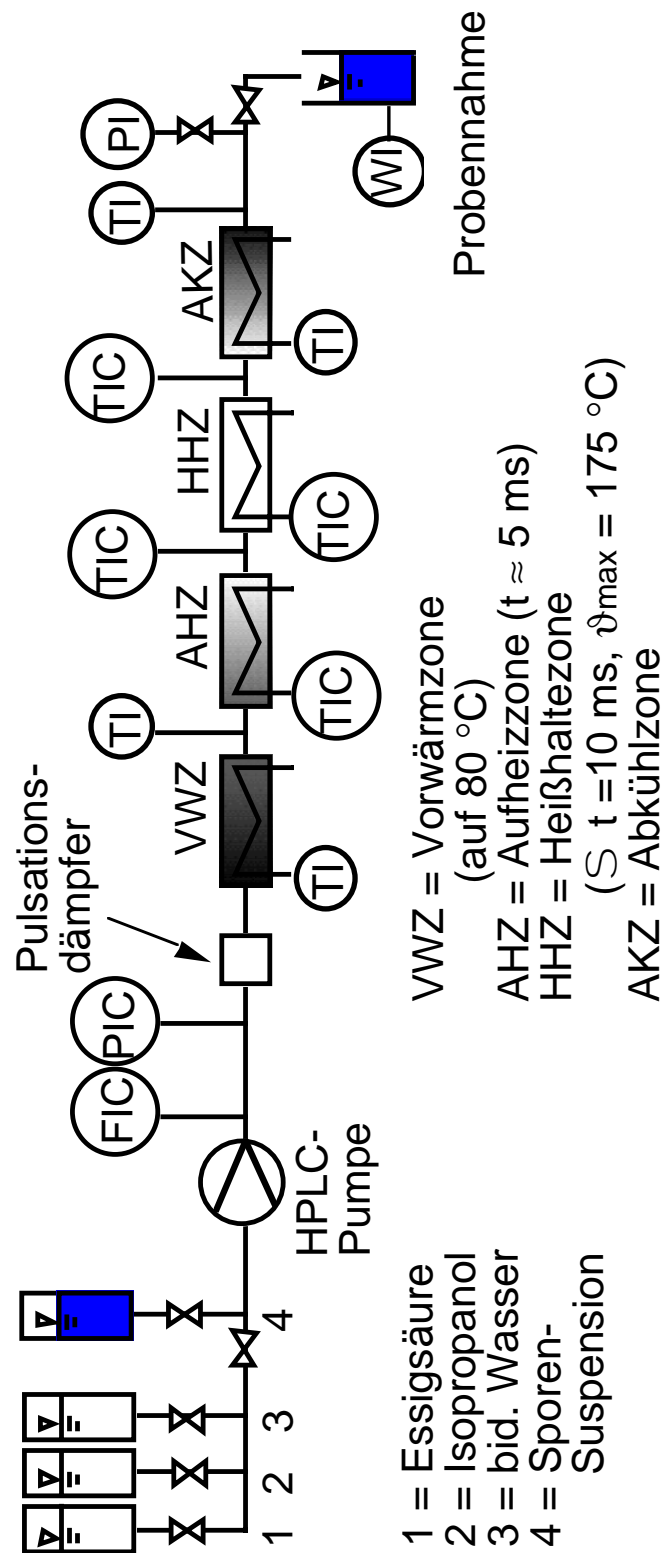


Abb. 3-3: Anlagenschema der kontinuierlichen Rohrstrecke



realisiert. Da das Mantelrohr dieses Wärmeübertragers nur 200 mm lang ist, werden längere Kapillarstücke zu Spiralen aufgewickelt. Die Länge der Heißhaltekapillare (maximal 1,5 m) wird somit nur durch den maximalen Pumpendruck (300 bar) beschränkt. Damit läßt sich bei hochturbulenten Strömungsbedingungen ( $Re \geq 10^4$ ) eine maximale Heißhaltezeit von 0,2 Sekunden erreichen. Am Ende der Versuchsstrecke befindet sich ein Manometer, an dem der Gegendruck abgelesen werden kann. Der Gegendruck wird durch ein hinter der Abkühlzone montiertes Kapillarstück aufgebaut und soll das Sieden innerhalb der Kapillaren verhindern.

Hinter jedem Wärmeübertrager befindet sich ein T-Stück, in das ein Ni/CrNi-Thermoelement eingebaut ist, um die Temperatur des durch die Kapillare gepumpten Mediums zu messen.

Kleinere Undichtigkeiten der Anlage können nicht visuell erfaßt werden, da die Flüssigkeit in die Isolierung austritt. Der Volumenstrom wird deshalb über eine Waage mit Interface laufend kontrolliert.

Für die Sporensuspension, das bidestillierte Wasser und die beiden Reinigungsflüssigkeiten (50%ige Essigsäure und Isopropanol) sind jeweils Vorlagegefäße installiert, deren Inhalt die Pumpe über Siliconschlauchleitungen ansaugt. Zwischen den Vorlagegefäßen und der Pumpe befindet sich für jede der Flüssigkeiten (ausgenommen die Sporensuspension) ein Tropfgefäß, das ungefähr zur Hälfte mit der Flüssigkeit gefüllt ist und ähnlich wie in der Medizintechnik das Abscheiden von Luftblasen und ein teilweises Entgasen bewirkt. Ein Edelstahlfilter mit einer Maschenweite von 100  $\mu\text{m}$  verhindert das Einsaugen von Partikeln, die die Kapillare verstopfen können. Der Zulauf wird über magnetische Schlauchquetschventile gesteuert.

Das Vorlagegefäß für die Sporensuspension besitzt ein Septum, durch das die Suspension mit einer Kanüle injiziert wird, und einen Sterilfilter zum Druckausgleich.

Ein Rechner (PC) übernimmt folgende Aufgaben :

- Steuerung der Ventile,

- Einlesen der Temperaturen,
- Regelung der Wärmeübertrager der Aufheiz- und Heißhaltezone,
- Ansteuerung der Waage zur gravimetrischen Kontrolle des Volumensstroms.

Zum Erfassen der Temperaturen werden die Spannungen der vier Thermoelemente über einen AD-Wandler (Analog-Digital) mit einer Auflösung von 0,1 °C eingelesen. Der AD-Wandler wandelt Spannungen von -10 mV bis +10 mV in Zahlenwerte von -2048 bis +2048 um (12 bit Auflösung). Aus diesen digitalen Werten werden die entsprechenden Temperaturen nach einer für den interessierenden Temperaturbereich an die Kalibrierkurve der Thermoelemente angepaßten Gleichung (Polynom vierter Ordnung) berechnet.

Bei der Regelung der Aufheiz- und Heißhaltezone ermittelt der Rechner aus der Temperatur, die die Suspension nach der Aufheiz- bzw. Heißhaltezone hat, die neuen Temperatursollwerte für die Wärmeträgeröle. Diese Sollwerte werden über einen DA-Wandler (Digital-Analog) den Thermostaten der Ölbäder vorgegeben. Der DA-Wandler wandelt Zahlenwerte von 0 bis 4095 in Spannungen von -5 V bis +5 V um. Ein nachgeschalteter Verstärker mit dem Verstärkungsfaktor 0,4 grenzt diese Spannungen auf -2 V bis +2 V ein, wodurch eine Auflösung von 0,1 °C erreicht wird.

Die internen PID-Regler der Thermostaten werden genutzt, so daß der Rechner lediglich die neuen Sollwerte vorzugeben braucht. Die Sollwerte werden jede Minute einmal neu berechnet, was mit den Totzeiten des Systems und den Einstellparametern der internen PID-Regler die Stabilität des Systems gewährleistet.

Während der Aufheizphase der Anlage bis in den stationären Zustand wird bidestilliertes Wasser durch die Kapillare gefördert. Dabei werden die vier Temperaturen zehnmal pro Sekunde eingelesen und auf dem Bildschirm tabellarisch ausgegeben, damit der Benutzer das Erreichen des stationären Zustands erkennen kann. Beim Versuch selbst wird auf Betätigen einer Taste das Ventil zur Sporensuspension geöffnet, die Temperaturen einmal pro Sekunde eingelesen und in einem  $\vartheta$ -t-Diagramm über der Versuchszeit auf dem Bildschirm abgebildet. Es

ist somit sofort nach Versuchsende erkennbar, ob die Temperaturen konstant geblieben sind.

Als Wärmeträgeröl für die Thermostaten der Aufheiz- und Heißhaltezone wird Synth 260 (Firma HAAKE, Karlsruhe) verwendet. Für die Aufheizzone wird ein leistungsfähigerer Thermostat mit dem vom gleichen Hersteller bezogenen Öl Min 350 verwendet. Die Abkühlzone wird von einem Thermostaten mit Kältemaschine, der mit einer Methanol-Wasser-Mischung befüllt ist, gekühlt.

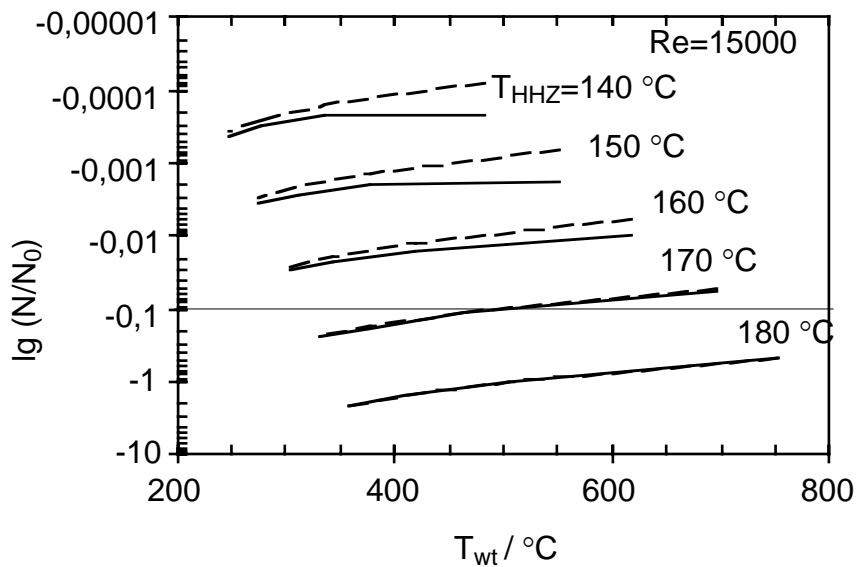


Abb. 3-4: Abhängigkeit der Überlebensrate von *Bacillus stearothermophilus* Sporen ( $D_{121} = 250$  s,  $z = 10$  °C) beim Austritt aus der Aufheizzone von der Temperatur des Wärmeträgermediums SYNTH 260 (- - - Kolbenströmung, ——— 2-Schichten-Strömungsmodell) [3].

Durch Simulationsrechnungen [3] wurde abgeschätzt, daß mit dieser Versuchsanlage bis zu einer Temperatur von 170 °C, turbulente Strömung in der Kapillare vorausgesetzt, quasiisotherme Bedingungen realisiert werden können (siehe Abb. 3-4). Für die Simulation wurde die aus früheren Versuchen bei niedrigeren Temperaturen bekannte Abtötungskinetik 1. Ordnung extrapoliert. Der zeitliche Verlauf der Aufheizung bzw. Abkühlung wurde für die zwei Grenzfälle (ideale Kolbenströmung, 2-Schichten-Strömungsmodell: turbulente Kernströmung mit laminarer Unterschicht) berechnet. Die resultierende

Abtötung während der Aufheiz und Abkühlphase wurde dann durch Kopplung des zeitlichen Temperaturverlaufes, der Verweilzeitverteilung und der Temperaturabhängigkeit der Abtötungskinetik berechnet [3]. Zu niedrigen Temperaturen hin ist der Einsatzbereich der Versuchsanlage durch die maximale Heißhaltezeit von 0,2 Sekunden auf Temperaturen  $\geq 140$  °C beschränkt. Bei tieferen Temperaturen sind deutlich längere Heißhaltezeiten notwendig, um den Abtötungsverlauf zu erfassen.

### **3.2.1 Unterschiede zu der von HAAS verwendeten Anlage**

Gegenüber der Anlage, die von HAAS [3] verwendet wurde, konnten folgende Verbesserungen ausgeführt werden.

- Die Heißhaltezone der Anlage ist nicht mehr nur isoliert, sondern wird jetzt durch einen Doppelrohrwärmeübertrager gebildet. Die Heißhaltetemperatur der Sporensuspension wird geregelt.
- Die bisher verwendeten T-Stücke hatten einen Innendurchmesser von 1,27 mm, eine Länge von 18,3 mm und ein Innenvolumen von 0,0235 ml je T-Stück. Das Verhältnis von Länge zu Innendurchmesser betrug 14,4. Dies war problematisch, da bei der bisher kürzesten erreichbaren Heißhaltezeit von ungefähr 0,1 Sekunden sich über 70 % des Gesamtvolumens der Heißhaltezone in den beiden T-Stücken, die zur Heißhaltezone gerechnet werden müssen, befand. Das bedeutet, daß sich der größte Teil des Heißhaltevolumens außerhalb des Wärmeübertragers befand. Weiterhin war nicht abschätzbar, wie ein solches T-Stück durchströmt wird, wenn ausgehend vom Kapillardurchmesser von 0,2 mm ein Durchmessersprung auf 1,27 mm stattfindet und am Ende des T-Stückes wieder auf einen Durchmesser von 0,2 mm übergegangen wird. Ein Extremfall ist die ideale Rückvermischung der Suspension in der Diffusorströmung (wie beim idealen Rührkessel). Ein anderer Extremfall ist das Passieren eines Suspensionsstrahles durch das T-Stück, der sich kaum aufweitet. Im letzteren Fall wäre eine deutlich kürzere effektive Heißhaltezeit als berechnet die Folge.

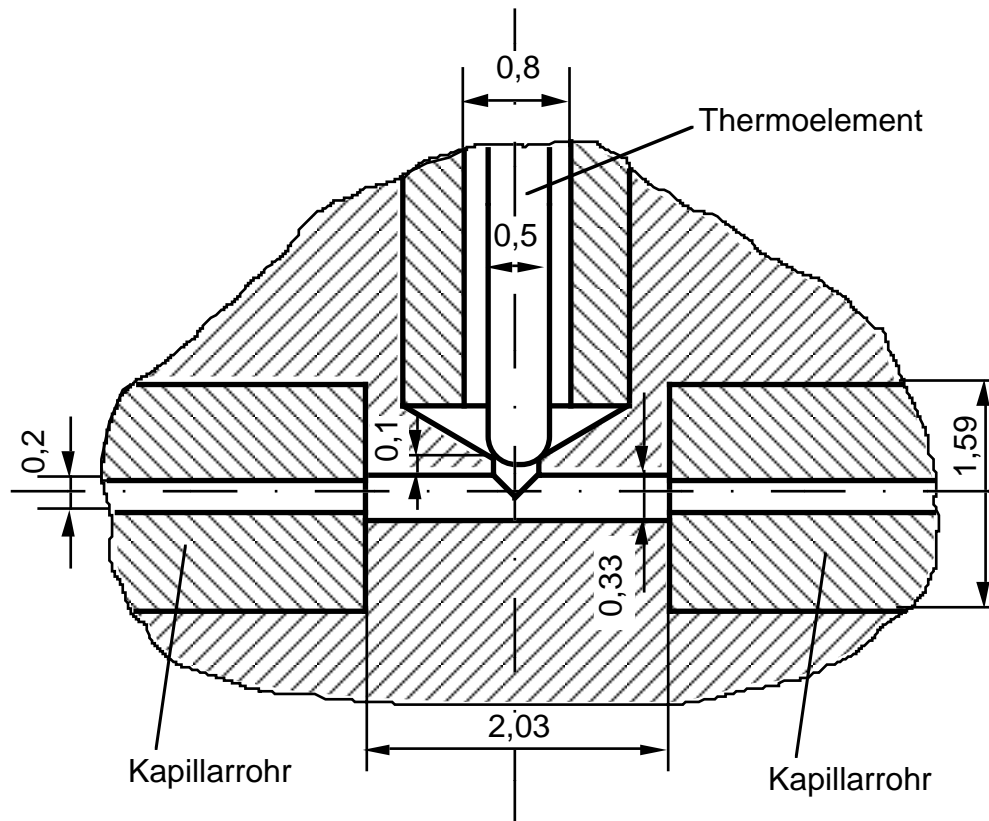


Abb. 3-5: Ausbruch eines T-Stückes mit Thermoelement (Maße in mm).

- Die neuen T-Stücke haben einen Innendurchmesser von 0,33 mm, eine Länge von 2,03 mm und ein Innenvolumen von 0,347  $\mu\text{l}$ . Das Verhältnis von Länge zu Innendurchmesser beträgt hier 6,2. Bei der jetzt erreichbaren kürzesten Heißhaltezeit von ungefähr 0,01 Sekunden beträgt das Volumen der beiden T-Stücke nur 4,4 % des gesamten Heißhaltevolumens. Bei längeren Verweilzeiten wird der Anteil noch kleiner. Der Durchmessersprung ist jetzt so gering, daß kaum mit Toträumen innerhalb eines T-Stückes zu rechnen ist. Da die Spitzen der Thermoelemente nicht direkt bis in die Strömung reichen können, wird die Temperaturmessung von der Temperatur der T-Stücke beeinflusst. Diese kann aber im stationären Zustand der Temperatur der Sporensuspension gleichgesetzt werden, da die T-Stücke ausreichend isoliert sind. Um die Ansprechzeit der Thermoelemente zu testen, wurde im stationären Zustand der Volumenstrom an der Pumpe geringfügig geändert. Das der Aufheizzone nachgeschaltete Thermoelement reagierte innerhalb einer Sekunde

auf die veränderte Temperatur des Wasserstromes. Abbildung 3-5 zeigt einen maßstabsgetreuen Ausbruch eines T-Stückes mit Thermoelement.

- Zum Anschluß des Manometers hinter der Abkühlzone wurde ebenfalls ein solches neues T-Stück eingebaut.
- Um das Sieden der Suspension in der Kapillaren zu verhindern, war am Ende der Kapillarstrecke ein Drosselventil angebracht, mit dem man den gewünschten Gegendruck manuell einstellen konnte. Da auch hier dieselbe Problematik wie bei den alten T-Stücken herrschte (nicht definiert durchströmtes Totvolumen), wurde das Ventil durch zwei verschieden lange Kapillarstücke (Durchmesser 0,2 mm) ersetzt. Bei niedrigen Volumenströmen wird das lange, bei hohen Volumenströmen das kurze Kapillarstück montiert.

### 3.2.2 Versuchsdurchführung

Bis zum Erreichen des stationären Zustands wird bidestilliertes Wasser durch die Anlage gefördert. Die Thermostate für die Aufheizzone und die Heißhaltezone werden über den Rechner geregelt. Lediglich der Thermostat der Vorwärmzone muß noch von Hand eingestellt werden. Der Thermostat für die Abkühlzone wird immer auf maximale Kälteleistung eingestellt.

Der Volumenstrom wird an der Pumpe eingestellt und über eine vom Rechner angesteuerte Waage, auf der das Auffanggefäß am Austritt der Anlage steht, kontrolliert. Die Heißhaltezeit  $t$  berechnet sich aus

$$t = \frac{V_{\text{HHZ}}}{\mathcal{V}} \quad (3-1)$$

mit  $\mathcal{V}$  = Volumenstrom  
 $V_{\text{HHZ}}$  = Volumen der Heißhaltezone

Die Heißhaltezone reicht vom Ende des Wärmeübertragers der Aufheizzone bis zum Anfang des Wärmeübertragers der Abkühlzone. Bei der Berechnung des Heißhaltevolumens muß das Volumen der

beiden sich in diesem Abschnitt befindlichen T-Stücke mitberücksichtigt werden.

$$l_{\text{T-Stück}} = 2,03\text{mm}$$

$$d_{\text{T-Stück}} = 0,33\text{mm}$$

$$V_{\text{T-Stück}} = \frac{(0,33\text{mm})^2 \cdot \pi}{4} \cdot 2,03\text{mm} = 0,347\mu\text{l}$$

$$V_{\text{HHZ}} = \frac{d_i^2 \cdot \pi}{4} \cdot (l_{\text{HHZ}} - 2 \cdot l_{\text{T-Stück}}) + 2 \cdot V_{\text{T-Stück}} \quad (3-2)$$

mit  $d_i$  = Innendurchmesser der Kapillare

$l_{\text{HHZ}}$  = Gesamtlänge der Heißhaltezone mit T-Stücken (bis 1,5 m)

Die Sporensuspension wird erst wenige Minuten vor dem Versuch in das Vorlagegefäß injiziert, um ein Absetzen der Sporen und einen daraus folgenden Konzentrationsgradienten im Vorlagegefäß zu vermeiden.

Befindet sich die Anlage im stationären Zustand, das heißt ändern sich die Temperaturen nicht mehr (eine Toleranz von  $\pm 0,2$  °C ist zugelassen), kann der Versuch gestartet werden. Dazu wird dem Rechner die Versuchsdauer, die üblicherweise zwischen 35 und 45 Sekunden beträgt, eingegeben. Auf einen Tastendruck wird dann der Zulauf auf Sporensuspension umgeschaltet. Um das noch in der Anlage vorhandene Wasser vollständig zu entfernen und um eine Verdünnung der Sporensuspension sicher auszuschließen, wird mindestens die dreifache mittlere Verweilzeit abgewartet, bevor mit der Probennahme begonnen wird. Diese Wartezeit liegt beim niedrigsten Volumenstrom von 20 ml/min bei 20 Sekunden und kann bei höheren Volumenströmen entsprechend verkürzt werden. Nach der Wartezeit werden im Abstand von 10 Sekunden drei Proben von ungefähr je einem Milliliter entnommen.

Nach Ablauf der Versuchsdauer schaltet der Rechner den Zulauf automatisch auf bidestilliertes Wasser um. Die Anlage wird dann je 10 Minuten mit 50%iger Essigsäure und Isopropanol bei einem Volumen-

strom von 20 ml/min zum Reinigen bzw. Entkeimen gespült. Danach wird für ca. 1 h mit Wasser nachgespült, um Reste der Reinigungsflüssigkeiten zu entfernen.

Anhand des  $\vartheta$ -t-Diagrammes, das der Rechner auf dem Bildschirm ausgibt, wird festgestellt, ob die Temperaturen nach Aufheiz- und Heißhaltezone innerhalb der zulässigen Abweichung von  $\pm 0,5$  °C von der Solltemperatur geblieben sind. Ist dies nicht der Fall, muß der Versuch verworfen werden.

Die Keimzahlen der drei Proben werden bestimmt. Sie müssen im Rahmen der Standardabweichungen übereinstimmen, sonst ist der Versuch zu wiederholen.



### 3.3 Entwicklung eines Verfahrens zur Heißgasbehandlung von Pfefferkörnern

#### 3.3.1 Fallrohranlage

In Anlehnung an großtechnische Prozesse, die in Falltürmen ablaufen, wurde zuerst versucht, die Heißgasbehandlung in einem Fallrohr, in dem das Gas im Gegenstrom geführt wird, zu realisieren. Für Vorversuche wurde ein Plexiglasrohr mit einem Innendurchmesser von 20 mm verwendet. Als Versuchsgas diente Luft bei Raumtemperatur. Die Luft wurde aus dem Druckluftnetz der Universität bezogen. Die Luft trat von unten in das Rohr ein und entwich durch Bohrungen unterhalb der Dosiervorrichtung seitlich aus der Apparatur. Die Pfefferkörner wurden durch eine Dosiervorrichtung, die ähnlich einem Süßstoffspender funktioniert, einzeln in das Rohr eingebracht. Die Dosiervorrichtung ist in Abb. 3-6 dargestellt.

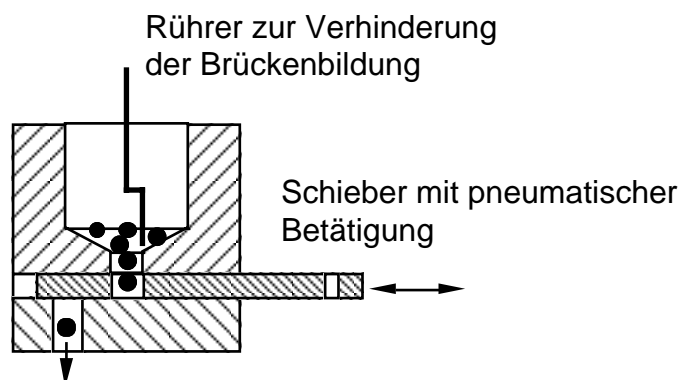


Abb. 3-6: Dosiervorrichtung zur Dosierung einzelner Pfefferkörner.

Die Pfefferkörner werden in einem Trichter vorgelegt. Der Rührer dient dazu, die Brücken, die sich bei rauhen Materialien bilden können, zu zerstören. Ohne Rührer war eine Dosierung nicht möglich. Ist der Schieber in Ruhestellung, fällt ein Korn in die Bohrung des Schiebers. Diese Bohrung hat einen Durchmesser von 5,5 mm und ist von oben mit einem Winkel von 120° angesenkt. Der Schieber ist 5 mm hoch. Die Bohrung ist so bemessen, daß sich die größeren Pfefferkörner (Durchmesser 4,0 - 4,75 mm, Abb. 3-9 zeigt die Partikelgrößenverteilung

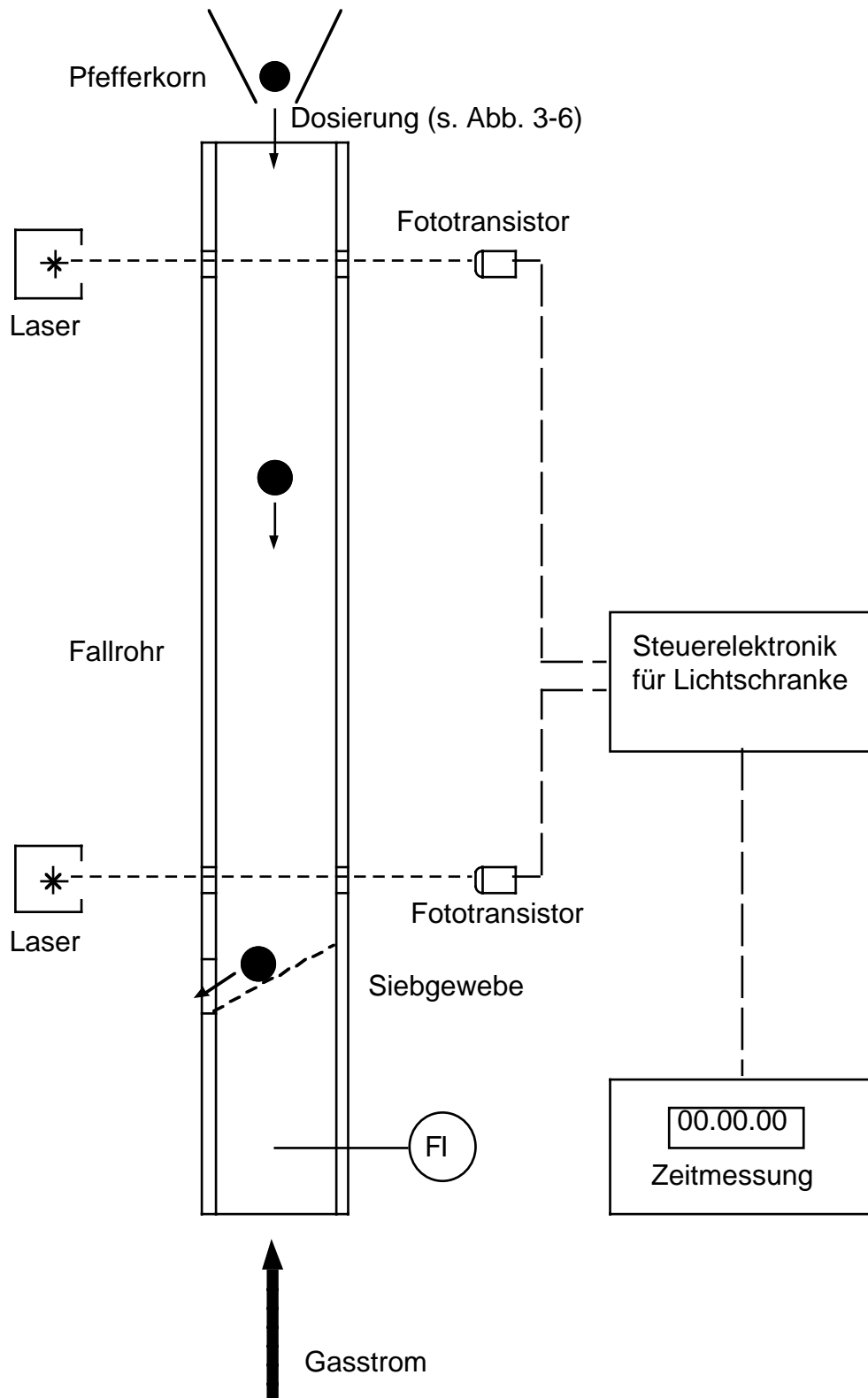


Abb. 3-7: Schema der Fallrohranlage für die Vorversuche.

lung) nicht festklemmen können und von zwei kleineren Körnern das oben liegende beim Dosiervorgang wieder in den Vorlagetrichter zurückgedrückt wird. Der Schieber wird in die Austragsposition gebracht, und das Korn fällt in das Rohr. Beim Eintritt in das Rohr wird über eine Laser-Lichtschranke die Zeitmessung gestartet. Die Fallzeit wird am Ende der Fallstrecke beim Durchtritt durch eine Ebene aus mehreren Laser-Lichtschranken gestoppt. Unterhalb der Fallstrecke befindet sich ein schräg eingebautes Sieb, auf dem die Körner zum seitlichen Austrag aus der Apparatur rollen. Eine schematische Darstellung der Anlage ist in Abbildung 3-7 zu sehen.

Die Fallzeiten der Körner variierten stark. Die Auswertung der gemessenen Fallzeiten und die Überprüfung der Zeitmessung durch mit einem Stroboskop beleuchtete Video-Aufnahmen ergaben die in Abbildung 3-8 dargestellten Fallgeschwindigkeits-Verteilungen. Abbildung 3-9 zeigt die Partikelgrößenverteilung des verwendeten Pfeffers.

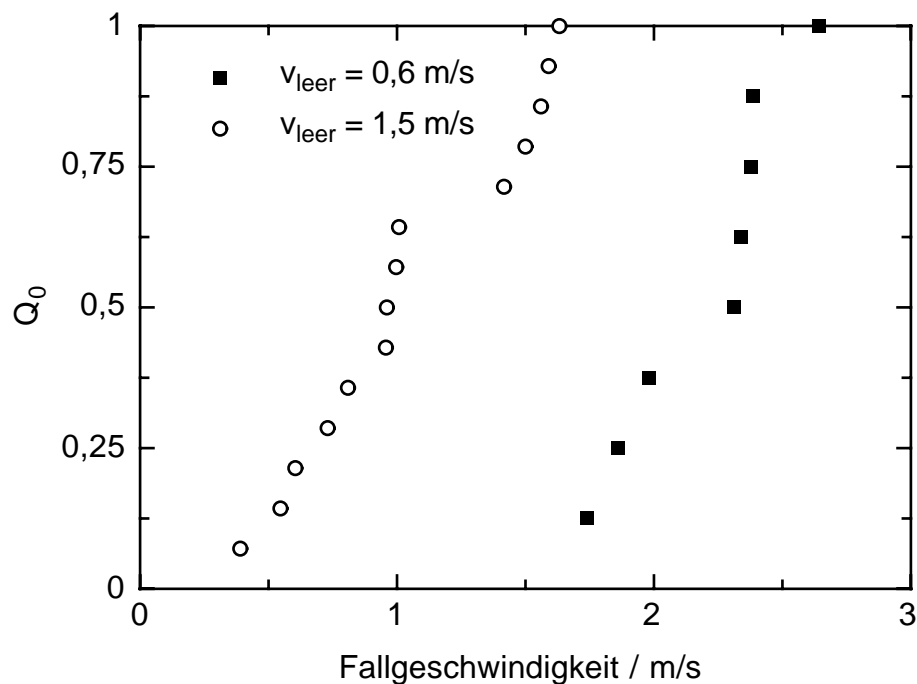


Abb. 3-8: Fallgeschwindigkeits-Verteilung der Pfefferkörner in der Fallrohrapparatur, Kurvenparameter ist die Leerrohrgeschwindigkeit der im Gegenstrom geführten Luft.

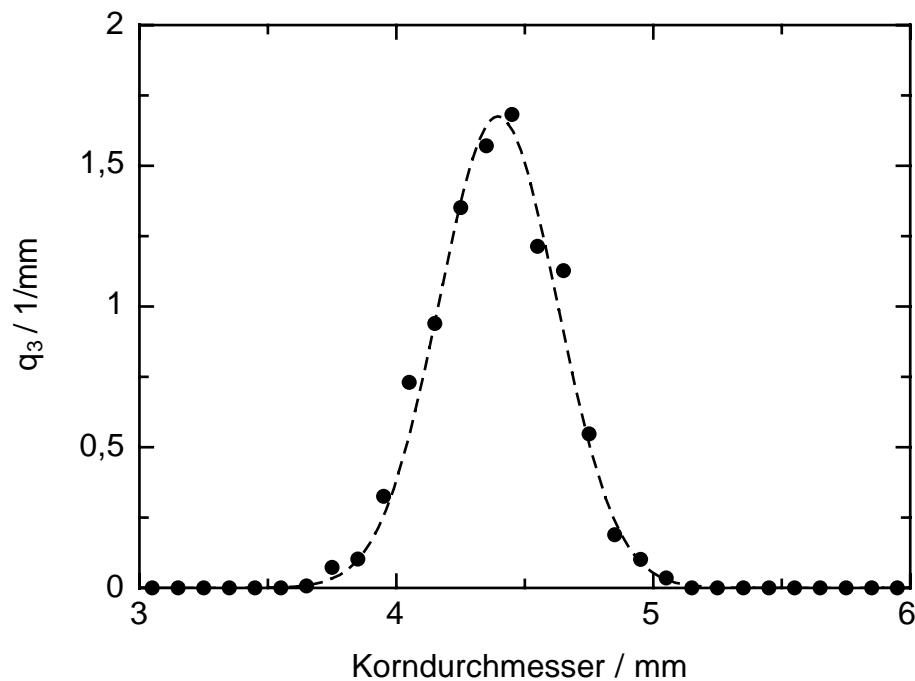


Abb. 3-9: Partikelgrößenverteilung der verwendeten Pfefferfraktion. Die Fraktion wurde durch Siebung mit Sieben von 4,00 mm und 4,75 mm Maschenweite gewonnen. Die Partikelgrößenverteilung wurde mit einem Flachbettscanner und Bildauswertungssoftware bestimmt.

Die daraus resultierende starke Streuung der Verweilzeiten ist bei thermischen Behandlungsverfahren nicht tolerierbar. Deshalb wurde eine Anlage mit Zwangsförderung konzipiert und aufgebaut.

### 3.3.2 Anlage zum Pasteurisieren einzelner Pfefferkörner

Bei der für die Versuche realisierten Anlage werden die Pfefferkörner einzeln mit einem Schieber in den Heißgasstrom eingebracht und nach Ablauf der vorgegebenen Behandlungszeit wieder ausgeworfen. Ein Schema der Anlage sowie ein Photo des aufgeklappten Reaktorblocks sind in Abb. 3-10 abgebildet. Die Numerierungen der Positionen auf beiden Bildern entsprechen sich. Die Dosiervorrichtung wurde von der Fallrohranlage übernommen. Nach dem Dosiervorgang (Position 1) fällt das Korn durch eine schräg verlaufende Bohrung in den Pasteurisationsschieber

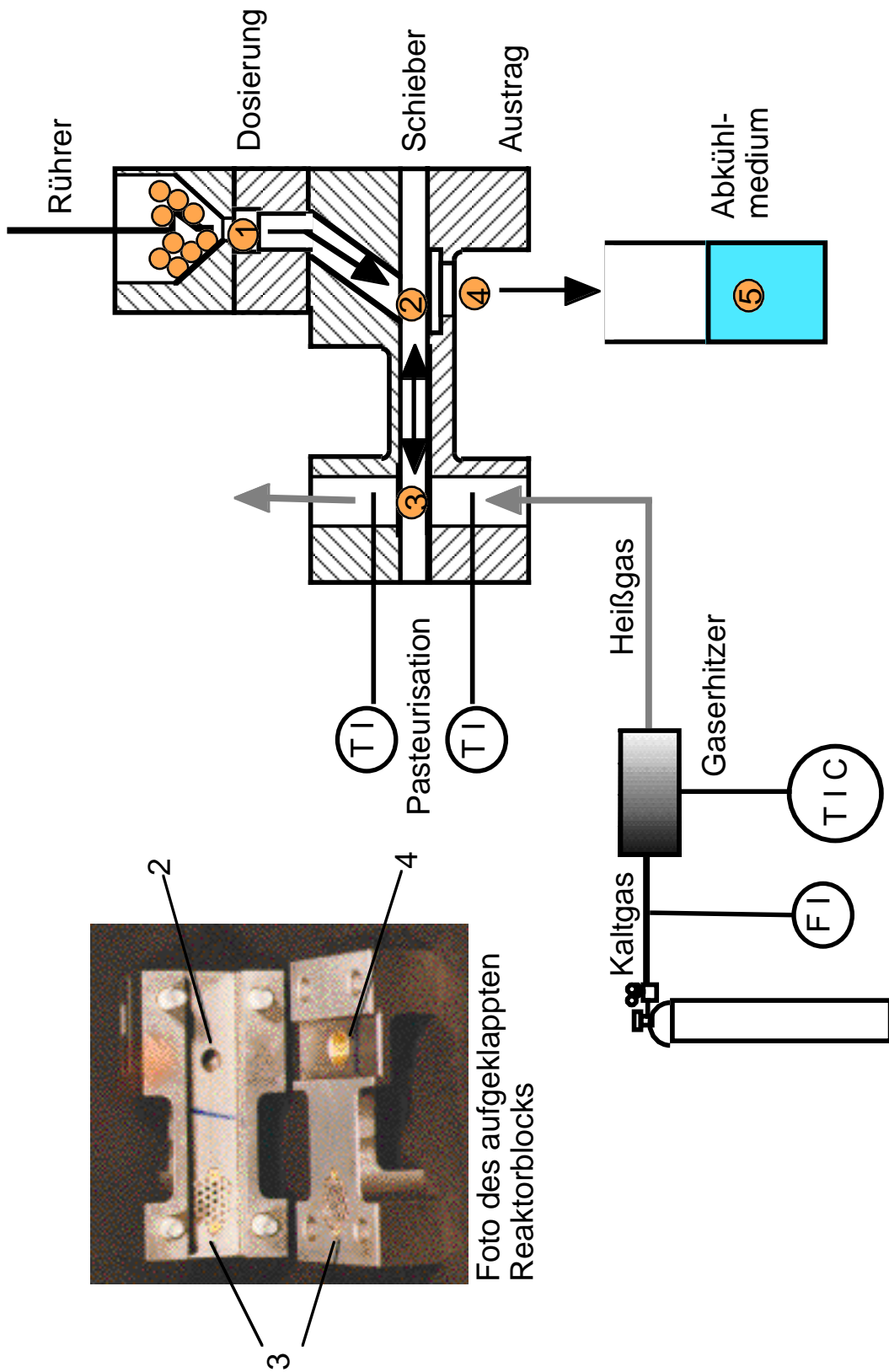


Abb. 3-10: Anlagenschema zum Pasteurisieren einzelner Pfefferkörner

(Position 2). Der Austragsschieber verschließt die Austragsöffnung. Dann wird das Korn durch den Pasteurisationsschieber in den Heißgasstrom eingebracht (Position 3). Der Behandlungsraum weist einen Durchmesser von 12 mm und eine Höhe von 7 mm auf. Zwei Siebe begrenzen den Behandlungsraum nach unten und oben. Der Austragsschieber öffnet die Austragsöffnung. Nach Ablauf der Behandlungszeit wird das Korn durch den Pasteurisationsschieber wieder aus dem Heißgasstrom ausgetragen (Position 2). Durch den nun geöffneten Austrag (Position 4) fällt das Korn in das Abkühlmedium (Position 5). Die zeitliche Abfolge der Schieberbewegungen ist in Abb. 3-11 dargestellt.

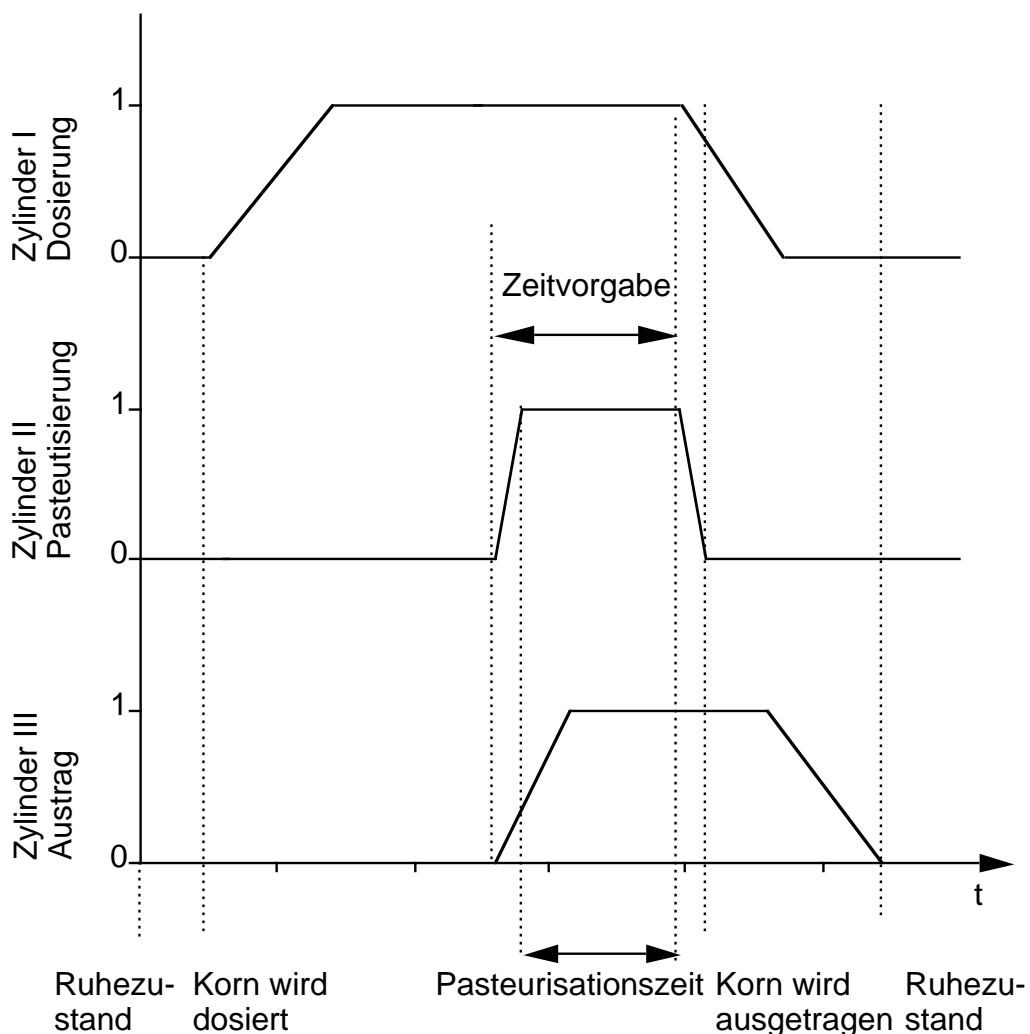


Abb. 3-11: Zeitlicher Ablauf der Schieberbewegungen.

Zu erkennen ist, daß die effektive Pasteurisationszeit um die für das Verfahren des Schiebers erforderliche Zeit kürzer ist als die vorgegebene Behandlungszeit. Diese Fehlzeit beträgt ca. 0,01 Sekunden. Die Zeit, die vergeht, bis das Korn nach dem Ende der Behandlungszeit in das Abkühlmedium eintaucht, wurde auf maximal 0,1 Sekunden abgeschätzt. Diese Zeit setzt sich aus der Zeit für die Kolbenbewegung (ca. 0,01 Sekunden) und der Fallzeit zusammen. Die Fallstrecke beträgt jeweils 4 - 5 cm.

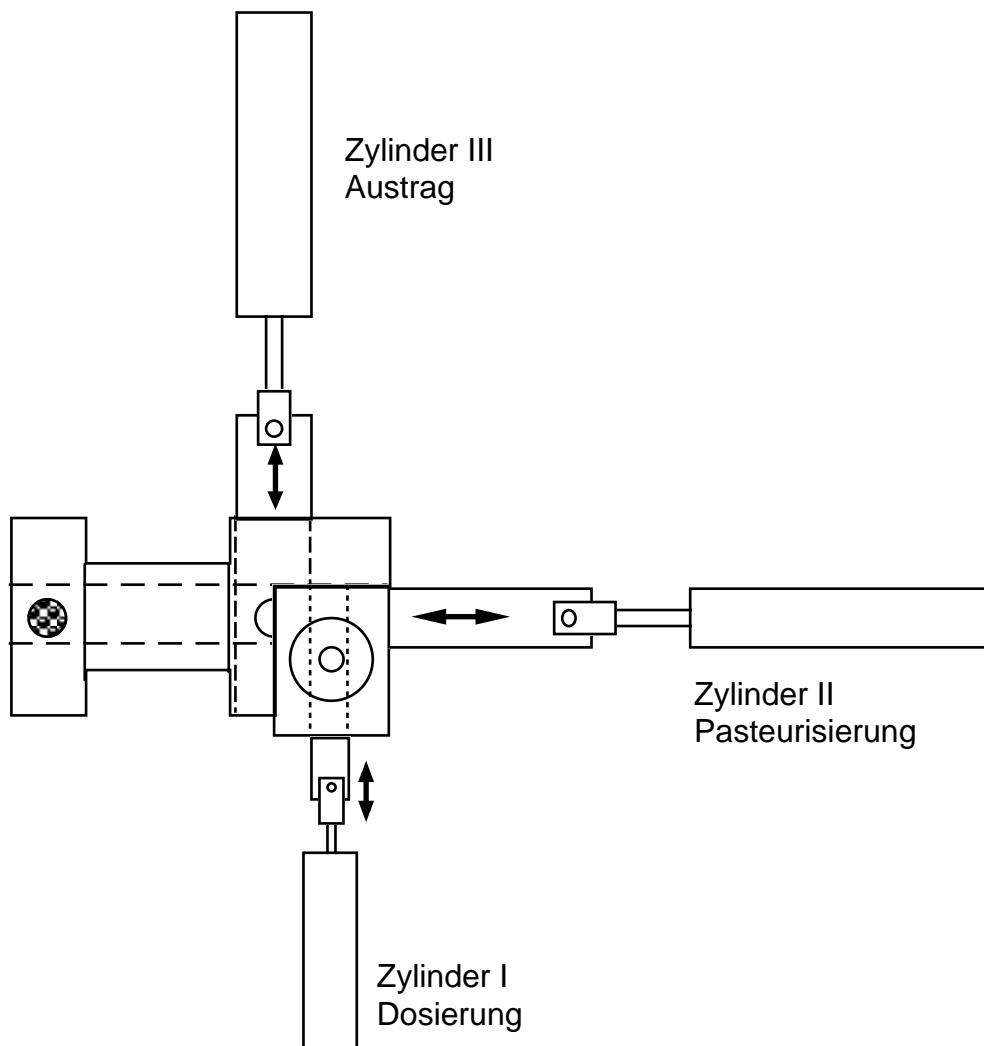


Abb. 3-12: Draufsicht des Reaktorblocks mit Pneumatikzylindern.

Die Schieber werden pneumatisch angetrieben. Abbildung 3-12 zeigt eine Draufsicht der Anordnung. Die Schieber sind aus Edelstahl (1.4301) gefertigt. Die Laufflächen im Reaktorblock sind hartverchromt

und auf Maß geschliffen. Der Pasteurisationsschieber ist so ausgeführt, daß auch in der Ruhestellung (Position 2) durch eine Bohrung der Behandlungsraum gebildet wird. Damit wird erreicht, daß der Gastrom ungehindert passieren und kein Heißgas seitlich entweichen kann. Zwischen diesen beiden Bohrungen sind Aussparungen angebracht, die den Gasstrom während der Schieberbewegung durchtreten lassen und der Gewichtseinsparung dienen. Um eine möglichst schnelle Bewegung des Pasteurisationschiebers zu erreichen, werden die Pneumatikzylinder mit dem maximal zulässigen Druck von 7 bar beaufschlagt. Damit ergibt sich unter Annahme von Reibungskräften von gesamt 10 N theoretisch eine Beschleunigung von fast  $900 \text{ m/s}^2$ . Der Hersteller garantiert bei den gewählten Betriebsbedingungen eine Verschiebegeschwindigkeit von 10 m/s. Bei einem Verschiebeweg von 5 cm wird dann eine Verschiebezeit von unter 0,01 Sekunden erreicht.

Die Körner in der Vorlage sollen nicht erwärmt werden. Deshalb ist zwischen Dosiervorrichtung und Reaktorblock eine temperaturbeständige Isolierschicht angebracht. Die Anlage ist aus Edelstahl (1.4301), der eine für metallische Werkstoffe geringe Wärmeleitfähigkeit besitzt, gefertigt. Zusätzlich ist die Materialstärke im Mittelteil des Reaktorblocks auf das für die mechanische Festigkeit erforderliche Minimum reduziert. Der Reaktorblock ist auf einer 12 mm starken Platte aus Edelstahl (1.4301) montiert. Die große Materialstärke ist erforderlich, damit sich die Platte aufgrund der unterschiedlichen Erwärmung nicht wölbt. Auch hier wurde wegen der geringen Wärmeleitfähigkeit Edelstahl gewählt, um die Wärmeübertragung an die rechte Seite des Reaktorblocks (siehe Abb. 3-10) gering zu halten.

Das Erhitzungsgas wird in Gasflaschen vorgelegt. Die Einstellung des Gasvolumenstroms erfolgt über zwei hintereinander geschaltete Druckminderer. Der erste reduziert den Flaschendruck auf ca. 2,5 bar. Mit dem zweiten Druckminderer wird die Feineinstellung durchgeführt. Vor dem Eintritt in den Schwebekörperdurchflußmesser wird das Gas auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Kontrolle sind vor und nach dem Schwebekörperdurchflußmesser je ein NiCr/Ni-Thermoelement eingebaut. Der gemessene Kaltgasvolumenstrom wird mit Hilfe des idealen Gasgesetzes auf den Volumenstrom bei Versuchstemperatur umgerechnet.



Das Gas wird in einem elektrischen Gaserhitzer auf maximal 700 °C erhitzt. Der Gaserhitzer wird über einen PI-Regler geregelt. Vor und nach dem Behandlungsraum (Position 3 in Abb. 3-10) wird die Gastemperatur mit je einem NiCr/Ni-Thermoelement mit 0,5 mm Durchmesser gemessen. Als Behandlungstemperatur wird der arithmetische Mittelwert dieser beiden Temperaturen berechnet. Eine Messung der Behandlungstemperatur im Behandlungsraum ist beim Pasteurisationsbetrieb nicht möglich, da die Körner das Thermoelement zerstören würden. Vergleichsmessungen ohne Körner haben jedoch gezeigt, daß die gemessene Temperatur vom Mittelwert um maximal 2 °C abweicht. Deshalb ist es gerechtfertigt, die Versuchstemperatur näherungsweise dem Mittelwert gleichzusetzen.

### **3.4 Untersuchungsverfahren und mikrobiologische Arbeiten**

#### **3.4.1 Vorbereitung der Sporensuspension**

Für die Versuche in flüssigen Medien werden *Bacillus stearothermophilus* Sporen der Firma MERCK (Darmstadt) (Art.-Nr. 11499, Ampullen zu 2 ml) verwendet. Für die monoseptische Kontamination von Pfefferkörnern und Glaskugeln werden auch *Bacillus subtilis* Sporen der Firma MERCK (Art.-Nr. 10649, Ampullen zu 2 ml) eingesetzt. Über die Zusammensetzung der Flüssigkeit in den Ampullen sind von der Firma MERCK keine Angaben erhältlich.

Um die Suspensionsflüssigkeit auszutauschen, werden die Sporen dreimal bei 10.000-facher Erdbeschleunigung für 10 Minuten abzentrifugiert und jedesmal in physiologischer Kochsalzlösung (9 g/l NaCl in bidestilliertem Wasser) resuspendiert.

Anschließend wird dieses Konzentrat in einem Wasserbad für 10 Minuten auf 80 °C erhitzt. Dabei werden eventuell vorhandene vegetative Bakterienzellen abgetötet und die Sporen "aktiviert". Untersuchungen von HAAS [3] zeigten zwar, daß zum einen keine vegetativen Zellen in den Originalampullen vorliegen und die verwendeten Sporen zum anderen auch ohne thermische Vorbehandlung auskeimen.

Dennoch sollte diese Erhitzung immer durchgeführt werden, um einheitliche Ausgangsbedingungen für die Versuche zu schaffen. Insbesondere ist das Ruheverhältnis  $\tau$  nur von der Vorgeschichte der Sporen abhängig [53, 54]. Danach wird die Suspension für Abtötungsversuche in Kochsalzlösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Für Versuche in Säurelösungen werden die Sporen nach nochmaliger Zentrifugation in der zu untersuchenden Säurelösung suspendiert.

### **3.4.2 Methoden zur Bestimmung der Keimzahl**

#### **3.4.2.1 Kochsches Plattengußverfahren**

Die Zahl der überlebenden Sporen bzw. der koloniebildenden Einheiten wird mit dem zuverlässigen Kochschen Plattengußverfahren [75] (MERCK Standard-1-Nähragar Nr. 7881) ermittelt. Die Platten werden 48 Stunden bei 56 °C (*Bacillus stearothermophilus*) bzw. 30 °C (*Bacillus subtilis*) bebrütet. Danach werden die Kolonien ausgezählt, wobei nur Platten mit Koloniezahlen zwischen 30 und 300 berücksichtigt werden.

Bestimmt wird der Mittelwert aus drei Parallelproben. Durch Multiplikation der Koloniezahl mit dem Verdünnungsfaktor erhält man die Gesamtkoloniezahl.

Für den Nachweis sehr geringer Keimgehalte werden zusätzlich zu dem Kochschen Plattengußverfahren noch zwei weitere Keimzahlbestimmungs-Verfahren angewendet.

#### **3.4.2.2 Most-Probable-Number-Technik**

Eine Methode, niedrige Keimgehalte in Flüssigkeiten nachzuweisen, ist die Most-Probable-Number-Technik (MPN) [75]. Diese Methode verwendet das Maximum Likelihood Prinzip der Statistik.

Analog dem Vorgehen bei dem Kochschen Plattengußverfahren wird eine Verdünnungsreihe (Verdünnungsfaktor ist jeweils 10) der zu untersuchenden Flüssigkeit angefertigt. Dann werden je drei Platten

mit der Verdünnungsstufe 0, -1 und -2 beimpft. Wird keine Verdünnungsreihe angefertigt,

Tabelle 3-1: MPN-Auswertetabelle für drei Parallelansätze [76].

Zahl unsteriler Platten pro Verdünnungsstufe			MPN [KBE/ml]	Vertrauensbereichsgrenzen [KBE/ml]			
Stufe 0	Stufe -1	Stufe-2		95 %		99 %	
0	0	0	<0.3				
0	0	1	0.3	<0.1	1.7	<0.1	2.2
0	1	0	0.3	<0.1	1.7	<0.1	2.3
0	2	0	0.6	<0.2	2.2	<0.1	2.9
1	0	0	0.4	0.1	2.1	<0.1	2.8
1	0	1	0.7	0.2	2.7	<0.1	3.5
1	1	0	0.7	0.2	2.8	<0.1	3.6
1	1	1	1.1	0.4	3.4	0.2	4.3
1	2	0	1.1	0.4	3.5	0.2	4.4
1	2	1	1.5	0.6	4.1	0.4	5.1
1	3	0	1.6	0.6	4.2	0.4	5.2
2	0	0	0.9	0.2	3.8	<0.1	5.0
2	0	1	1.4	0.5	4.8	0.2	6.2
2	1	0	1.5	0.5	5.0	0.2	6.4
2	1	1	2.0	0.7	6.0	0.4	7.6
2	2	0	2.1	0.8	6.2	0.5	7.9
2	2	1	2.8	1.1	7.4	0.7	9.2
2	3	0	2.9	1.1	7.7	0.7	9.7
3	0	0	2	<1	13	<1	18
3	0	1	4	1	18	<1	23
3	0	2	6	2	23	1	29
3	1	0	4	1	21	<1	28
3	1	1	7	2	28	2	36
3	1	2	12	4	35	2	45
3	2	0	9	3	38	1	51
3	2	1	15	5	50	3	66
3	2	2	21	8	64	5	82
3	2	3	29	<11	79	8	98
3	3	0	20	10	140	<10	190
3	3	1	50	10	240	<10	320
3	3	2	110	30	480	20	640
3	3	3	>110				

wird mit 1 ml, 0,1 ml und 0,01 ml der zu untersuchenden Flüssigkeit angeimpft.

Kriterium für die Auswertung ist nicht die Zahl der sich bildenden Kolonien, sondern ergibt sich daraus, ob eine Platte steril bleibt oder nicht.

Aus der Zahl der unsterilen Platten pro Verdünnungsstufe kann auf die wahrscheinlichste Zahl der Keime pro ml untersuchter Flüssigkeit geschlossen werden. Dabei wird von normalverteilten Stichproben aus einer großen Grundgesamtheit ausgegangen. Die Vertrauensbereiche der so ermittelten Keimgehalte sind breiter als beim Kochschen Plattengußverfahren. Es ist aber mit dieser Technik noch eine Aussage über den Keimgehalt möglich, wenn das zuverlässigere Kochsche Plattengußverfahren aufgrund der geringen Zahl von Kolonien pro Platte keine Aussage mehr zuläßt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Most Probable Number Technik nur ergänzend zum Kochschen Plattengußverfahren und dem Membranfilterverfahren verwendet.

In Tabelle 3-1 sind die wahrscheinlichsten Keimzahlen in Abhängigkeit von der Zahl unsteriler Platten angegeben. Unwahrscheinliche Kombinationen wie 0 - 0 - 3 fehlen. Diese sollten auch nur mit großer Vorsicht interpretiert werden.

### 3.4.2.3 Membranfilterverfahren

Das Membranfiltrationsverfahren ist ein Verfahren zur mechanischen Anreicherung von Mikroorganismen aus einer beliebigen Menge eines filtrierbaren Untersuchungsmaterials. Selbst bei minimalen Keimgehalten ermöglicht dieses Verfahren eine exakte Keimzahlbestimmung [75].

Bei der Membranfiltration wird die zu untersuchende Flüssigkeit durch ein Membranfilter mit definierter Porenweite gesaugt (Abb. 3-13). Dabei werden die in der Flüssigkeit enthaltenen Partikel und Mikroorganismen zurückgehalten, sofern ihr Durchmesser deutlich größer ist als der der Membranporen. Die Membran wird anschließend auf einen Nährboden aufgebracht oder mit Nährboden übergossen. Der

Keimgehalt der Flüssigkeit wird durch die Zahl der gebildeten Kolonien wiedergegeben.

Es ist darauf zu achten, daß nach erfolgter Filtration der Aufsatztrichter mit sterilem destilliertem Wasser nachgespült wird, um eventuell an der Wandung haftende Keime auf das Filter zu schwemmen.

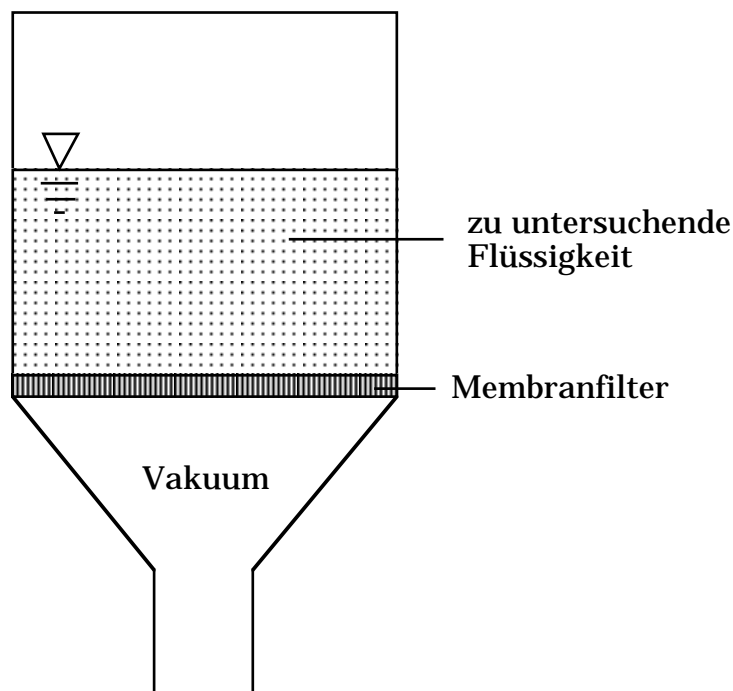


Abb. 3-13: Schematische Darstellung des Membranfiltrationsgerätes.

#### 3.4.2.4 Bestimmung der Keimzahl von Pfefferkörnern und Modellpartikeln

Für die Versuche wird Pfeffer der Firma GEWÜRZMÜLLER (Stuttgart) verwendet. Dieser Pfeffer ist gesiebt und grob gereinigt. Alle Versuche werden mit Pfeffer aus der selben Charge durchgeführt.

Zur vollständigen mikrobiologischen Untersuchung von Gewürzen wird die Bestimmung der Keimzahlen der mesophilen aeroben Mikroorganismen (Gesamtkeimzahl), der coliformen Keime, der aeroben Sporenbildner, der Schimmelpilze und Hefen sowie der säurebildenden Bakterien vorgeschlagen [77, 59].

In einem Vorversuch wurden auf dem verwendeten Pfeffer praktisch keine Hefen und Schimmelpilze festgestellt. Deshalb wurde auf deren weitere Untersuchung verzichtet. Die Untersuchungen dieser Arbeit beschränken sich ausschließlich auf die Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl.

Für die Bestimmung der Keimzahl wird ca. 1 g Pfeffer (1 g Pfeffer  $\approx$  20 Körner) in einen 250 ml Erlenmeyerkolben eingewogen. Dem Pfeffer werden dann 100 ml Pepton-Kochsalz-Lösung (Ringer-Lösung, siehe Kap. 3.4.2.5) zugegeben. Der Kolben wird im Schüttelwasserbad 30 min bei 25 °C geschüttelt. Nach 10 Minuten Standzeit wird der Keimgehalt der Flüssigkeit bestimmt. Dieser Wert wird dann auf den Keimgehalt pro Gramm eingewogenen Pfeffer umgerechnet. Bei hohen Abtötungsraten, d.h. kleinen zu erwartenden Keimgehalten, werden ca. 10 g Pfeffer eingewogen.

Bei den Untersuchungen mit Glaskugeln, die als Modellpartikeln mit bekannten Stoffeigenschaften verwendet werden, wird die Keimzahl auf der Oberfläche von 20 Glaskugeln als äquivalent der Keimzahl auf 1 g Pfeffer angesehen.

### **3.4.2.5 Verwendete Nährböden, Herstellung der Ringer-Lösung**

Für die mikrobiologischen Untersuchungen wurden die folgenden Nährböden der Firma MERCK verwendet :

- MERCK Standard-I-Nähragar Nr.7881
- MERCK Chinablau-Lactose-Agar Nr. 2348 (Spezieller Nährboden zur Keimzahlbestimmung der mesophilen aeroben Mikroorganismen)
- MERCK Würze-Agar Nr. 1.05448 (Spezieller Nährboden zur Keimzahlbestimmung von Hefen und Schimmelpilzen)

Bei Vorversuchen waren mit Würze-Agar nach dem beschriebenen Verfahren praktisch keine Hefen und Schimmelpilze nachweisbar. Die

Unterschiede der ermittelten Keimzahlen mit Chinablau-Laktose-Agar und Standard-I-Nähragar sind vernachlässigbar.

Zusammensetzung der Ringer-Lösung:

- 8,5 g/l NaCl
- 1,0 g/l Pepton
- 0,1 g/l Tween 80 (ein Tensid)
- bidestilliertes Wasser

Vor der Verwendung wird die Lösung bei 121 °C für 15 Minuten sterilisiert.

### 3.4.3 Monoseptische Kontamination von Pfefferkörnern und Glaskugeln

Um die Abtötungskinetik von bakteriellen Sporen bei der Heißgasbehandlung untersuchen zu können, werden sterilisierte Pfefferkörner und Glaskugeln monoseptisch mit *Bacillus subtilis* Sporen (MERCK, Nr. 10649) und *Bacillus stearothermophilus* Sporen (MERCK, Nr. 11499) kontaminiert. Der Pfeffer wurde durch Behandlung mit ionisierender Strahlung sterilisiert. Diese Behandlung wurde freundlicherweise von der Bundesforschungsanstalt für Ernährung in Karlsruhe durchgeführt. Die Glaskugeln werden bei 121 °C für 15 min in einem Autoklaven dampfsterilisiert.

Es mußte ein Verfahren entwickelt werden, das es ermöglicht, Sporen in hinreichend großer Zahl auf der Oberfläche zu binden. Eine hohe Anfangskeimzahl ist notwendig, um nach der Abtötung die verbleibende Keimzahl noch sicher bestimmen zu können. Durch Besprühen der Körner mit Sporensuspension und anschließendes Trocknen sowie durch Bewegen der Kugeln in einem Miniatur-Agglomerierteller, der mit Sporensuspension besprüht wurde, konnten nur Keimgehalte bis  $10^2$  KBE/g erzielt werden. Zu befriedigenden Ergebnissen führt das mehrmalige Tauchen der Körner in hochkonzentrierte Sporensuspension. Nach jedem Tauchvorgang werden die Körner getrocknet. Bei zweimaligem Tauchen werden mit *Bacillus subtilis* Keimgehalte von ca.  $5 \cdot 10^5$  KBE/g und mit *Bacillus stearothermophilus* Keimgehalte von ca.  $10^5$  KBE/g erreicht. Bei der Verwendung von Glaskugeln liegen die

Keimgehalte bezogen auf 20 Kugeln (entspricht der Oberfläche von 1 g Pfeffer) tendenziell etwas niedriger.

### 3.4.4 Bestimmung des Gehalts an ätherischen Ölen

Zum Bestimmen des Gehaltes an ätherischen Ölen wird der Pfeffer gemahlen verwendet. Vor dem Mahlen wurden die Pfefferkörner in flüssigem Stickstoff gekühlt, um eine möglichst niedrige Austrittstemperatur aus der Mühle zu gewährleisten und den Verlust an ätherischen Ölen beim Mahlen gering zu halten. Diese Methode wird in der Industrie als sog. "Tiefkalt-Feinstvermahlung" eingesetzt, wobei Korn-durchmesser von 100  $\mu\text{m}$  erreicht werden [78]. Das Vermahlen erfolgte für die Versuche in gekühltem Zustand in einer nach dem Rotor-Stator-Prinzip arbeitenden Kaffeemühle, deren Zerkleinerungsgrad sich in 14 Stufen einstellen ließ. Es wurde der feinste Mahlgrad gewählt. Dieser liefert eine Korngrößenverteilung mit einem Sauter-durchmesser von 120  $\mu\text{m}$  (bestimmt mit einem Laserbeugungs-Meßgerät).

Die allgemeine Methode zur Gewinnung des ätherischen Öles aus Pflanzenteilen ist nach DAB 10 [79] und SCHWEIZER LEBENSMITTELHANDBUCH [57] die Wasserdampfdestillation. Diese Methode wurde von PÖHNL [59] von der Firma GEWÜRZMÜLLER auch für die vorliegende Arbeit empfohlen. Das flüchtige Öl geht dabei mit dem Wasserdampf über und kondensiert mit ihm. Weil es kaum in Wasser löslich ist, trennt sich das Öl danach unter Schichtenbildung von der wäßrigen Phase [80].

Die Apparatur zum Bestimmen der Menge an ätherischem Öl sollte ein direktes Ablesen erlauben, selbstregelnd sein [81] und gleichzeitig eine Möglichkeit bieten, das Öl für weitergehende Versuche zu erhalten [80]. Diese Kriterien werden von der vorliegenden Anlage erfüllt, bei der es sich um eine nach DAB 10 [79] modifizierte Neo-Clavenger-Apparatur [80] handelt (Abb. 3-14). Darin läuft die Destillation kontinuierlich ab.



Zur volumetrischen Bestimmung wird aus einem 500 ml fassenden Rundkolben, der ca. 3 g gemahlene Pfeffer, 200 ml destilliertes Wasser und einige Siedesteinchen [79] enthält, der mit ätherischem Öl beladene Wasserdampf über einen Rückflußkühler geleitet. Der Kühler wird im Gegenstrom betrieben. Das Destillat tropft in ein Auffangrohr, das als Meßkapillare ausgeführt ist. Um die Phasentrennung durch eine größere Oberfläche zu begünstigen, ist dieses Rohr oberhalb der Kapillare zu einer Blase aufgeweitet. Dort sammelt sich das ätherische Öl aufgrund seiner geringeren Dichte auf dem Wasser schwimmend an. Das Wasser fließt über ein Rücklaufrohr zurück in den Rundkolben, daher der Begriff "kontinuierliche Destillation". Nach dem Erkalten wird das ätherische Öl in die Meßkapillare gezogen und kann dort volumetrisch bestimmt werden [61].

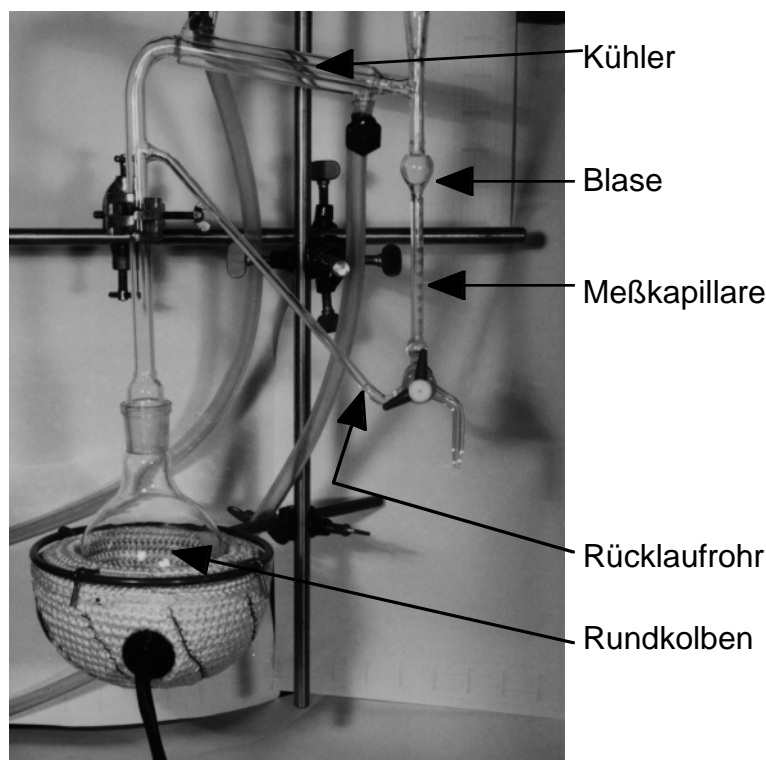


Abb. 3-14: Apparatur zur kontinuierlichen Destillation.

Beim Befüllen der Apparatur ist darauf zu achten, daß in das Rücklaufrohr soviel Wasser gegeben wird, bis es an der Verbindungsstelle zu dem Rohr, in dem der Dampf aufsteigt, austritt und in den Destilla-

tionskolben herunterläuft [79]. Dadurch wird gewährleistet, daß sich der Trennspiegel von Anfang an in der Blase befindet. Die Kühlung sollte so eingestellt werden, daß der Dampf vollständig kondensiert, das Kondensat aber noch gut abläuft. Ein zu hoher Kühlwasserstrom kann dazu führen, daß der Dampf bereits im vorderen Teil des Kühlers kondensiert und Öltropfen dort an der Wand haften bleiben. Bei zu niedrigem Kühlwasserstrom kondensiert der Dampf nicht vollständig und kann durch den seitlichen Rohransatz entweichen. In beiden Fällen geht ätherisches Öl für den Nachweis verloren.

Die Destillationsdauer beträgt 2 h. Dabei läßt sich beobachten, daß der Hauptanteil des Öles in den ersten 30 min übergeht. Die Apparatur wird mit 10%iger Extranlösung gereinigt (MERCK, MA 02 neutral, Nr. 1.07553). Dazu werden sowohl der Rundkolben als auch die Destillationsbrücke vollständig mit Reinigungslösung gefüllt, die mindestens 30 min lang einwirkt. Danach wird zuerst mit warmem, dann mit kaltem Leitungswasser und zum Schluß gründlich mit destilliertem Wasser gespült.

### **3.4.5 Farbmessung**

Der Pfeffer verändert während der Behandlung seine Farbe. Die Farbmessungen wurden mit einem Colortron Farbmeßgerät der Firma LIGHT SOURCE INC. (Larkspur, Kalifornien, USA) durchgeführt. Das Gerät weist eine Meßfläche von ca 5 x 5 mm auf. Die zu vermessende Fläche wird von der eingebauten Lampe beleuchtet. Von dem reflektierten Licht wird eine Spektralanalyse durchgeführt. Um Alterungseffekte der eingebauten Lampe und Drift des Photodetektors zu eliminieren, wird das Gerät vor der Messung mit Farbmeßtafeln kalibriert. Das Gerät liefert einen integralen Mittelwert über die Meßfläche. Mit der mitgelieferten Software kann das Meßergebnis in die meisten gängigen Farbsysteme umgerechnet werden (z.B. Rot-Grün-Blau (RGB), Cyan-Magenta-Yellow-Black (CMYK) oder Hue-Saturation-Brightness (HSB)). Für die Beurteilung der Färbung von gemahlenem schwarzen Pfeffer hat sich die visuelle Farbsättigung im Farbsystem Cyan-Magenta-Yellow-Black (Vierfarb-Druckprozeß) als geeignet erwiesen.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Einfluß von pH-Wert und verwendeter Säure auf die Hitzeresistenz**

Die Versuche zum Einfluß des pH-Wertes und der verwendeten Säure wurden mit der diskontinuierlichen Kapillarrohranlage (siehe Kap. 3.1) durchgeführt. Mit dieser Anlage sind quasiisotherme Bedingungen bis 130 °C erreichbar.

#### **4.1.1 Voruntersuchungen**

Der pH-Wert der verwendeten Säurelösungen wurde mit einer pH-Elektrode gemessen. Dabei wurde die Temperatur von Raumtemperatur bis 90 °C variiert. Es zeigte sich sowohl beim Aufheizen als auch beim Abkühlen keine signifikante Veränderung des pH-Wertes im gesamten Temperaturbereich. Es wurde deshalb davon ausgegangen, daß der pH-Wert bei den Versuchen konstant bleibt.

Die Sporen werden bei pH = 4 auch bei Raumtemperatur durch Säureangriff langsam abgetötet. Dieser Einfluß wurde dadurch minimiert, daß die Sporen erst unmittelbar vor der Erhitzung in der jeweiligen Säure suspendiert wurden.

In den Säurelösungen kommt es zur Flockung bzw. Agglomeratbildung der suspendierten Sporen. Es wird angenommen, daß die Größe der entstandenen Agglomerate keinen Einfluß auf die Hitzeresistenz der einzelnen Sporen hat. Nach dem Erhitzungsversuch wurde versucht, diese Agglomerate durch Aufschütteln und Ultraschallbehandlung ( $P_V = 2,5 \text{ W/ml}$ ) wieder aufzubrechen. Die aus der Agglomeratbildung resultierenden Abweichungen erzeugen große Standardabweichungen der Meßwerte sowie tendenziell zu geringe Keimzahlen sowohl bei der Nullprobe als auch bei der erhitzten Probe, da ein Agglomerat unabhängig von der Zahl der enthaltenen Sporen als eine keimbildende Einheit erfaßt wird.

Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich bei den eingezeichneten Fehlerbalken und den Schwankungsbreiten immer um die Standardabweichung.

#### 4.1.2 Abtötungsergebnisse

In den nachfolgenden Abbildungen 4-1 bis 4-4 sind die gemessenen D-Werte als Funktion der Temperatur sowie die Inaktivierungskonstanten über der reziproken Temperatur aufgetragen. Die Versuche wurden immer nach der Kinetik erster Ordnung ausgewertet. Eine Auswertung mit dem Aktivierungs-Inaktivierungs-Modell war nicht sinnvoll. Es wurden nie positive Überlebensraten gefunden. Man kann erkennen, daß sich die Meßwerte für die verschiedenen Säuren bei niedrigen Temperaturen deutlich unterscheiden. Die Unterschiede werden mit steigender Temperatur kleiner und verschwinden schließlich ganz. Die kinetischen Parameter sind in Tabelle 4-1 und 4-2 angegeben.

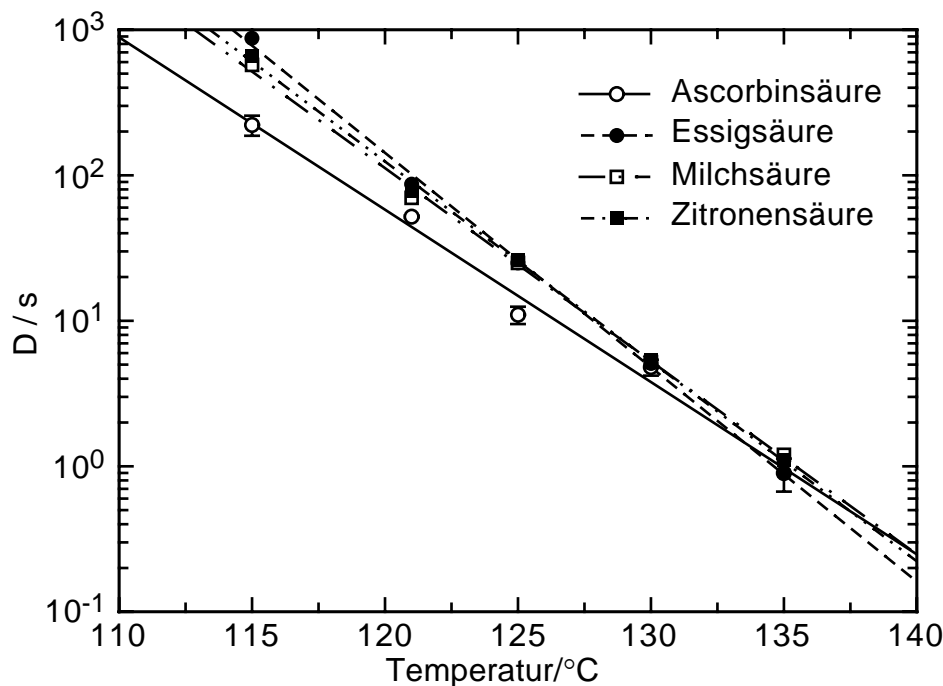


Abb. 4-1: D- Werte von *Bacillus stearothermophilus* Sporen in Säurelösungen bei pH = 5. Die Standardabweichungen sind exemplarisch für Ascorbinsäure eingezeichnet.

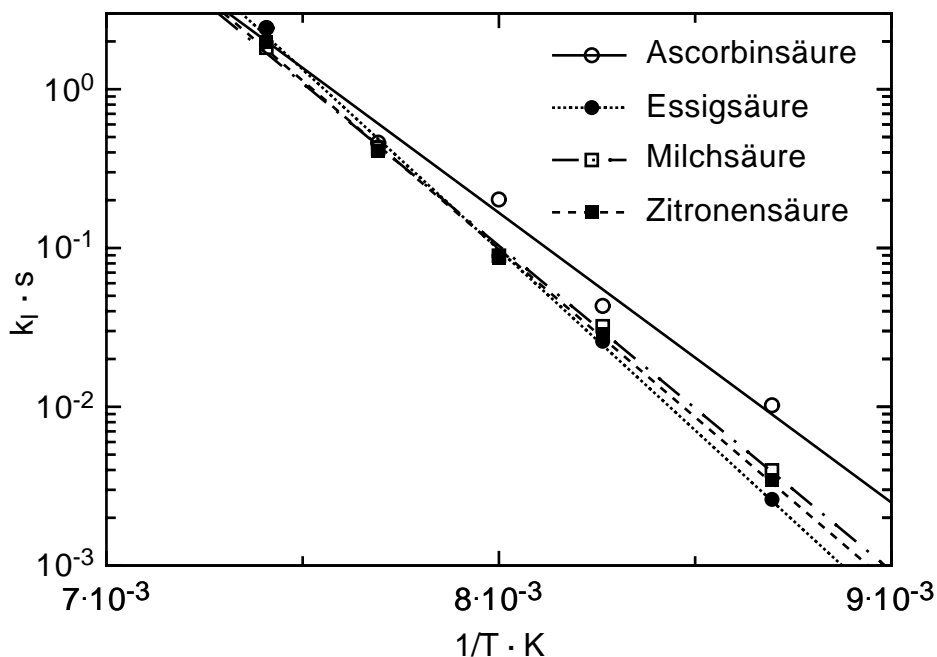


Abb. 4-2: Arrhenius-Diagramm der Inaktivierungskonstante  $k_I = \ln 10/D$  von *Bacillus stearothermophilus* Sporen in Säurelösungen bei pH = 5.

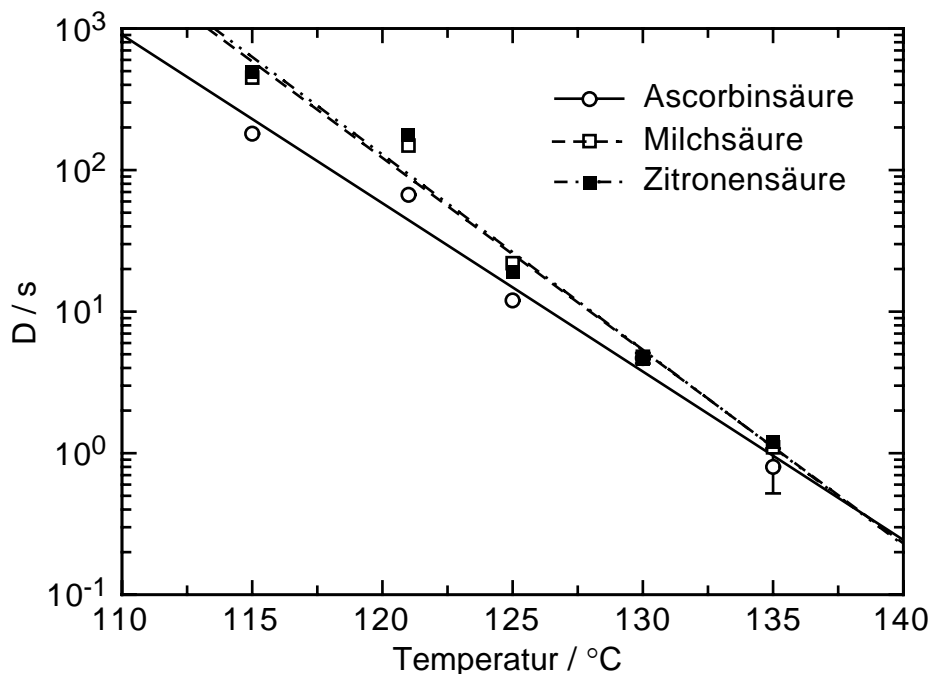


Abb. 4-3: D- Werte von *Bacillus stearothermophilus* Sporen in Säurelösungen bei pH = 4. Exemplarisch ist eine Standardabweichung eingezeichnet.

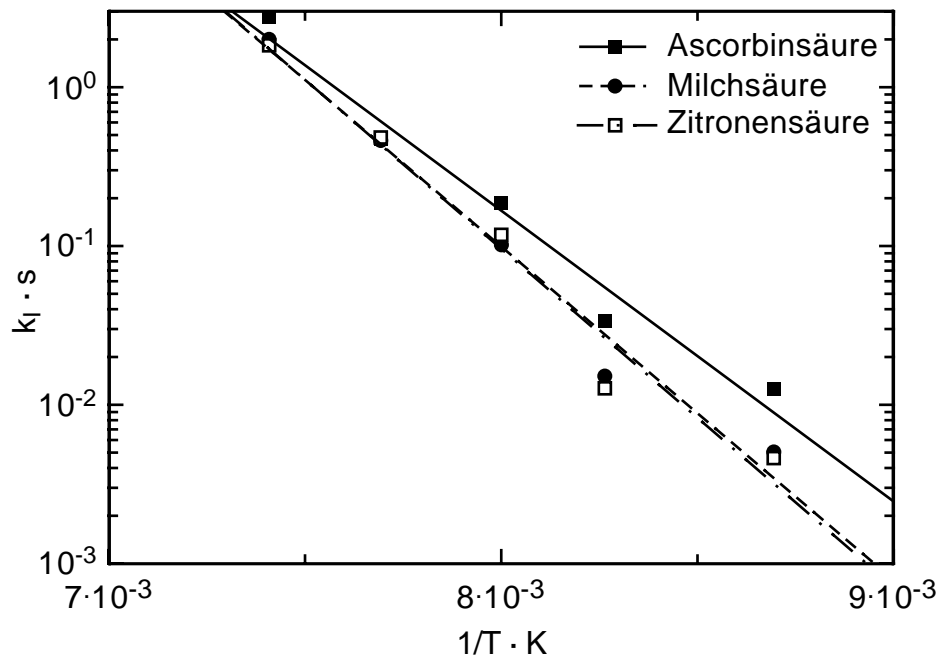


Abb. 4-4: Arrhenius-Diagramm der Inaktivierungskonstante  $k_I = \ln(10)/D$  von *Bacillus stearothermophilus* Sporen in Säurelösungen bei pH = 4.

Tabelle 4-1: D-Werte und Inaktivierungsenergien von *Bacillus stearothermophilus* Sporen in Säurelösungen bei pH = 5. Angegeben sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung.

pH=5	Ascorbin- säure	Essigsäure	Milch- säure	Zitronen- säure
$D_{115} \text{ } ^\circ\text{C} / \text{s}$	222±13	875±140	574±41	663±35
$D_{121} \text{ } ^\circ\text{C} / \text{s}$	52±4,9	87±5,3	70±2,0	78±1,0
$D_{125} \text{ } ^\circ\text{C} / \text{s}$	11±0,5	25±2,4	25±1,5	19±0,9
$D_{130} \text{ } ^\circ\text{C} / \text{s}$	4,8±0,6	5,1±0,9	5,2±0,4	5,4±0,6
$D_{135} \text{ } ^\circ\text{C} / \text{s}$	0,9±0,13	0,9±0,18	1,2±0,15	1,1±0,23
$E_I / \text{kJ/mol}$	359±21	447±8,3	403±8,2	417±7,5

Tabelle 4-2: D-Werte und Inaktivierungsenergien von *Bacillus stearothermophilus* Sporen in Säurelösungen bei pH = 4. Angegeben sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung.

pH=4	Ascorbin- säure	Milch- säure	Zitronen- säure
$D_{115} \text{ } ^\circ\text{C} / \text{s}$	181±22	450±30	492±15
$D_{121} \text{ } ^\circ\text{C} / \text{s}$	67±11	149±18	178±8
$D_{125} \text{ } ^\circ\text{C} / \text{s}$	12±1,3	22±1,4	19±0,9
$D_{130} \text{ } ^\circ\text{C} / \text{s}$	4,7±0,2	4,8±0,9	4,6±0,4
$D_{135} \text{ } ^\circ\text{C} / \text{s}$	0,8±0,25	1,1±0,3	1,2±0,28
$E_I / \text{kJ/mol}$	360±31	413±31	418±39

Aus Tabelle 4-1 und Tabelle 4-2 kann man erkennen, daß sich die D-Werte bei pH = 5 bei niedrigen Temperaturen signifikant von Säure zu Säure unterscheiden. Bei pH = 4 ist der Unterschied weniger ausgeprägt. Der chemische Angriff der Säuren erfolgt bei niedrigen Temperaturen schnell genug, um das Abtötungsergebnis zu beeinflussen. Bei Temperaturen über 125 °C kann man von einer gleichen Hitzeresistenz unabhängig von der verwendeten Säure ausgehen. Bei den höheren Temperaturen wachsen die relativen Standardabweichungen stark an. Das liegt zum einen an der in den Voruntersuchungen festgestellten Agglomeratbildung. Zum andern liegt dieser Temperaturbereich  $\vartheta > 130 \text{ } ^\circ\text{C}$  oberhalb des Bereiches, für den quasiisotherme Bedingungen mit der diskontinuierlichen, pneumatischen Kapillarrohranlage erreicht werden können. Mit der kontinuierlichen Kapillarrohrstrecke kann bei den erforderlichen langen Verweilzeiten keine hochturbulente Strömung ( $Re > 10000$ ) realisiert werden, da der Druckverlust bei Verwendung einer entsprechend langen 0,2-mm-Kapillare den maximalen Pumpendruck übersteigen würde. Bei Kapillaren mit größerem Durchmesser reicht der maximale Volumenstrom der Pumpe nicht aus, um Reynoldszahlen  $> 10000$  zu erzielen. Die z-Werte liegen für alle

untersuchten Lösungen im Bereich von 7 °C bis 10 °C. Zu steigenden Temperaturen wachsen die z-Werte, dies wurde auch schon von HAAS [3] beobachtet.

Die Auftragungen zeigen, daß im Bereich bis 135 °C die Abtötungskinetik von *Bacillus stearothermophilus* Sporen in Säurelösungen gut durch die Kinetik erster Ordnung wiedergegeben werden kann.

Es kann davon ausgegangen werden, daß sich die Sporen immer annähernd im thermischen Gleichgewicht mit ihrer Umgebung befinden. Die Zeitdauer, bis sich die Temperatur zu 99 % ausgeglichen hat, beträgt 3 µs für eine einzelne Spore [2]. Bei hohen Temperaturen und damit verbunden kurzen Zeiten ist kein signifikanter Unterschied der Hitzeresistenz in den verschiedenen Säuren zu beobachten. Der chemische Angriff der Säuren erfolgt so langsam, daß er sich bei den kurzen Behandlungszeiten nicht mehr deutlich bemerkbar macht. Die Sporen werden rein thermisch inaktiviert. Der pH-Wert des umgebenden Mediums, in dem die Sporen schon vor dem Versuch einige Zeit (ca. 20 min) suspendiert waren, bestimmt die Durchlässigkeit der Sporencortex, damit die Art der Hydratation der Sporen-DNA und deshalb deren Hitzeresistenz. Bei vollständiger Hydratation und gleichzeitiger Abwesenheit von freiem Wasser im Protoplasma der Spore verhält sich dieses annähernd wie ein Festkörper. Die DNA ist am stärksten gegen Denaturierung stabilisiert [11]. Erst bei langen Behandlungszeiten kommt es zur Destabilisierung der Sporencortex, und die Säuremoleküle können in das Innere der Spore eindringen. Jetzt hat die Art der Säure und die Reaktionsgeschwindigkeit, mit der die Säure die DNA denaturiert, einen Einfluß auf die Abtötungsgeschwindigkeit.

Dies bestätigt, daß die Hitzeresistenz von Bakteriensporen stark vom umgebenden Medium abhängt. Die erforderliche Behandlungszeit für das Sterilisieren von z.B. Konserven kann somit nicht aus Versuchen mit Modellösungen gleichen pH-Wertes zuverlässig vorhergesagt werden. Die Abtötungskinetik sollte daher immer durch Experimente mit dem später zu behandelnden Produkt und/oder einer dem Produkt nachgebildeten Lösung bestimmt werden.



## 4.2 Hitzeresistenz im Bereich $\vartheta > 140\text{ °C}$

Es wurden die Überlebenskurven von *Bacillus stearothermophilus* Sporen in physiologischer Kochsalzlösung bei den Temperaturen 145 °C, 150 °C, 155 °C und 160 °C gemessen. Die Ergebnisse wurden nach dem Aktivierungs-Inaktivierungs-Modell und nach der Kinetik erster Ordnung ausgewertet. Die Versuche wurden mit der kontinuierlichen Erhitzungsanlage (siehe Kap. 3.2) durchgeführt.

Nach der in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Vorbehandlung der Sporen hat HAAS [3] ein mittleres Ruheverhältnis von  $\tau = 7,2$  ermittelt. Dieses wurde bei der Auswertung als konstant angenommen, da es nur von der bei allen Versuchen gleichen Vorgeschichte der Sporen abhängt. Bei der thermischen Abtötung von *Bacillus stearothermophilus* Sporen nimmt HAAS [3] die Aktivierungsreaktion als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt an, das heißt, die Steigung der Überlebenskurve im linearen Teil entspricht dem Betrage nach der Konstanten  $k_A$  der Aktivierungsreaktion. Diese wurde durch lineare Regression der Meßpunkte im linearen Teil der Kurven berechnet. Der dritte verbleibende Parameter, die Geschwindigkeitskonstante für die Inaktivierungsreaktion  $k_I$ , wurde durch Anpassung des Modells an die Meßpunkte nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate bestimmt.

In den Abbildungen 4-5, 4-6, 4-7 und 4-8 sind die Überlebenskurven sowie die berechneten Kurven nach dem Aktivierungs-Inaktivierungs-Modell (A.-I.-Modell) für die untersuchten Temperaturen dargestellt. Ebenfalls ist für jeden Meßpunkt die zugehörige Standardabweichung eingezeichnet. Diese sind in einigen Fällen so klein, daß sie in der Größe des Symbolen verschwinden.

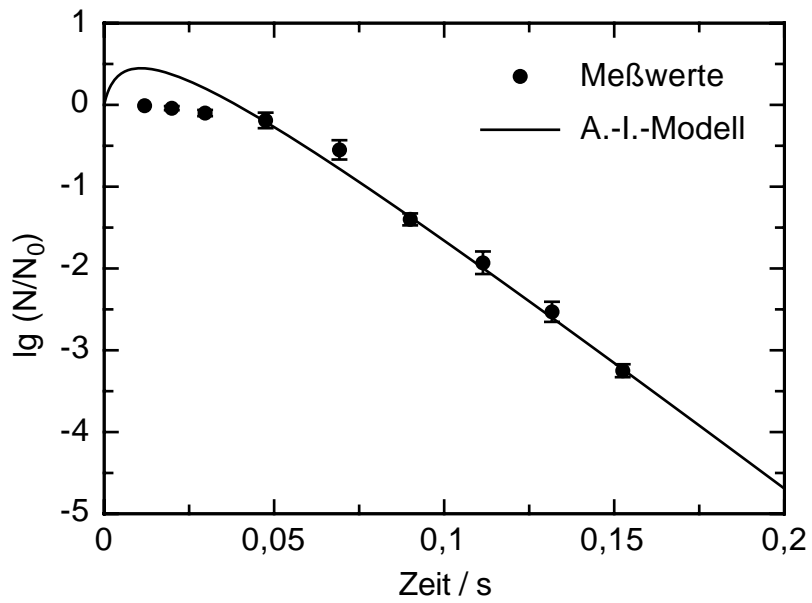


Abb. 4-5: Überlebensdiagramm bei 145 °C (Meßwerte jeweils mit Standardabweichung),  $n = \lg(N/N_0)$ .

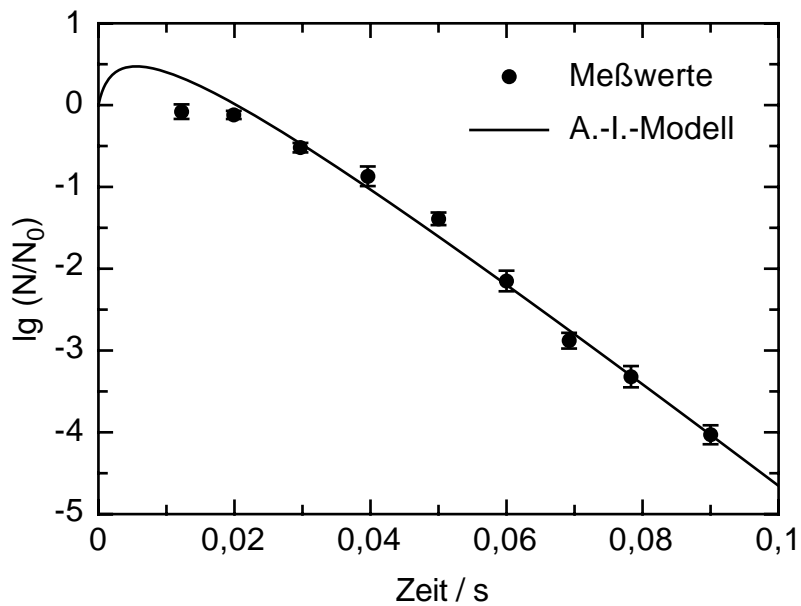


Abb. 4-6: Überlebensdiagramm bei 150 °C (Meßwerte jeweils mit Standardabweichung),  $n = \lg(N/N_0)$ .

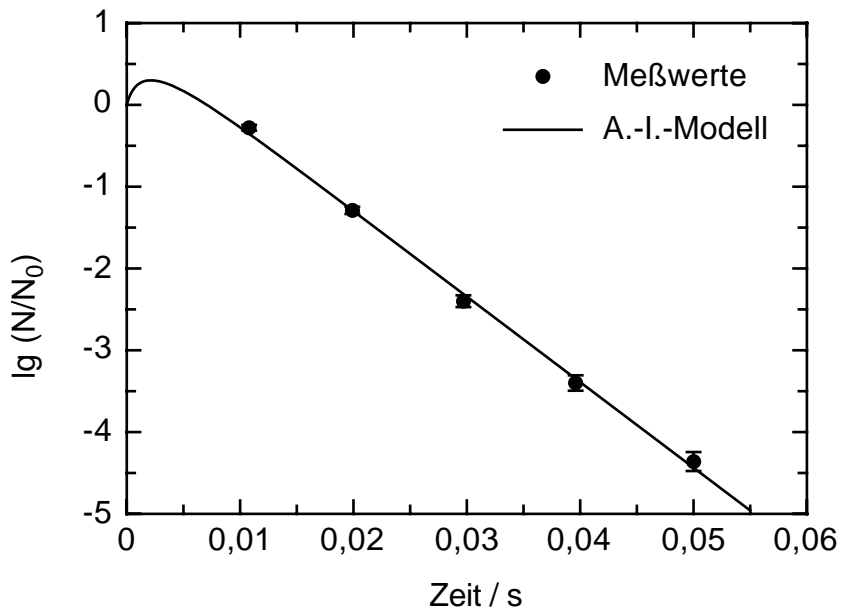


Abb. 4-7: Überlebensdiagramm bei 155 °C (Meßwerte jeweils mit Standardabweichung),  $n = \lg(N/N_0)$ .

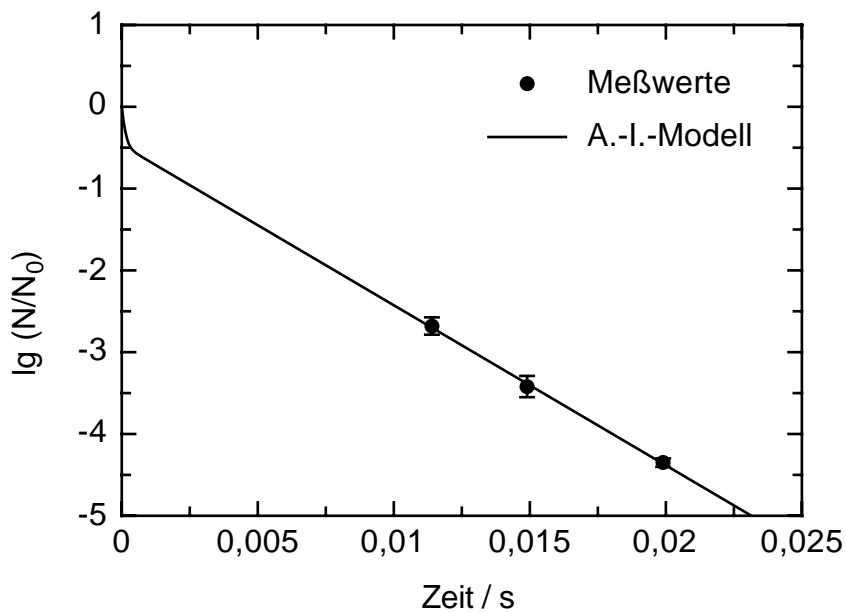


Abb. 4-8: Überlebensdiagramm bei 160 °C (Meßwerte jeweils mit Standardabweichung),  $n = \lg(N/N_0)$ .

Die Ergebnisse zeigen, daß erwartungsgemäß mit zunehmender Temperatur bei gleicher Heißhaltezeit die Überlebensraten abnehmen. Bei den Temperaturen 145 °C und 150 °C ist zu erkennen, daß bei

kurzen Heißhaltezeiten kein merklicher Abtötungseffekt auftritt. Eine Aktivierung, das heißt positive Überlebensraten, konnte in keinem Fall beobachtet werden.

Eine Modellierung nach dem Inaktivierungsmodell erster Ordnung würde bei diesen Ergebnissen zu großen Fehlern führen, da diese nicht sinnvoll durch eine Ursprungsgerade darstellbar sind. Das Aktivierungs-Inaktivierungsmodell hingegen scheint das Abtötungsverhalten in geeigneter Weise zu beschreiben, wenngleich dieses Modell bei kurzen Zeiten positive Überlebensraten ergibt, die nicht nachgewiesen werden konnten. Bei Sterilisationsverfahren interessiert man sich aber für den Bereich, in dem hohe Abtötungsraten erzielt werden (Sterilitätskriterium meist  $n < -4$ ). Diese hohen Abtötungsraten befinden sich bei allen untersuchten Temperaturen im linearen Teil der Kurven, der durch das Aktivierungs-Inaktivierungsmodell gut beschrieben wird. Die zu diesem Modell gehörenden Geschwindigkeitskonstanten  $k_A$  und  $k_I$  sind in Tabelle A-1 im Anhang zusammengestellt.

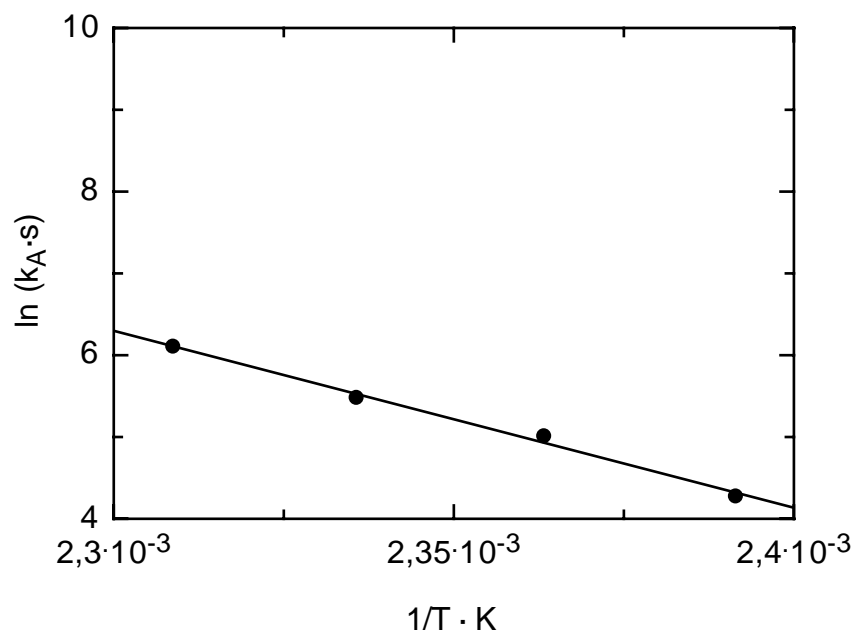


Abb. 4-9: Arrhenius-Diagramm der Aktivierungskonstanten für *Bacillus stearothermophilus* Sporen in physiologischer Kochsalzlösung.

Die Abbildungen 4-9 und 4-10 zeigen die Temperaturabhängigkeit der beiden Geschwindigkeitskonstanten im Arrhenius-Diagramm.

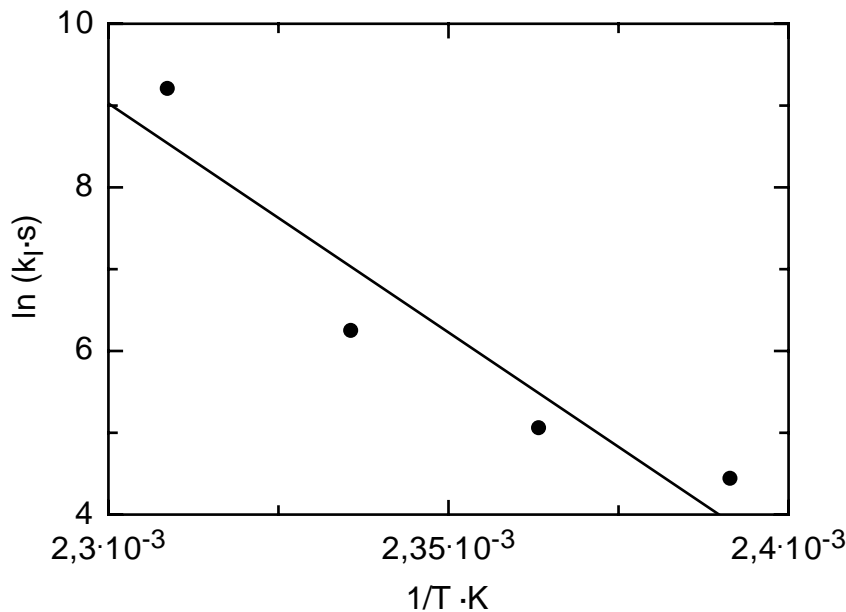


Abb. 4-10: Arrhenius-Diagramm der Inaktivierungskonstanten für *Bacillus stearothermophilus* Sporen in physiologischer Kochsalzlösung.

Es ergibt sich eine gute Korrelation für die Aktivierungskonstante mit der Temperatur. Diese kann auch mit größerer Zuverlässigkeit als die Inaktivierungskonstante bestimmt werden, da sie den linearen Teil der Kurven, für den viele Meßpunkte vorliegen, repräsentiert. Die lineare Regression für die Inaktivierungskonstante korreliert nicht gut. Diese Konstante wurde durch Anpassung des Modells an die Meßpunkte gewonnen. Sie repräsentiert den Bereich kurzer Zeiten, also der Aktivierung, für den wenige Meßpunkte vorliegen und in dem auch keine Aktivierung beobachtet wurde.

Für die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $k_A$  und  $k_I$  ergibt sich (Angaben jeweils mit Standardabweichung,  $r$  = Korrelationskoeffizient):

$$\ln(k_A \cdot s) = 56 \pm 3 - \frac{21630 \pm 1200}{T/K} \quad r = -0,9969 \quad (4-1)$$

$$\ln(k_I \cdot s) = 138 \pm 33 - \frac{55980 \pm 14140}{T/K} \quad r = -0,9417 \quad (4-2)$$

Die Aktivierungsenergie beträgt  $180 \pm 10$  kJ/mol, die Inaktivierungsenergie  $465 \pm 117$  kJ/mol.

Die Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierungsreaktion scheint bei  $160$  °C zu groß zu sein (Abb. 5-10). Dies kann daran liegen, daß bei dieser Temperatur zu wenige Meßwerte vorliegen und gerade in dem Zeitbereich, der für die Inaktivierungskonstante maßgebend ist ( $t < 0,01$  s), keine Meßwerte ermittelt werden können.

Läßt man den Wert bei  $160$  °C unberücksichtigt, so ergibt sich eine bessere Korrelation, und für  $k_I$  gilt dann:

$$\ln(k_I \cdot s) = 82 \pm 15 - \frac{32400 \pm 6150}{T/K} \quad r = -0,9695 \quad (4-3)$$

Die Inaktivierungsenergie beträgt in diesem Fall  $269 \pm 51$  kJ/mol.

In beiden Fällen hat die Gerade für  $k_I$  die größere Steigung im Arrhenius-Diagramm als die Gerade für  $k_A$ . Daher muß der Schnittpunkt der beiden Geraden im Gegensatz zu den von HAAS [3] ermittelten Resultaten im Bereich tieferer Temperaturen liegen. Für ein  $k_I$  nach Gleichung (4-2) liegt dieser bei  $147$  °C und für ein  $k_I$  nach Gleichung (4-3) bei  $145$  °C. Unterhalb dieses Schnittpunktes wäre dann die Inaktivierung die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion, und es müßte nach Fall 1 (siehe Kap. 2.1.3.1) ausgewertet werden.

Beim Versuch einer Auswertung nach Fall 1 ergaben sich für die Temperaturen  $145$  °C und  $150$  °C fast identische Anpassungskurven, und die Geschwindigkeitskonstanten für Aktivierung und Inaktivierung nahmen ähnliche Zahlenwerte an. Diese sind in beiden Fällen fast gleich, da sie im Bereich des Schnittpunktes der beiden Arrheniusgeraden liegen, wo Aktivierungs- und Inaktivierungsreaktion gleich schnell sind. Die Zahlenwerte sind in Tabelle A-1 und A-3 im Anhang zusammengestellt. Für die Temperaturen  $155$  °C und  $160$  °C war eine Auswertung nach Fall 1 nicht sinnvoll.

Um die Temperaturabhängigkeit der Hitzeinaktivierung der Sporen mit der Temperaturabhängigkeit von chemischen Reaktionen vergleichen zu können, werden sogenannte scheinbare D-Werte ( $D_{app}$ ) eingeführt. Diese werden aus der Geschwindigkeitskonstanten berechnet, die den linearen Teil der Überlebenskurven beschreiben [3], in diesem Fall also  $k_A$ . In Tabelle A-2 im Anhang sind die Zahlenwerte von  $D_{app}$  für die einzelnen Temperaturen wiedergegeben. Zur Ermittlung des z-Wertes wird der dekadische Logarithmus der scheinbaren D-Werte über der Temperatur aufgetragen. Abbildung 4-11 zeigt dieses Abtötungszeit-Diagramm.

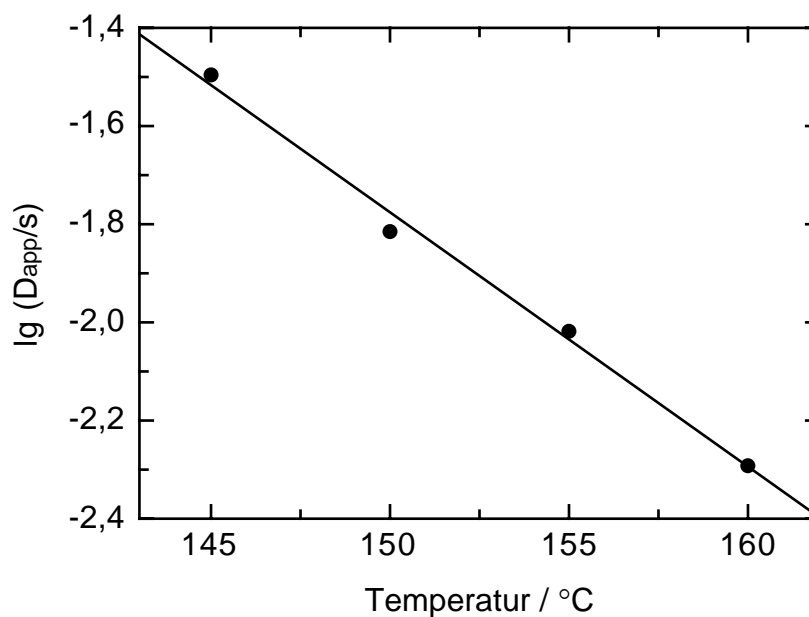


Abb. 4-11: Abtötungszeit-Diagramm für *Bacillus stearothermophilus* Sporen in physiologischer Kochsalzlösung.

Auch hier ergibt sich eine gute Korrelation ( $r = -0,9967$ ) für die Regressionsgerade. Der z-Wert ist der negative Kehrwert der Geradensteigung. Er ergibt sich für den untersuchten Temperaturbereich zu  $19,3\text{ °C}$  mit einer Standardabweichung von  $1,1\text{ °C}$  ( $E_A = 186 \pm 10\text{ kJ/mol}$ ). Damit liegt er deutlich höher als die in der Literatur angegebenen z-Werte für den UHT-Bereich von  $8\text{ °C}$  bis  $10\text{ °C}$  [3]. Tendenziell beschreibt auch HAAS [3], daß bei hohen Temperaturen die Temperaturabhängigkeit des D-Wertes abnimmt, also der z-Wert zunimmt.

Es ist anzumerken, daß diese Versuchsergebnisse stark von den früher an der alten Anlage durchgeführten Versuchen [3] abweichen. Es waren bei gleicher Temperatur und gleicher berechneter Verweilzeit vor dem Austausch der T-Stücke mit 1,27 mm durch T-Stücke mit 0,33 mm Innendurchmesser durchweg größere Überlebensraten gemessen worden. Wahrscheinlich ergaben sich bei den großen Durchmessern Strömungstoträume, die nicht zum Heißhaltevolumen dazugerechnet werden dürfen. Vor dem Austausch war die tatsächliche Heißhaltezeit wahrscheinlich kleiner als berechnet. Das führt zu einer Verschiebung der Überlebenskurven zu größeren Zeiten, was dann eine scheinbar größere Überlebensrate zur Folge hat.

#### **4.2.1 Laminare Strömung bei größeren Kapillardurchmessern**

Um bei der Temperatur von 145 °C die Heißhaltezeit auf 0,2 Sekunden ausdehnen zu können, wurde eine Kapillare mit 0,4 mm Durchmesser in die Heißhaltezone eingebaut. Eine Kapillare mit einem Durchmesser von 0,2 mm müßte bei gleichem Innenvolumen fast 2 m lang sein, was einen zu hohen Druckverlust zur Folge hätte.

Die Überlebensraten, die mit der dickeren Kapillare gemessen wurden, waren deutlich höher als durch Extrapolation der bis dahin mit der dünnen Kapillare erzielten Meßpunkte zu erwarten gewesen wäre. Zum Vergleich wurde eine weitere Kapillare mit 0,2 mm Innendurchmesser und einer Länge von 1,5 m verwendet, mit der Heißhaltezeiten bis 0,15 Sekunden realisiert werden konnten. Die mit dieser Kapillare gemessenen Überlebensraten lagen auf der Extrapolationsgeraden.

Es wird vermutet, daß in der Kapillare mit 0,4 mm Innendurchmesser trotz überkritischer Reynoldszahlen laminare Strömungsverhältnisse geherrscht haben, was zu einer breiteren Verweilzeitverteilung und damit zu einer größeren Überlebensrate geführt hat. Dies ist durchaus möglich, da bei derart geringen Durchmessern eine laminare Strömung länger aufrecht erhalten werden kann [82].



Oberhalb der kritischen Reynoldszahl  $Re_{krit} = 2300$  schaukeln sich zufällige Störungen des laminaren Geschwindigkeitsprofils auf und zerstören dieses schließlich. Unterhalb von  $Re_{krit}$  werden diese jedoch weggedämpft, so daß das laminare Profil in jedem Fall erhalten bleibt. Die kritische Reynoldszahl besagt deshalb nur, daß unterhalb ihres Wertes laminare Strömung vorliegen muß, oberhalb ihres Wertes turbulente Strömung auftreten kann. Die kritische Reynoldszahl ist also ein notwendiges, aber nicht hinreichendes Kriterium für turbulente Strömungsverhältnisse. In der Tat ist es möglich, laminare Strömung bei geeigneten Vorsichtsmaßnahmen auch in größeren Querschnitten bis zum fünffachen Wert der kritischen Reynoldszahl und darüber aufrecht zu erhalten [83].

Bei den Versuchen mit der Kapillare mit 0,4 mm Durchmesser lag die Reynoldszahl zwischen 5300 und 8300. Bei allen Versuchen mit der Kapillare mit 0,2 mm Durchmesser lag die sie über 9600, für kurze Zeiten unter 0,1 s konnte immer eine Reynoldszahl zwischen 14000 und 15000 erreicht werden.

In der folgenden Rechnung wird die Überlebensrate unter Berücksichtigung der Verweilzeitverteilung bei laminarer Rohrströmung bestimmt:

Für die Dichteverteilung der Verweilzeit  $E(t)$  einer laminaren Rohrströmung gilt [84]

$$E(t) = 0 \quad \text{für} \quad t < \frac{\bar{t}}{2}$$

$$E(t) = \frac{\bar{t}^2}{2 \cdot t^3} \quad \text{für} \quad t \geq \frac{\bar{t}}{2} \quad (4-4)$$

mit  $\bar{t} = \text{mittlere Verweilzeit} = V / \mathcal{V}$

Für die Anzahl  $\bar{N}$  der überlebenden Sporen gilt

$$\bar{N} = \int_0^{\infty} N(t) \cdot E(t) \, dt \quad (4-5)$$

$N(t)$  ist durch das Aktivierungs-Inaktivierungsmodell (Gleichung (2-21)) als Funktion gegeben.

Damit folgt für das Überlebensverhältnis

$$\frac{\bar{N}}{N_0} = \int_{\frac{\bar{t}}{2}}^{\infty} \left( \alpha \cdot e^{-k_I \cdot t} + (1 - \alpha) \cdot e^{-k_A \cdot t} \right) \cdot \frac{\bar{t}^2}{2t^3} dt \quad (4-6)$$

Dieses Integral wurde numerisch mit Hilfe des Computer-Algebra-Systems MAPLE gelöst.

In Tabelle 4-3 sind die Versuchsergebnisse mit der Kapillare mit 0,4 mm Durchmesser den nach Gleichung (4-6) berechneten Werten gegenübergestellt.

Tabelle 4-3: Vergleich der Meßwerte mit der Kapillare mit 0,4 mm Durchmesser und der berechneten Werte bei laminarer Strömung.

Heißhaltezeit t (s)	n (Meßwerte)	n (berechnete Werte)
0,112	- 0,88	- 0,89
0,130	- 1,28	- 1,20
0,152	- 1,46	- 1,55
0,174	- 2,15	- 1,91

Aufgrund der guten Übereinstimmung von Versuchs- und Simulationsergebnissen kann man annehmen, daß unter den gegebenen Bedingungen laminare Strömung vorgelegen hat. Eine ähnlich gute Übereinstimmung ergibt sich auch, wenn mit der Kinetik erster Ordnung gerechnet wird, da sich die betrachteten Punkte im linearen Ast der Überlebenskurve befinden.

Um mit der Kapillare mit 0,4 mm Durchmesser Reynoldszahlen über 14000 zu realisieren, muß der Volumenstrom mindestens 50 ml/min betragen, der gerade noch von der verwendeten Pumpe erreicht wurde. Reynoldszahlen über 14000 waren nicht zu erreichen, deshalb wurden keine weiteren Versuche mit Kapillaren mit 0,4 mm Innendurchmesser durchgeführt. Optimal wäre eine Kapillare gewesen, die den gleichen Durchmesser wie die T-Stücke (0,33 mm) aufgewiesen hätte. Kapillaren mit diesem Innendurchmesser waren aber nicht erhältlich. Alle gelieferten Kapillaren mit 0,3 mm Nenndurchmesser erwiesen sich als Kapillaren mit 0,4 mm Innendurchmesser. Dies ließ sich durch Auslitern der jeweils 6 m langen Kapillaren sicher feststellen. Alle übrigen Versuche wurden mit Kapillaren mit 0,2 mm Innendurchmesser durchgeführt.

### 4.3 Agglomerat-Modell

Mikroskopische Aufnahmen (Abb. 4-12) und die Bestimmung von Partikelgrößenverteilungen mit einem COULTER-Counter (Abb. 4-13, Abb. 4-14) zeigten, daß es sich bei den untersuchten Sporensuspensionen nicht um frei suspendierte einzelne Sporen, sondern größtenteils um Sporenagglomerate handelt, die bei der Passage durch die "alte" Kapillarrohrstrecke aufgebrochen werden. Sporenagglomerate verhalten sich aber bezüglich der mikrobiologischen Keimzahlbestimmung anders als einzelne Sporen. Ein Agglomerat bildet so lange eine Kolonie und wird als eine einzige Spore gezählt, bis alle Sporen, die in ihm enthalten sind, abgetötet wurden. Sporenagglomerate können beim Experiment aufgebrochen werden, was dazu führt, daß die Zahl der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) steigt, obwohl die Zahl der lebenden Sporen in der Suspension abnimmt.

Es wurde versucht, die Sporenagglomerate zu desagglomerieren. Der Einsatz einer Zahnkranzdispergiermaschine ( $P_V = 3,5$  W/ml) und eines Ultraschallgerätes ( $P_V = 3,5$  W/ml) führten aber nicht zur Vereinzelung der Sporen, lediglich sehr große Agglomerate wurden aufgebrochen. Dispergierhilfsmittel wurden nicht benutzt, um einen Einfluß auf das Ausskeimverhalten der Sporen auszuschließen. Ein Vorversuch zeigte, daß auch mit Zusatz des Tensids LEO-10, das die Grenzflä

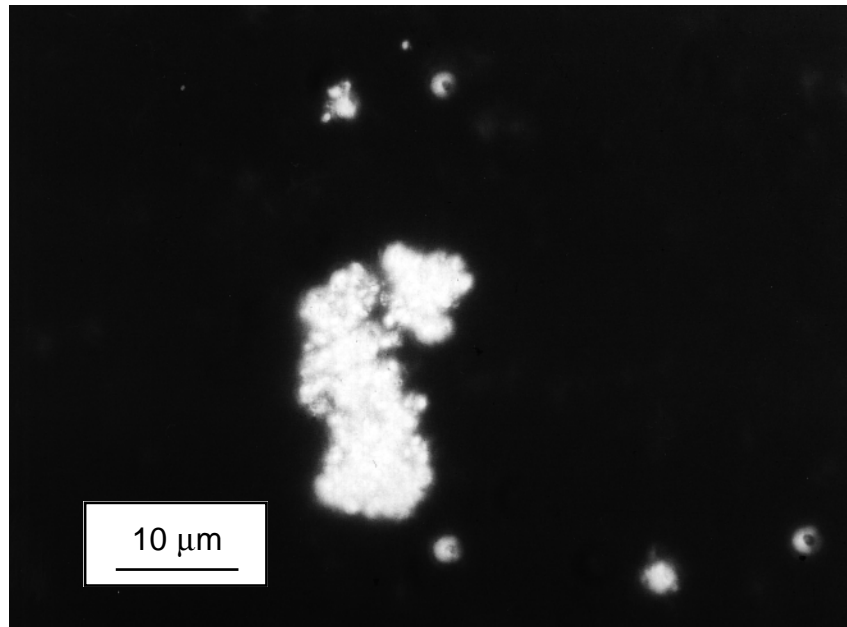


Abb. 4-12: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme eines Sporenagglomerates.

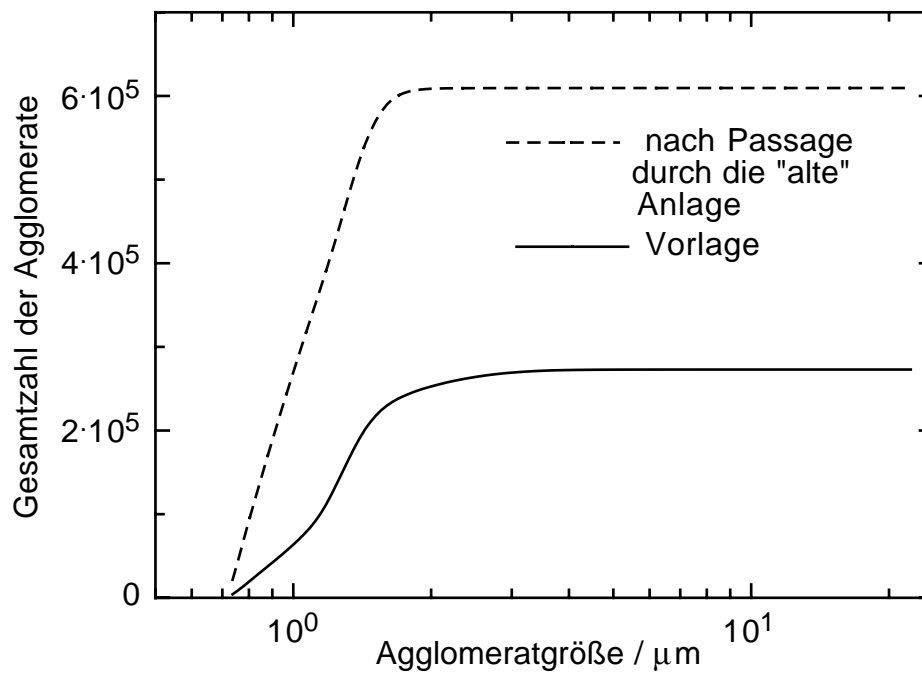


Abb. 4-13: Partikelgrößen-Anzahlsummenverteilung (nicht normiert, ausgezählt wurden jeweils 0,1 ml Suspension) der Sporensuspension vor und nach der Passage durch die "alte" Kapillarrohrstrecke.

chenspannung stark erniedrigt und frei werdende Grenzflächen schnell belegt, die kleinen Agglomerate nicht in der Zahnkranzdispergiermaschine und durch Ultraschall aufgebrochen werden können. Im Phasenkontrast-Mikroskop lassen sich freie Sporen ( $D=0,8 \mu\text{m}$ ) und Vierer- bzw. Fünferagglomerate ( $D\approx 1,3 \mu\text{m}$ ) nicht eindeutig unterscheiden. Die Vereinzelnung vegetativer Zellen ist aufgrund der größeren Abmessungen sehr viel einfacher.

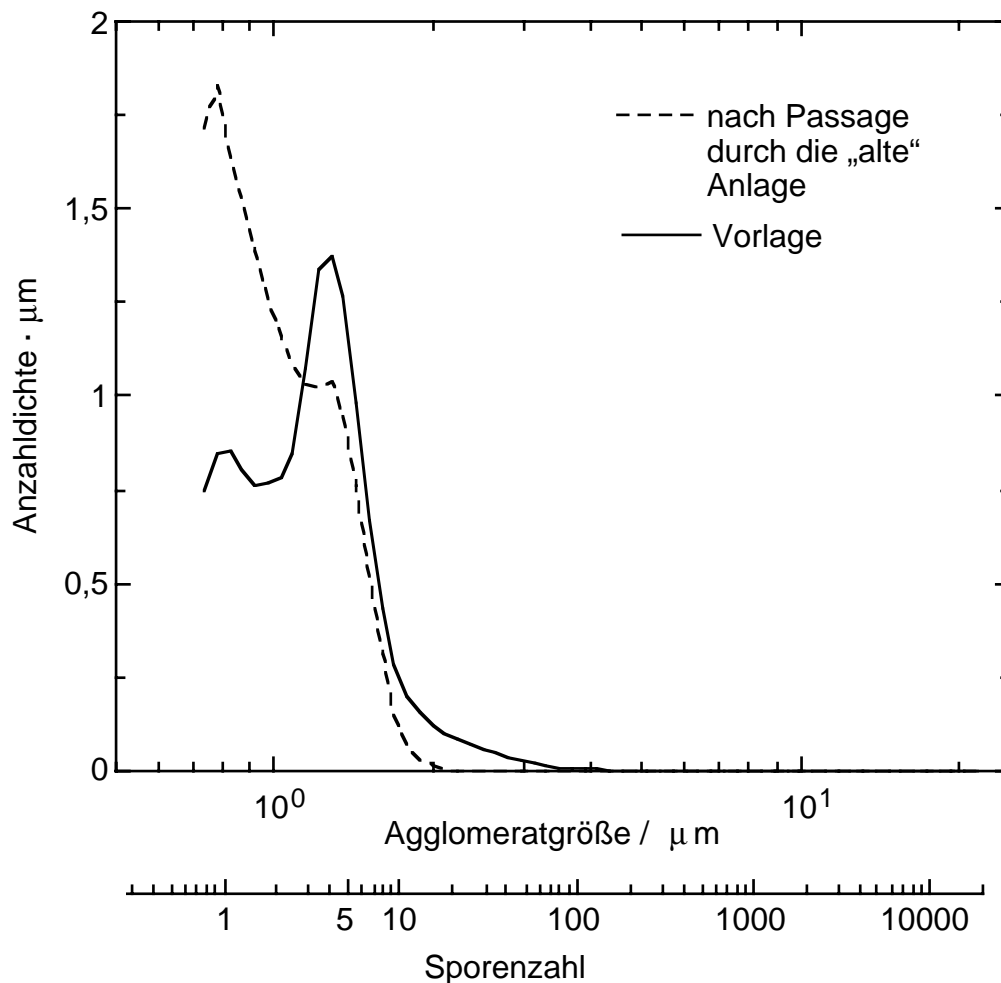


Abb. 4-14: Partikelgrößen-Anzahlverteilungsdichte der Sporensuspension vor und nach der Passage durch die "alte" Kapillarrohrstrecke. Der erste Peak ist bei der Größe einzelner freier Sporen, der zweite bei der Größe von Vierer- und Fünferagglomeraten.

Auf der Basis der folgenden Annahmen wird ein Modell vorgestellt, das diese Eigenschaften der Sporenagglomerate berücksichtigt. Eine Analogie stellt die Treffertheorie bei der Abtötung von Bakteriosporen durch Bestrahlung dar [85].

- Alle Sporen erfahren die gleiche Temperatur-Zeit-Beanspruchung.
- Die Abtötung der Sporen gehorcht einer Kinetik erster Ordnung mit der festgelegten Reaktionskonstante  $k_I$  bzw.  $k_I(t)$ .
- Die Abtötung einer Spore wird nicht durch die Größe des Agglomerates, in dem sich die Spore befindet, beeinflusst.
- Die Agglomeratgröße wird durch die Anzahl  $i$  der Sporen im Agglomerat repräsentiert.

Zunächst wird von quasiisothermen Bedingungen, d.h.  $k_I = \text{konst.}$  ausgegangen. Gemäß der Abtötungskinetik erster Ordnung beträgt die Überlebenswahrscheinlichkeit  $p$  einer einzelnen Spore

$$p(t) = e^{-k_I \cdot t} \quad (4-7)$$

Die Geschwindigkeitskonstante  $k_I$  kann auch über den D-Wert ausgedrückt werden.

$$k_I = \frac{\ln(10)}{D} \quad (4-8)$$

Die Abtötungswahrscheinlichkeit  $q$  errechnet sich zu

$$q(t) = 1 - p(t) = 1 - e^{-k_I \cdot t} \quad (4-9)$$

Betrachtet man nun ein Agglomerat aus  $i$  Sporen, so bildet es bei biologischen Nachweismethoden solange eine Kolonie, bis alle  $i$  darin enthaltenen Sporen abgetötet worden sind. Die Wahrscheinlichkeit dafür beträgt

$$p_i(t) = \frac{N}{N_0} = 1 - [q(t)]^i = 1 - (1 - e^{-k_I \cdot t})^i \quad (4-10)$$

Stellt man dies im Überlebensdiagramm dar, so erhält man, wie in Abbildung 4-15 dargestellt, Schulterkurven mit einer waagerechten Tangente für  $t \rightarrow 0$ . Für den Sonderfall einer Agglomeratgröße von einer Spore fällt das Modell mit der Abtötungskinetik erster Ordnung zusammen.

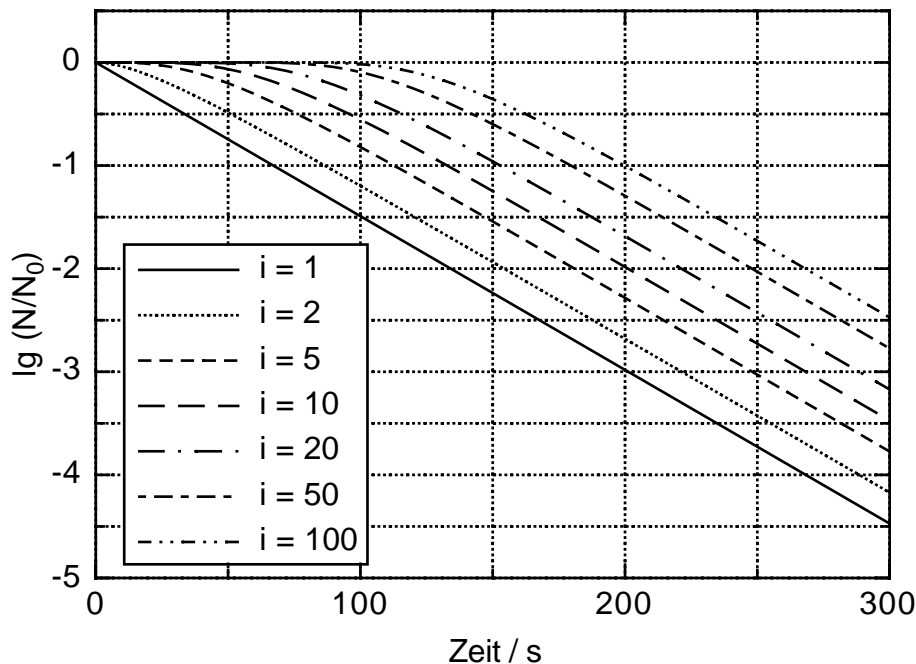


Abb. 4-15: Überlebenskurven für unterschiedlich große Sporenagglomerate,  $D = 67$  s,  $i =$  Zahl der Sporen in einem Agglomerat.

Die Kurven verlaufen für kurze Zeiten zunächst waagrecht und fallen dann steiler ab. Die Überlebensrate ist für ein Agglomerat von 100 Sporen für längere Zeiten als 150 s zwei Zehnerpotenzen größer als die der frei suspendierten Sporen. Für lange Zeiten scheinen die Kurven für Agglomerate parallel zu der Geraden für einzelne Sporen zu laufen. Eine Grenzwertbetrachtung zeigt, daß sich die Steigung asymptotisch der Steigung  $-k$  der Überlebenskurve frei suspendierter Sporen nähert. Die Herleitung ist im Anhang aufgeführt.

Wenn nicht von quasiisothermen Bedingungen ausgegangen werden kann, muß der zeitliche Temperaturverlauf berücksichtigt werden und der Term  $e^{-k_I t}$  in Formel (4-10) durch

$$e^{-\int_0^t k_I(t) dt} \quad (4-11)$$

$$\text{mit } k_I(t) = k_{I0} \cdot e^{-\frac{E_I}{R \cdot T(t)}} \quad (4-12)$$

bei Verwendung des Arrhenius-Konzepts bzw.

$$e^{-\int_0^t \frac{\ln(10) \cdot D(t)}{D(t)} dt} \quad (4-13)$$

$$\text{mit } D(t) = D_{\text{ref}} \cdot 10^{\frac{T_{\text{ref}} - T(t)}{z}} \quad (4-14)$$

bei Verwendung des z-Wert-Konzepts ersetzt werden. Eine Abschätzung zeigt jedoch, daß bei den hier verwendeten Anlagen selbst bei Agglomeraten mit  $i = 100$  Sporen mit quasiisothermen Bedingungen gerechnet werden darf.

Wenn eine Agglomeratgrößenverteilung vorliegt, muß der Verlauf der Überlebenswahrscheinlichkeit für jede Agglomeratgröße einzeln berechnet werden. Die Gesamtüberlebensrate erhält man dann durch Integration bzw. Summation über alle Größenklassen.

Gegeben sei die Agglomerat-Anzahlgrößenverteilungsdichte  $q_0(i)$  mit der Zahl  $i$  der Sporen in einem Agglomerat als Größenmerkmal. Wenn keine Agglomerate aufgebrochen oder neu gebildet werden, erhält man für die Überlebensrate:

$$n = \lg\left(\frac{N}{N_0}\right) = \lg\left(\int_0^{i_{\text{max}}} q_0(i) \cdot p_i(t) \cdot di\right) \quad (4-15)$$

Die Überlebenswahrscheinlichkeit  $p_i(t)$  eines Agglomerates mit  $i$  Sporen als Funktion der Zeit ergibt sich aus Gleichung (4-10).

Mit diesem Modell lassen sich alle Schulterkurven beschreiben, die bei  $t = 0$  eine waagerechte Tangente haben. Ein Verlauf mit positiven Überlebensraten, d.h. eine "Aktivierung", kann damit nicht beschrieben



werden. Auf der Basis dieses Abtötungsmodells kann dennoch die von einigen Autoren [54, 53, 86] postulierte Aktivierung, die sich in einer Zunahme der Zahl der keimbildenden Einheiten (KBE) äußert, erklärt werden, wie folgende Überlegung zeigt:

Bei einem Abtötungsversuch kann es zum Aufbrechen und/oder zur Neubildung der Agglomerate kommen. Es werden Koloniebildner frei, solange die aus großen Agglomeraten entstandenen kleineren Agglomerate oder freie einzelne Sporen noch eine Kolonie bilden können, d.h. mindestens eine lebensfähige Spore enthalten. Die Wahrscheinlichkeit dafür hängt nur von der thermischen Vorgeschichte und der Größe der Bruchstücke ab, nicht von der Größe der Agglomerate, aus denen die Bruchstücke gebildet wurden.

Verändert sich durch Aufbruch und/oder Neubildung die Agglomeratgrößenverteilung, muß die Veränderung der Gesamtzahl aller Agglomerate (auch derer, die keine Kolonie mehr bilden können) mit berücksichtigt werden. Hier wird der Faktor  $F_A$  eingeführt:

$$F_A(t) = \frac{N_{Ages}(t)}{N_{Ages}(t=0)} \quad (4-16)$$

mit  $N_{Ages}$  = Gesamtzahl der Agglomerate.

Für die Überlebensrate ergibt sich:

$$n = \lg\left(\frac{N}{N_0}\right) = \lg\left(\int_0^{i_{max}} F_A(t) \cdot q_0(i, t) \cdot p_i(t) \cdot di\right) \quad (4-17)$$

Zur Verringerung des Rechenaufwandes kann die Agglomeratanzahlgrößenverteilung diskretisiert werden. Die Zahl der Agglomerate mit  $i$  Sporen bezogen auf die Gesamtzahl der Agglomerate zum Zeitpunkt  $t = 0$  wird durch die Funktion  $F_{Ai}$  beschrieben, die aus den experimentell bestimmten Partikelgrößenverteilungen berechnet wird.

$$F_{Ai}(t) = \frac{N_i(t)}{N_{Ages}(t=0)} \quad (4-18)$$

$N_i$  = Zahl der Agglomerate, die aus  $i$  Sporen bestehen

Die Überlebensrate läßt sich dann gemäß

$$n = \lg\left(\frac{N}{N_0}\right) = \lg\left(\sum_{i=1}^{i_{\max}} F_{Ai}(t) \left[1 - (1 - e^{-k_I \cdot t})^i\right]\right) \quad (4-19)$$

berechnen.

Die Abb. 4-16, 4-17 und 4-18 zeigen nach dem Agglomerat-Modell berechnete Überlebenskurven von *Bacillus stearothermophilus* Sporen in physiologischer Kochsalzlösung. Bei Berücksichtigung der experimentell bestimmten Veränderung der Agglomeratgrößenverteilung nach der Passage durch die "alte" Anlage findet sich auch die "Aktivierung" in der von HAAS [3] gemessenen Größenordnung ( $\lg(N/N_0) \leq 0,3$ ) wieder.

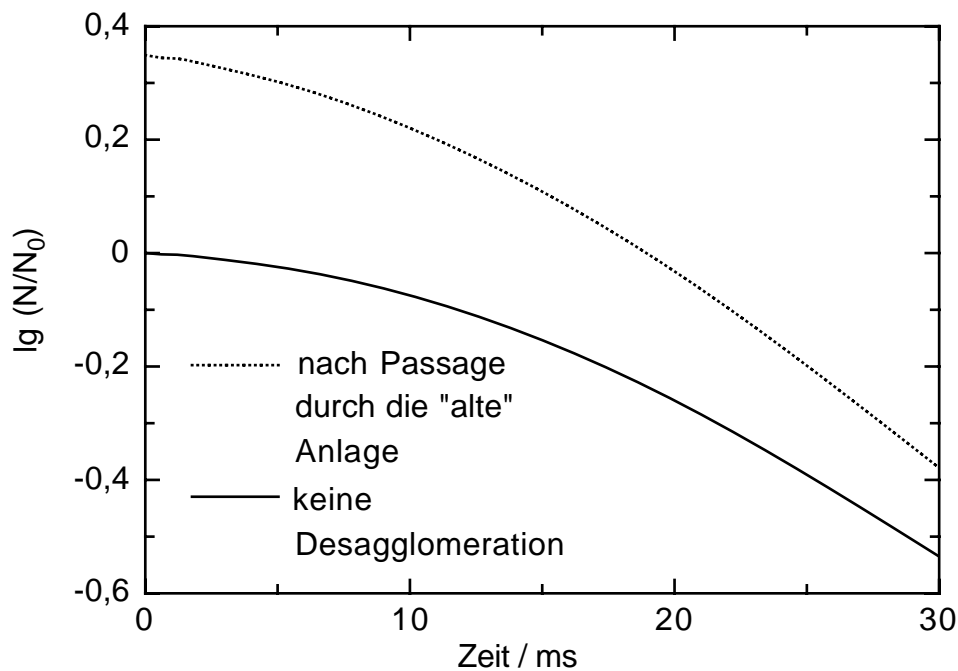


Abb. 4-16: Nach dem Agglomerat-Modell berechnete Abtötung von *Bacillus stearothermophilus* Sporen in physiologischer Kochsalzlösung. Ausgangsverteilungen siehe Abb. 4-13 und Abb. 4-14.  $k_I = 100/s$ , das entspricht ca. einer Behandlungstemperatur von  $150\text{ }^\circ\text{C}$ .

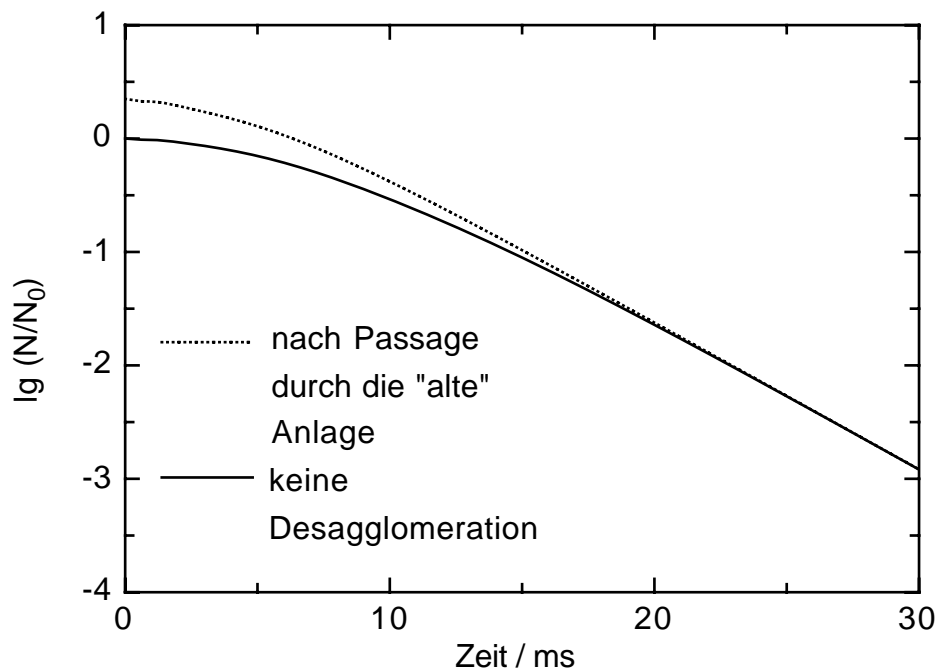


Abb. 4-17: Nach dem Agglomerat-Modell berechnete Abtötung von *Bacillus stearothermophilus* Sporen in physiologischer Kochsalzlösung. Ausgangsverteilungen siehe Abb. 4-13 und Abb. 4-14.  $k_I = 300/s$ , das entspricht ca. einer Behandlungstemperatur von 155 °C.

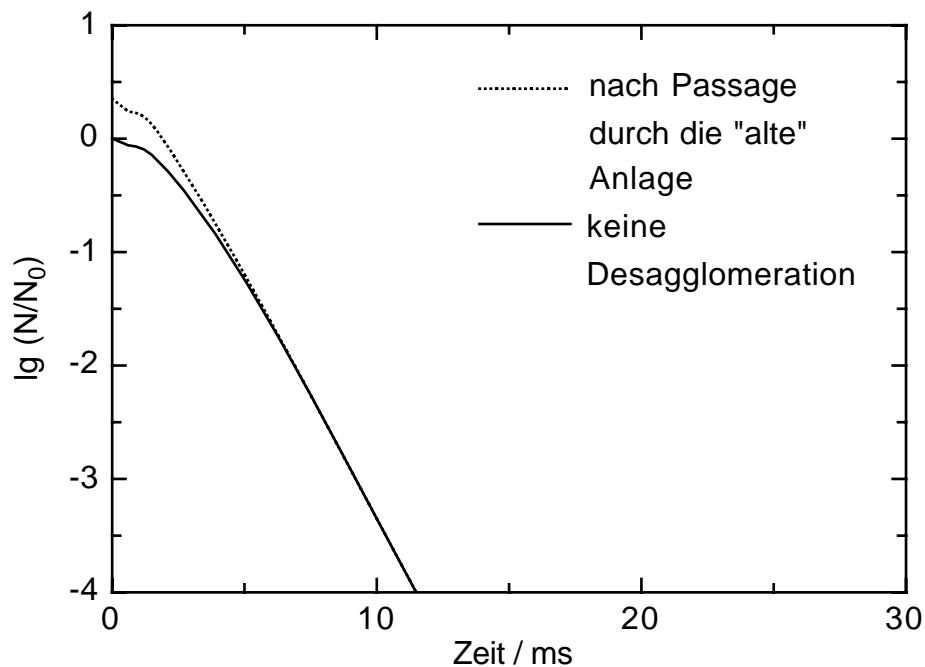


Abb. 4-18: Nach dem Agglomerat-Modell berechnete Abtötung von *Bacillus stearothermophilus* Sporen in physiologischer Kochsalzlösung. Ausgangsverteilungen siehe Abb. 4-13 und Abb. 4-14.  $k_I = 1000/s$ , das entspricht ca. einer Behandlungstemperatur von 165 °C.

Für einen Vergleich von gemessener Inaktivierung und Berechnung wurden die Werte für die Inaktivierungskonstanten  $k_I$  aus den scheinbaren D-Werten  $D_{App}$ , die den linearen Teil der Überlebenskurven bei langen Zeiten beschreiben, berechnet. Die Zahlenwerte wurden aus der Arrhenius-Auftragung Abb. 4-11 abgelesen.

Das Agglomerat-Modell beschreibt die Abtötung von Bakteriosporen in physiologischer Kochsalzlösung gut (Abb. 4-19 und 4-20). Auch der Bereich kurzer Zeiten wird zufriedenstellend wiedergegeben. Das Modell verwendet nur die gemessene Partikelgrößenverteilung der Sporensuspension sowie die Inaktivierungskonstante  $k_I$ , deren Temperaturabhängigkeit nach den bisherigen Ergebnissen mit dem Arrhenius-Ansatz beschreibbar ist.

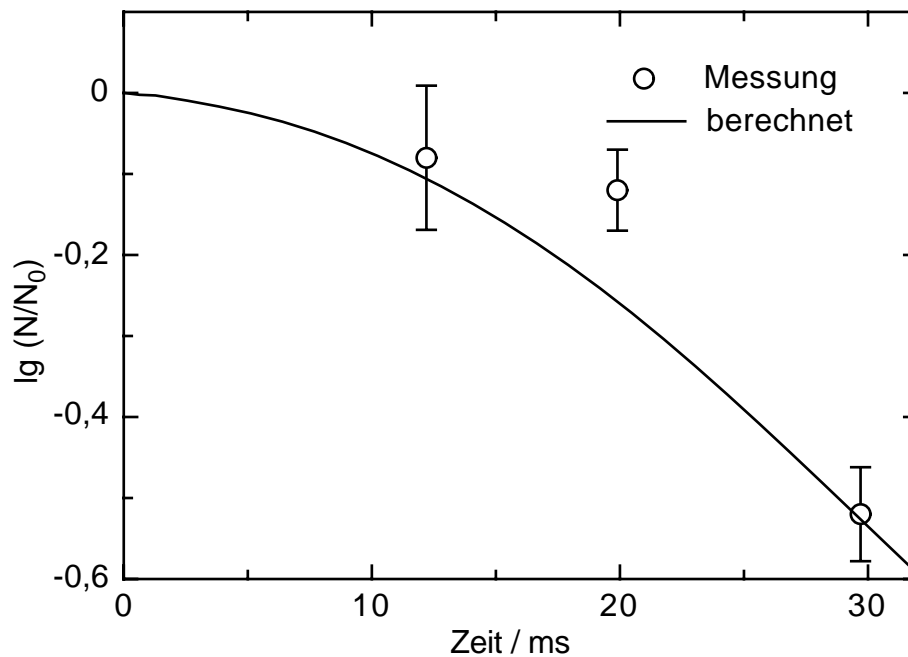


Abb. 4-19: Vergleich der nach dem Agglomerat-Modell berechneten Überlebenskurve mit den mit der neuen Anlage experimentell bestimmten Werten (mit Standardabweichung) für *Bacillus stearothermophilus* Sporen in physiologischer Kochsalzlösung bei 150 °C,  $k_I = 100 / s$ .

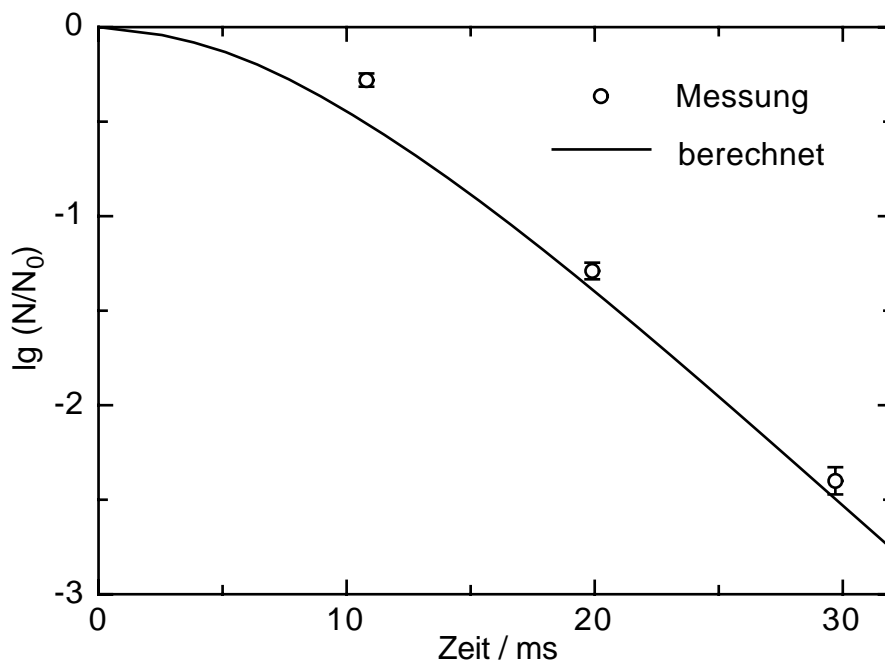


Abb. 4-20: Vergleich der nach dem Agglomerat-Modell berechneten Überlebenskurve mit den mit der neuen Anlage experimentell bestimmten Werten (mit Standardabweichung) für *Bacillus stearothermophilus* Sporen in physiologischer Kochsalzlösung bei 155 °C,  $k_I = 270 / s$ .

Die hier gemessenen Schulterkurven stellen ein Artefakt dar, das durch die vorhandenen Sporenagglomerate verursacht wird. Wird vor dem Versuch nicht hinreichend desagglomeriert, kann es in der Kapillarrohrstrecke zum Aufbrechen von Agglomeraten kommen. Dies äußert sich dann in einer "Aktivierung". Es ist nicht auszuschließen, daß auch die in der Literatur beschriebene Aktivierung auf Desagglomeration während des Versuchs zurückzuführen ist.

## 4.4 Pasteurisieren oberflächlich verkeimter Lebensmittel am Beispiel von schwarzem Pfeffer

### 4.4.1 Pasteurisationsversuche mit Pfefferkörnern

Abtötungsversuche mit unbehandeltem Pfeffer zeigen, daß es keinen signifikanten Einfluß des verwendeten Erhitzungsgases auf das Abtötungsergebnis gibt. Die Unterschiede der erzielten Abtötungsraten liegen im Bereich der Standardabweichungen der Versuchsergebnisse. Eine Erklärung für die Abweichungen ist der unterschiedliche Wärmeübergang an das Korn in Abhängigkeit des verwendeten Gases. Der erwartete Einfluß insbesondere des Luftsauerstoffs konnte nicht gefunden werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die nachfolgenden Versuche mit technischem Stickstoff (99 % Reinheit) durchgeführt.

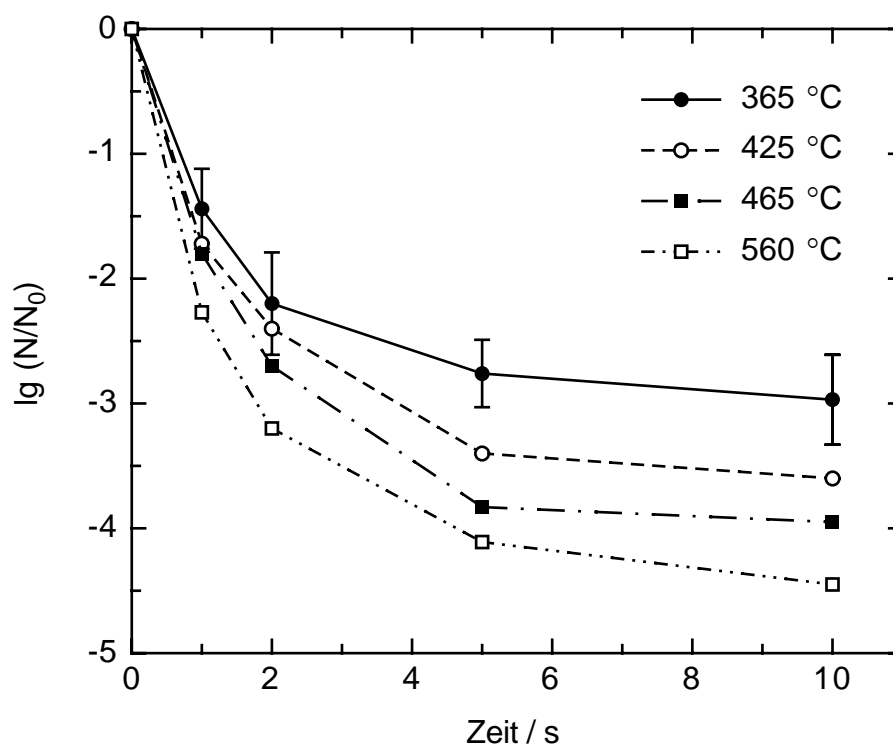


Abb. 4-21: Einfluß der Gastemperatur auf den Verlauf der Abtötung der Mischpopulation auf schwarzem Pfeffer. Der Kaltgasvolumenstrom beträgt jeweils 3 m<sup>3</sup>/h.

In Abbildung 4-21 ist der Verlauf der Abtötung der auf dem verwendeten Pfeffer vorhandenen Mischpopulation als Funktion der Behand-

lungszeit zu sehen. Kurvenparameter ist die Gastemperatur. Der Kaltgasvolumenstrom beträgt  $3 \text{ m}^3/\text{h}$ . Zu erkennen ist, daß nach anfänglich schneller Abtötung die Kurven zu längeren Behandlungszeiten flacher verlaufen. Das ist typisch für Mischpopulationen, da zuerst die wenig hitzeresistenten Keime abgetötet werden. Für längere Zeiten bestimmen die hitzeresistentesten Keime die Steigung der Abtötungskurve. Man würde aber erwarten, daß aufgrund der mit der Behandlungszeit steigenden Oberflächentemperatur die Abtötungsgeschwindigkeit zu langen Behandlungszeiten wieder zunimmt. Exemplarisch sind für eine Gastemperatur von  $365 \text{ }^\circ\text{C}$  die Standardabweichungen der Meßwerte eingezeichnet. Durch eine Behandlung bei  $560 \text{ }^\circ\text{C}$  für 2 Sekunden kann das Kriterium "keimarm" erfüllt werden, d.h. die Keimzahl unter den Wert von  $10^4 \text{ KBE/g}$  gesenkt werden.

Um den Einfluß der Mischpopulation auf den Verlauf der Abtötungskurven auszuschließen, wurden Versuche mit zuvor sterilisiertem Pfeffer, der anschließend monoseptisch kontaminiert wurde, durchgeführt. Der Pfeffer wurde durch Behandlung mit ionisierenden Strahlen sterilisiert. Danach wurden die Körner durch zweimaliges Tauchen in hochkonzentrierte Sporensuspension mit *Bacillus subtilis* (MERCK, Nr. 10649) oder *Bacillus stearothermophilus* (MERCK, Nr. 11499) rekontaminiert.

Um die kinetischen Parameter der Sporenabtötung bestimmen zu können, muß der zeitliche Verlauf der Oberflächentemperatur bekannt sein. Abb. 4-22 zeigt den berechneten Verlauf der Oberflächentemperatur als Funktion der Behandlungszeit bei einer Gastemperatur von  $560 \text{ }^\circ\text{C}$  und einem Kaltgasvolumenstrom von  $3 \text{ m}^3/\text{h}$ . Die Rechnung wurde unter der Annahme durchgeführt, daß das Pfefferkorn eine homogene Kugel ist. Es wurden die in Kap. 2.2.4 aufgelisteten Stoffwerte verwendet. Die Berechnung wurde nach dem expliziten Differenzenverfahren [87] durchgeführt, der Rechenweg ist im Anhang aufgelistet. Der Einfluß des Wärmeübergangs durch Strahlung wurde vernachlässigt. Daß dies zulässig ist, zeigt eine Abschätzung, die ebenfalls im Anhang dargestellt ist. Die Abbildungen 4-23 und 4-24 zeigen das Fortschreiten des Temperaturprofils in das Innere des Kornes. In den Abbildungen 4-25 und 4-26 ist die Abkühlung des Kornes nach dem Eintauchen in das Abkühlmedium dargestellt.

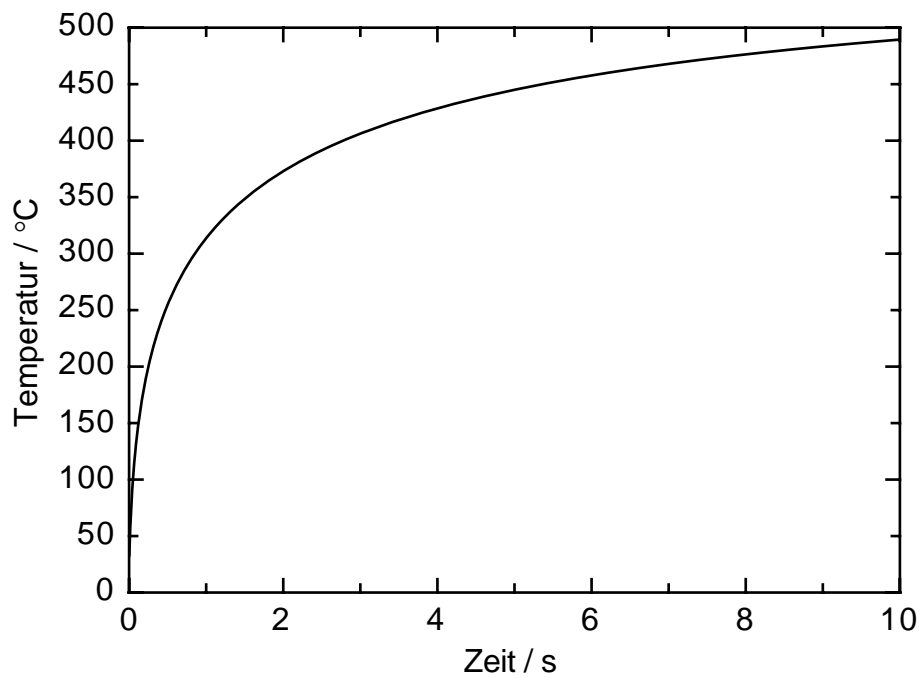


Abb. 4-22: Berechnete Temperatur der Pfefferkornoberfläche als Funktion der Behandlungszeit bei einer Stickstofftemperatur von 560 °C und einem Kaltgasvolumenstrom von 3 m<sup>3</sup>/h.

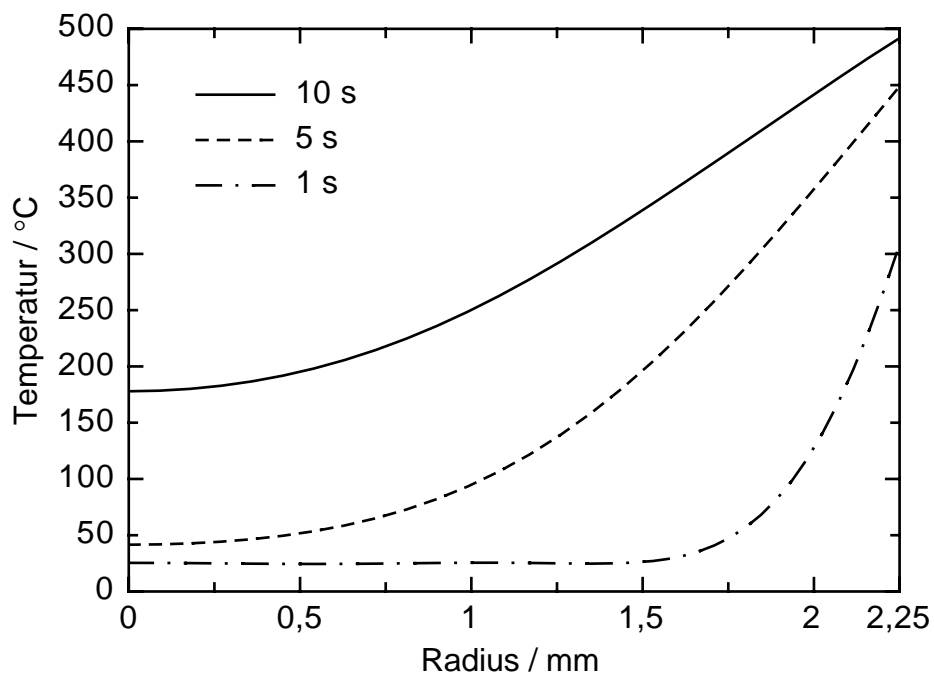


Abb 4-23: Berechnetes Temperaturprofil im Pfefferkorn mit dem Radius  $R = 2,25$  mm bei einer Anfangstemperatur von 25 °C, Kurvenparameter ist die Aufheizzeit.



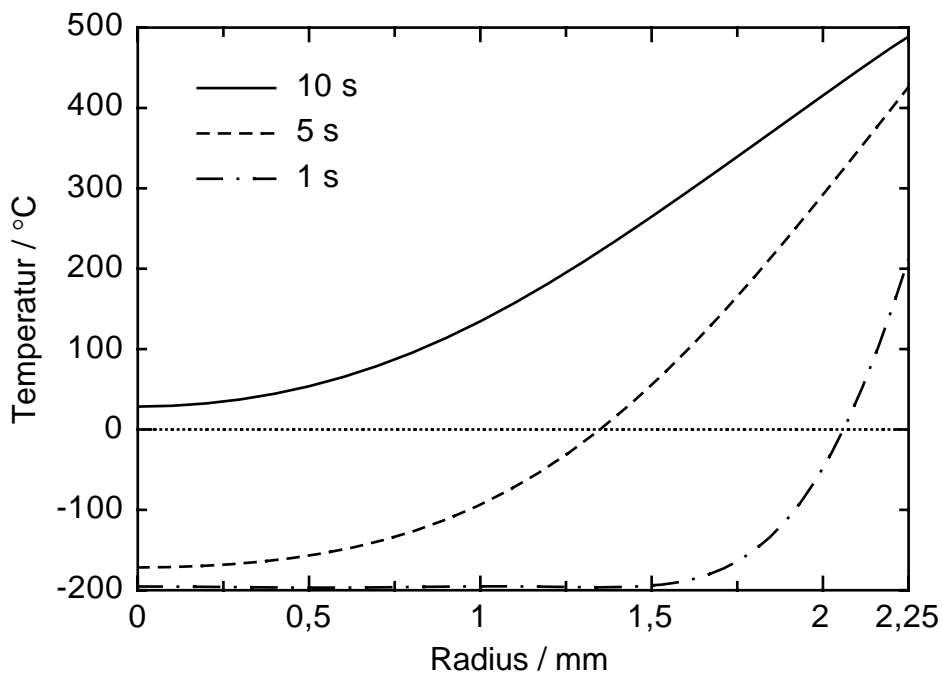


Abb 4-24: Berechnetes Temperaturprofil im Pfefferkorn mit dem Radius  $R = 2,25$  mm bei einer Anfangstemperatur von  $-196$  °C, Kurvenparameter ist die Aufheizzeit.

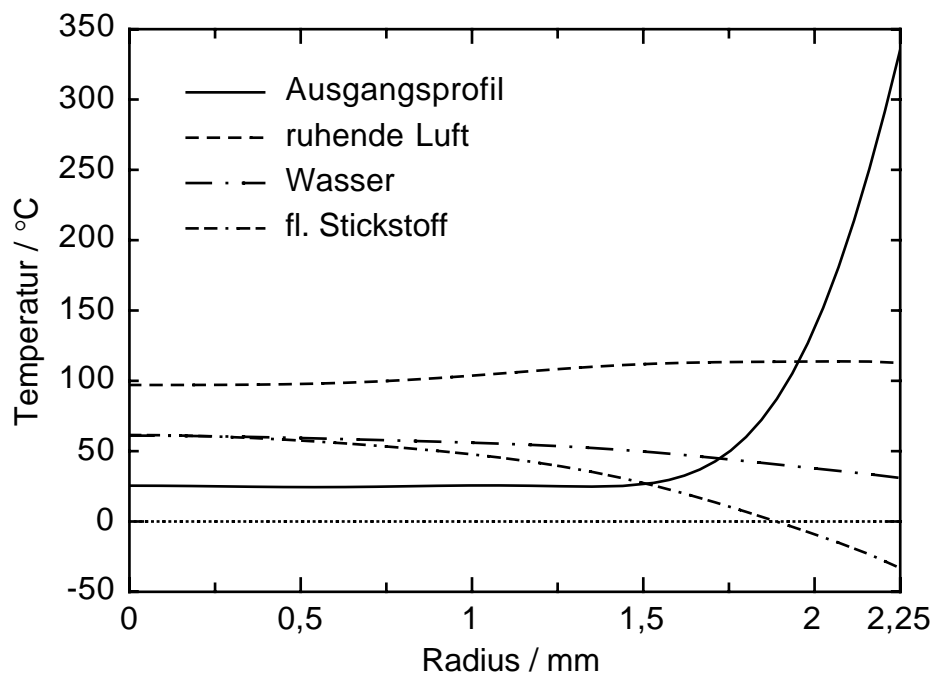


Abb 4-25: Berechnetes Temperaturprofil im Pfefferkorn mit dem Radius  $R = 2,25$  mm nach 10 Sekunden Abkühlung in verschiedenen Medien ausgehend vom eingezeichneten Ausgangsprofil.

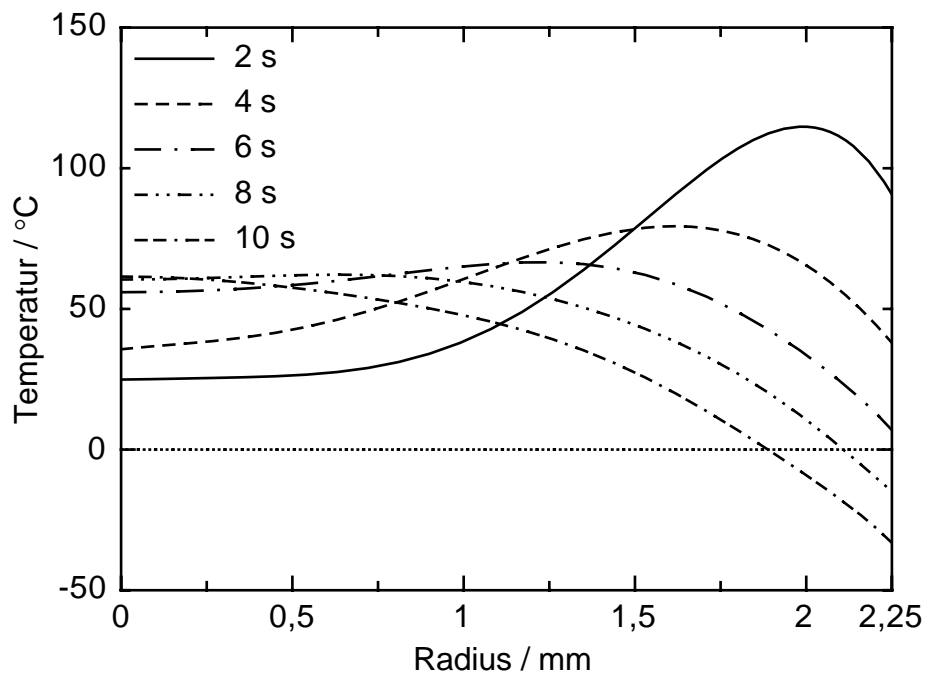


Abb 4-26: Berechnetes Temperaturprofil im Pfefferkorn mit dem Radius  $R = 2,25$  mm nach Abkühlung in flüssigem Stickstoff, Kurvenparameter ist die Kühlzeit. Es wurde das Ausgangsprofil aus Abb. 4-25 verwendet.

Man erkennt, daß der Einsatz von flüssigem Stickstoff sinnvoll ist, da sich das Korninnere dann wesentlich geringer erwärmt. Flüssiger Stickstoff wird bereits in der Gewürzindustrie zur Kühlung der Gewürze vor der Vermahlung eingesetzt.

Der Verlauf der Oberflächentemperatur wurde mit einer empirischen Gleichung angepaßt:

$$T(t)/^{\circ}\text{C} = 560 - C_1 \cdot \exp\left\{-\left(t/s - t_0\right)^b\right\} \quad (4-20)$$

mit:  $C_1 = 673,23$   
 $t_0 = -1,56 \cdot 10^{-2}$   
 $b = 0,3532$

Die Parameter haben keine physikalische Bedeutung. Die Funktion dient nur dazu, für die weitere Rechnung eine stetige Funktion  $T(t)$  benutzen zu können. Unter der Annahme, daß auch auf Pfeffer-

körnern die Abtötung einer Kinetik 1. Ordnung folgt, kann die Inaktivierung der Sporen durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$\lg \frac{N}{N_0} = -\frac{1}{D_{\text{ref}}} \cdot \int_0^t 10^{\frac{T(t)-T_{\text{ref}}}{z}} dt \quad (4-21)$$

Diese Formel enthält zwei unbekannte Größen: die kinetischen Parameter  $z$  und  $D_{\text{ref}} = D(T_{\text{ref}})$ . Die Bezugstemperatur kann beliebig gewählt werden. Durch Quotientenbildung kann man  $D_{\text{ref}}$  eliminieren. Man erhält:

$$\frac{n_2'}{n_1'} = \frac{\int_0^{5s} 10^{\frac{T(t)-T_{\text{ref}}}{z}} dt}{\int_0^{2s} 10^{\frac{T(t)-T_{\text{ref}}}{z}} dt} \quad (4-22)$$

mit:  $n_2' = \lg \frac{N}{N_0}$  für  $t = 5 \text{ s}$

$n_1' = \lg \frac{N}{N_0}$  für  $t = 2 \text{ s}$

Mit dem Computer-Algebra-System MAPLE kann nun für verschiedene  $z$ -Werte das Verhältnis der Überlebensraten nach 2 Sekunden und 5 Sekunden berechnet werden. Mit steigendem  $z$ -Wert sinkt dieses Verhältnis. Die Ergebnisse der Rechnung sind in Tabelle 4-4 dargestellt.

Tabelle 4-5 zeigt die experimentell ermittelten Überlebensraten für *Bacillus subtilis* und *Bacillus stearothermophilus* Sporen.

Es ergibt sich ein kaum höherer Inaktivierungseffekt bei Erhöhung der Pasteurisationszeit von 2 s auf 5 s bei *Bacillus subtilis*. Bei *Bacillus stearothermophilus* erhöht sich die Abtötungsrate nicht. Es ist möglich, daß dies durch die Berg-und-Tal-Struktur der Oberfläche der

Pfefferkörner verursacht wird. Diese Struktur könnte dazu führen, daß die Oberfläche in den Tälern nicht entsprechend erhitzt wird, und die dort vorhandenen Sporen nur in geringem Umfang abgetötet werden. Es wurden deshalb Abtötungsversuche mit Glaskugeln als Modellpartikeln durchgeführt.

Tabelle 4-4: Verhältnis der Überlebensraten nach 5 s und 2 s in Abhängigkeit vom z-Wert. Die Werte wurden mit dem Temperaturverlauf aus Abb. 4-22 berechnet.

z-Wert in °C	$n_2'/n_1'$
10	$4,62 \cdot 10^7$
20	$1,14 \cdot 10^4$
30	$1,41 \cdot 10^3$
50	76
100	14.4

Tabelle 4-5: Experimentell bestimmte Überlebensraten von *Bacillus subtilis* und *Bacillus stearothermophilus* Sporen auf Pfefferkörnern bei einer Gastemperatur von 560 °C und einem Kaltgasvolumenstrom von 3 m<sup>3</sup>/h.

Überlebensrate	<i>Bacillus subtilis</i> Sporen	<i>Bacillus stearothermo- philus</i> Sporen
$n_1'$ bei t = 2 s	-1,42	-1,24
$n_2'$ bei t = 5 s	-1,48	-1,24

#### 4.4.2 Pasteurisationsversuche mit kontaminierten Glaskugeln und Einfluß einer Befeuchtung der Oberfläche vor dem Erhitzen

Bei Glaskugeln, die mit *Bacillus subtilis* Sporen oder *Bacillus stearothermophilus* Sporen kontaminiert wurden, zeigte sich der gleiche Abtötungsverlauf wie bei Pfefferkörnern; zu langen Behandlungszeiten verläuft die Abtötung langsamer (Abb. 4-27).

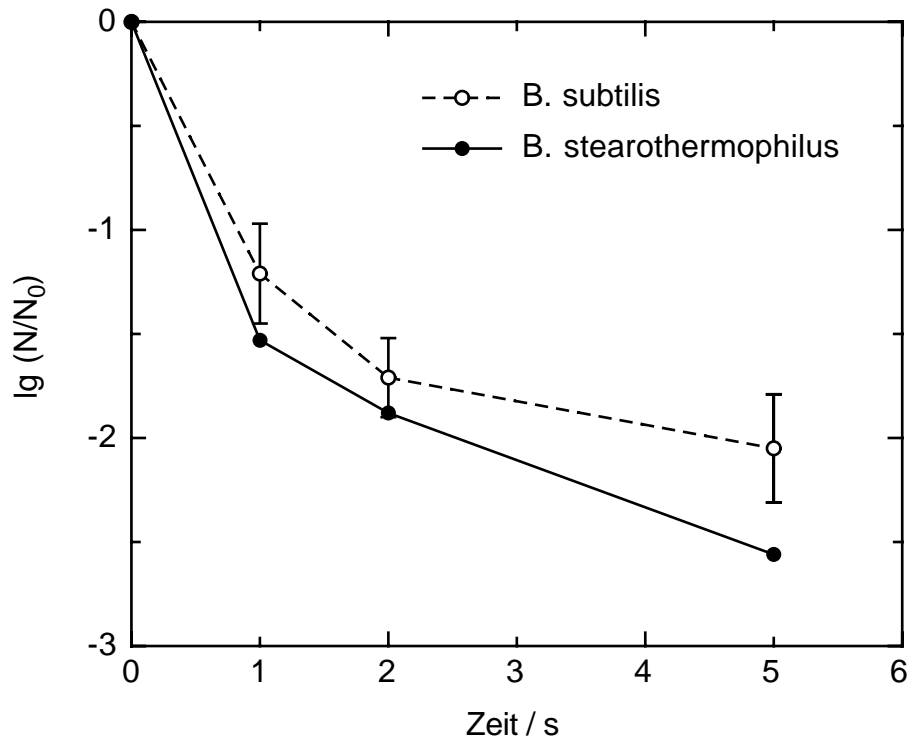


Abb. 4-27: Abtötungsverlauf von *Bacillus stearothermophilus* Sporen und *Bacillus subtilis* Sporen auf Glaskugeln. Der Kaltgasvolumenstrom beträgt jeweils 3 m<sup>3</sup>/h, die Gastemperatur 560 °C.

Die Abtötungsgeschwindigkeit hängt stark von der Wasseraktivität ab. PFEIFFER [26] fand eine Steigerung der Hitzeresistenz um den Faktor 10<sup>8</sup> beim Absenken der Wasseraktivität von 1 auf 0,2 für Sporen von *Bacillus subtilis* var. *niger*. Befeuchten der Glaskugeln mit einem Sprühnebel unmittelbar vor der Erhitzung verbesserte das Abtötungsergebnis. Es ist aber weiterhin das Flacherwerden der Kurven zu langen Behandlungszeiten zu beobachten (Abb. 4-28). Bei Pfeffer verbessert sich die Abtötung durch Befeuchten ebenfalls, der Kurvenverlauf bleibt jedoch ebenfalls gleich (Abb. 4-29).

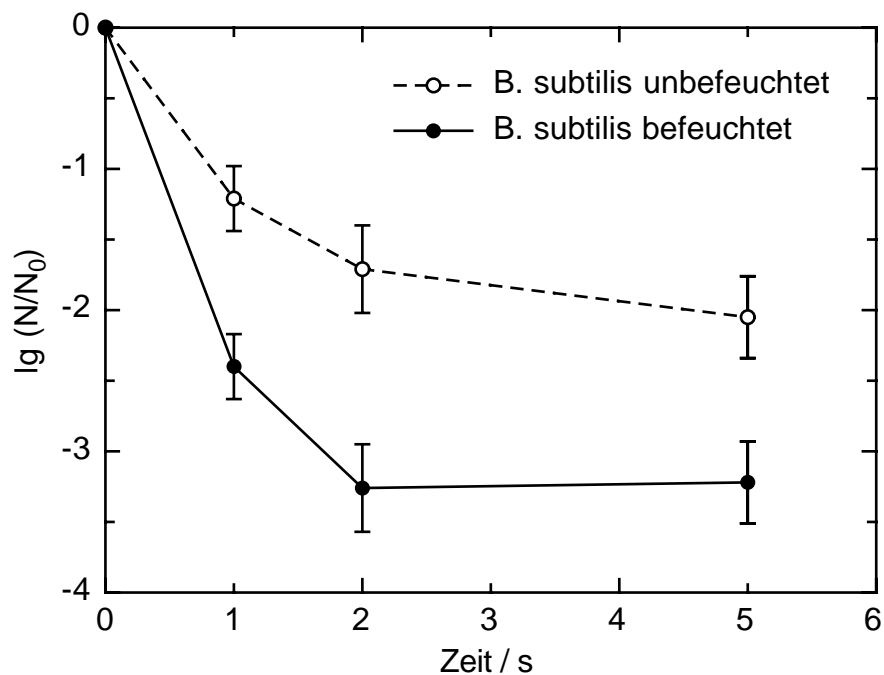


Abb. 4-28: Abtötungsverlauf von *Bacillus subtilis* Sporen auf Glaskugeln mit und ohne vorherige Befeuchtung durch einen Sprühnebel. Der Kaltgasvolumenstrom beträgt jeweils  $3 \text{ m}^3/\text{h}$ , die Gastemperatur  $560 \text{ }^\circ\text{C}$ .

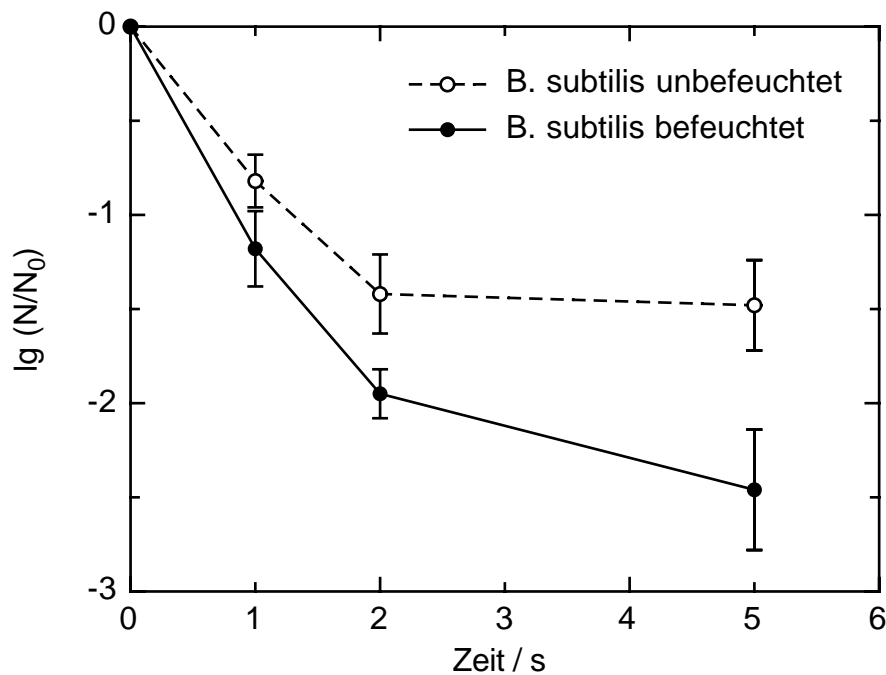


Abb. 4-29: Abtötungsverlauf von *Bacillus subtilis* Sporen auf Pfefferkörnern mit und ohne vorherige Befeuchtung durch einen Sprühnebel. Der Kaltgasvolumenstrom beträgt jeweils  $3 \text{ m}^3/\text{h}$ , die Gastemperatur  $560 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Berechnungen, die die von PFEIFFER [26] gefundene Abhängigkeit der Hitzeresistenz von der Wasseraktivität berücksichtigen, können den Verlauf nicht erklären. Es kommt während der Trocknung zur Ausbildung eines kurzen Plateaus. Wenn die Trocknung abgeschlossen ist, steigt die Abtötungsgeschwindigkeit aufgrund der steigenden Temperatur wieder stark an (Abb. A-2). Der Trocknungsverlauf der Sporen wurde grob abgeschätzt. Eine weitere Erklärung für den beobachteten Verlauf der Abtötung wäre der Übergang des Sporenprotoplasmas vom flüssigen Zustand in den Glaszustand. Aufgrund der schnellen Trocknung ist es möglich, das Protoplasma in den Glaszustand zu überführen. Bei hohen Temperaturen geht der Glaszustand bei Anwesenheit von Wasser wieder verloren. Bei einer Wasseraktivität nahe 0 kann der Glaszustand jedoch auch bei hohen Temperaturen aufrecht erhalten werden (siehe Abb. 2-4) [35]. Wenn die beobachtete Verringerung der Abtötungsgeschwindigkeit durch den Übergang des Protoplasmas in den Glaszustand verursacht wird, dann muß dieser Effekt reversibel sein. Werden die Sporen nach der Hitzebehandlung wieder mit einer Umgebung, in der eine hohe Wasseraktivität herrscht, ins Gleichgewicht gebracht, so geht das eventuell im Glaszustand vorliegende Protoplasma wieder in seinen "normalen" Zustand über. Die Abtötungsgeschwindigkeit sollte dann wieder so groß sein wie bei der erstmaligen Behandlung, d.h. in den ersten 2 Sekunden sollte eine merkliche Abtötung erreichbar sein. Bei langer Behandlungszeit sollte die Abtötungsgeschwindigkeit dann wieder abnehmen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden kontaminierte Glaskugeln und Pfefferkörner 2 Sekunden bei einer Gastemperatur von 560 °C erhitzt. Anschließend wurden sie für 3 Tage bei 20 °C in einer Atmosphäre mit einer relativen Feuchte von ca. 80 % gelagert. Bei diesen Bedingungen können die Sporen nicht auskeimen [11]. Die Keimzahl nach der Zwischenkonditionierung stimmte im Rahmen der Nachweisgenauigkeit mit der Keimzahl davor überein. Die Konditionierungszeit von 3 Tagen war versuchstechnisch bedingt. Es wird erwartet, daß auch eine kurze Befeuchtung (einige Sekunden) den gleichen Effekt hat. Nach dieser Lagerung wurden die Kugeln/Körner nochmals erhitzt. Abb. 4-30 zeigt den Verlauf der Abtötung nach der Zwischenkonditionierung.

Es ist erkennbar, daß die anfänglich erreichte Abtötungsgeschwindigkeit in der gleichen Größenordnung liegt, wie bei der erstmaligen Behandlung. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß das Protoplasma der Sporen bei der Behandlung in den Glaszustand überführt wird. Im Glaszustand erfolgt die Abtötung sehr langsam; das macht sich als Abflachen der Abtötungskurve bemerkbar. Werden die Sporen dann durch eine Zwischenkonditionierung wieder in ihren "normalen" Zustand gebracht, kann die Abtötung wieder mit der ursprünglichen Anfangsgeschwindigkeit erfolgen. Das Flacherwerden des Abtötungsverlaufes nach der Zwischenkonditionierung kann nicht mehr sicher nachgewiesen werden, da hier die Nachweisgrenze der Keimzahlbestimmungsverfahren erreicht wird.

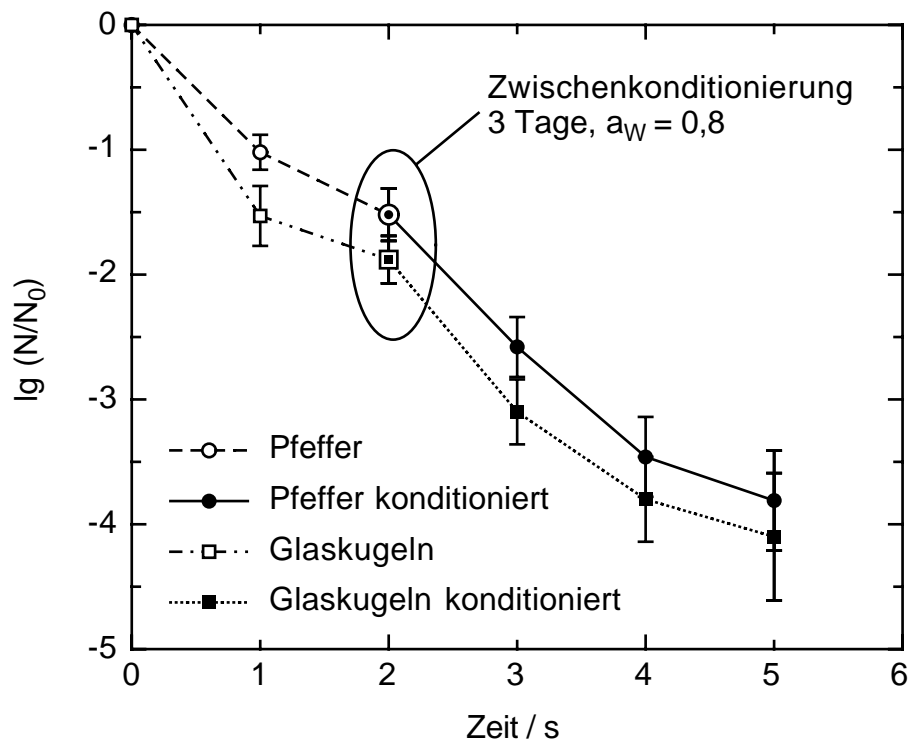


Abb. 4-30: Abtötungsverlauf von *Bacillus stearothermophilus* Sporen auf Glaskugeln und Pfefferkörnern nach einer Vorerhitzung und anschließender Zwischenkonditionierung. Der Kaltgasvolumenstrom beträgt jeweils 3 m<sup>3</sup>/h, die Gastemperatur 560 °C.



### 4.4.3 Veränderungen des Pfeffers durch die Heißgasbehandlung

#### 4.4.3.1 Optische Veränderungen

Das Aussehen der Pfefferkörner ändert sich im Laufe der Behandlung. Durch die Bildung von Wasserdampf wird die Fruchtschale weich und bläht sich auf. Dieser Zustand bleibt nach dem Abkühlen erhalten. Bei Abkühlung in ruhender Luft sind fast alle Runzeln verschwunden, eine kugelig aufgetriebene, spröde und schwärzlich verfärbte Fruchtschale bleibt zurück, die bei leichter Berührung abplatzt. Bei Abkühlung in flüssigem Stickstoff bleibt die charakteristische Morphologie des Pfefferkornes erhalten. Die Runzeln werden lediglich etwas weicher, die Farbe der Körner verändert sich nur gering. Dies ist in Abbildung 4-31 zu sehen.



Abb. 4-31: Vergleich von in ruhender Luft und in flüssigem Stickstoff abgekühlten Pfeffer (links: unbehandelte Pfeffer; Mitte: in ruhender Luft abgekühlter Pfeffer; rechts: in flüssigem Stickstoff abgekühlter Pfeffer). Die Behandlungszeit beträgt 2 s, das verwendete Gas ist Stickstoff bei einer Temperatur von 560 °C und einem Kaltgasvolumenstrom von 3 m<sup>3</sup>/h.

Die Pfefferkörner verändern bei der Behandlung auch die Farbe. Es tritt eine Farbänderung von dunkelbraun nach schwarz auf. Diese Farbänderung wurde für das gemahlene Produkt (vgl. Kap. 3.4.4) mit einem Farbmeßgerät (CONTRON) erfaßt. Als charakteristisch und mit

dem Eindruck des menschlichen Auges korrelierend erwies sich die visuelle Farbsättigung im Farbsystem Cyan-Magenta-Yellow-Black (CMYK). Dieses Farbsystem beschreibt die zu verwendende Farbmenge beim Vierfarbdruck. In Abbildung 4-32 ist der Verlauf der visuellen Farbsättigung (CYMK) als Funktion der Behandlungszeit und der Behandlungstemperatur dargestellt.

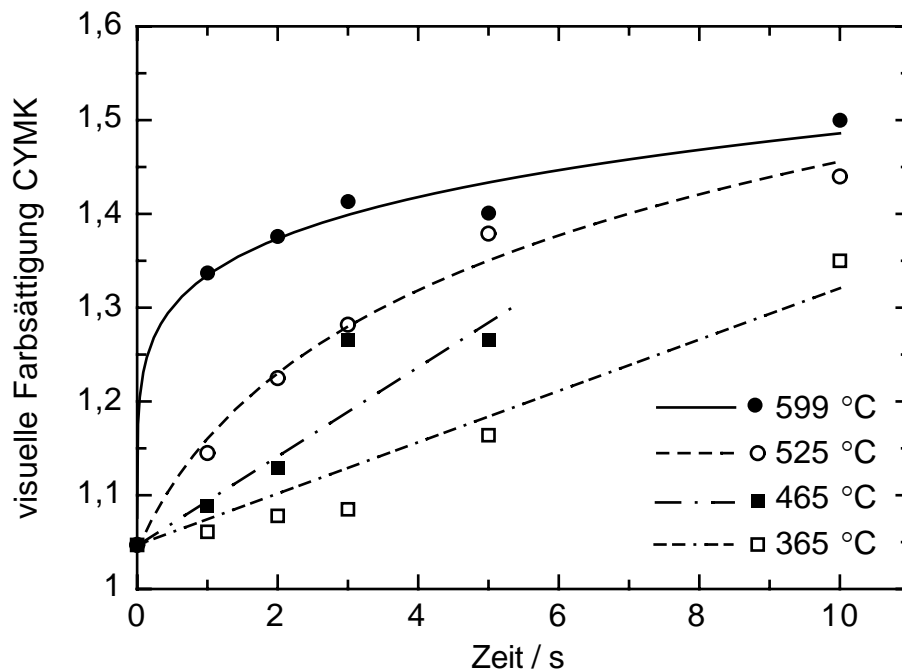


Abb. 4-32: Verlauf der visuellen Farbsättigung im Farbsystem Cyan-Magenta-Yellow-Black von gemahlenem Pfeffer als Funktion der Behandlungszeit und der Behandlungstemperatur.

#### 4.4.3.2 Gewichtsverlust bei der Heißgasbehandlung

Aufgrund des Wassergehalts der schwarzen Pfefferkörner von 11 % war ein Masseverlust bei der Heißgasbehandlung zu erwarten. Abbildung 4-33 zeigt die mittlere Kornmasse als Funktion der Behandlungszeit. Die Gastemperatur beträgt 500 °C, der Gasvolumenstrom 7,9 m<sup>3</sup>/h (Kaltgasvolumenstrom 3 m<sup>3</sup>/h). Es wurde der Mittelwert aus 200 Körnern bestimmt. Für Kohlendioxid und Stickstoff als Heißgase liegen die Kurven eng beieinander. Die Abnahme der Kornmasse ist bei Erhitzung mit Luft deutlich größer. Ursache hierfür sind vermutlich

chemische Reaktionen mit dem Sauerstoff der Luft, wie am Ende dieses Unterkapitels erläutert wird. Bei langen Behandlungszeiten tritt Abbrand ein. Die Körner verlassen die Anlage glühend. Der Masseverlust ist bei allen untersuchten Gasen größer als der Wassergehalt. Dies deutet darauf hin, daß neben Wasser auch andere flüchtige Substanzen, z.B. ätherische Öle, aus dem Korn verdampfen.

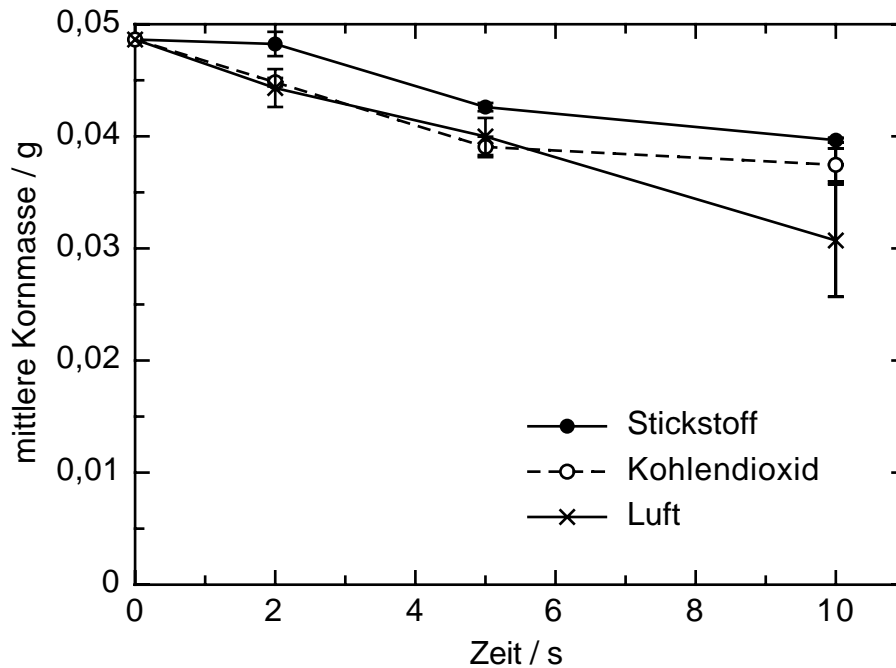


Abb. 4-33: Abnahme der mittleren Kornmasse mit der Behandlungszeit für verschiedene Heißgase (Gastemperatur: 500 °C, Kaltgasvolumenstrom 3 m<sup>3</sup>/h).

#### 4.4.3.3 Verlust an ätherischen Ölen

Der Geschmack eines Gewürzes und dessen Intensität wird u.a. durch den Gehalt an ätherischen Ölen bestimmt. Erwartungsgemäß nimmt der Ölgehalt bei der Heißgasbehandlung ab. In den Abbildungen 4-34 bis 4-36 ist der Verlauf des Ölgehaltes über der Behandlungszeit aufgetragen. Die Gastemperatur ist jeweils 500 °C, der Gasvolumenstrom 7,9 m<sup>3</sup>/h. Es sind der Ölgehalt bezogen auf die Masse nach der Behandlung und der Ölgehalt bezogen auf die Anfangsmasse dargestellt.

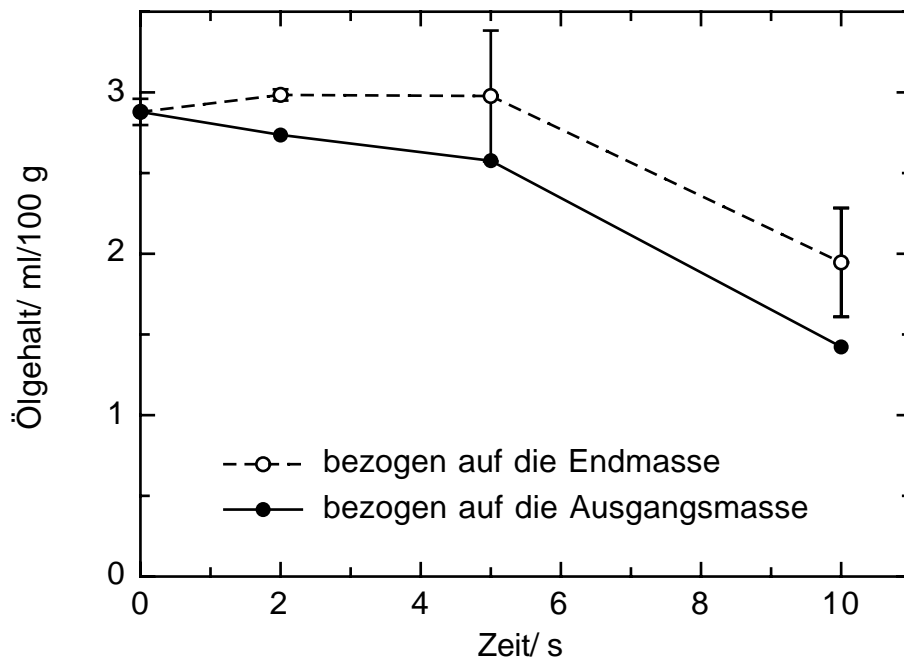


Abb. 4-34: Abnahme des Ölgehaltes mit der Behandlungszeit bei Erhitung mit Luft (Gastemperatur: 500 °C, Kaltgasvolumenstrom 3 m<sup>3</sup>/h).

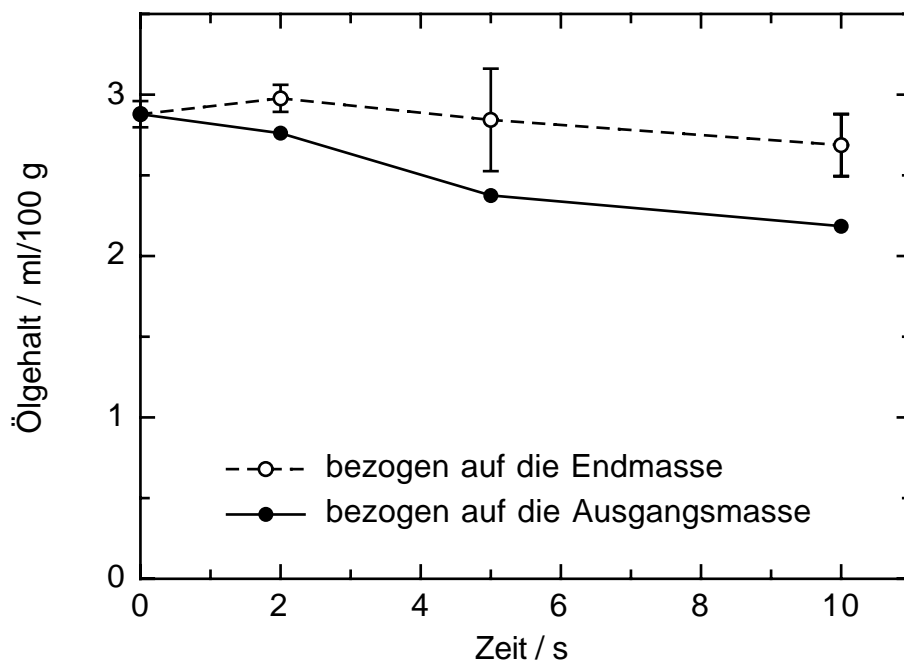


Abb. 4-35: Abnahme des Ölgehaltes mit der Behandlungszeit bei Erhitung mit Kohlendioxid (Gastemperatur: 500 °C, Kaltgasvolumenstrom 3 m<sup>3</sup>/h).

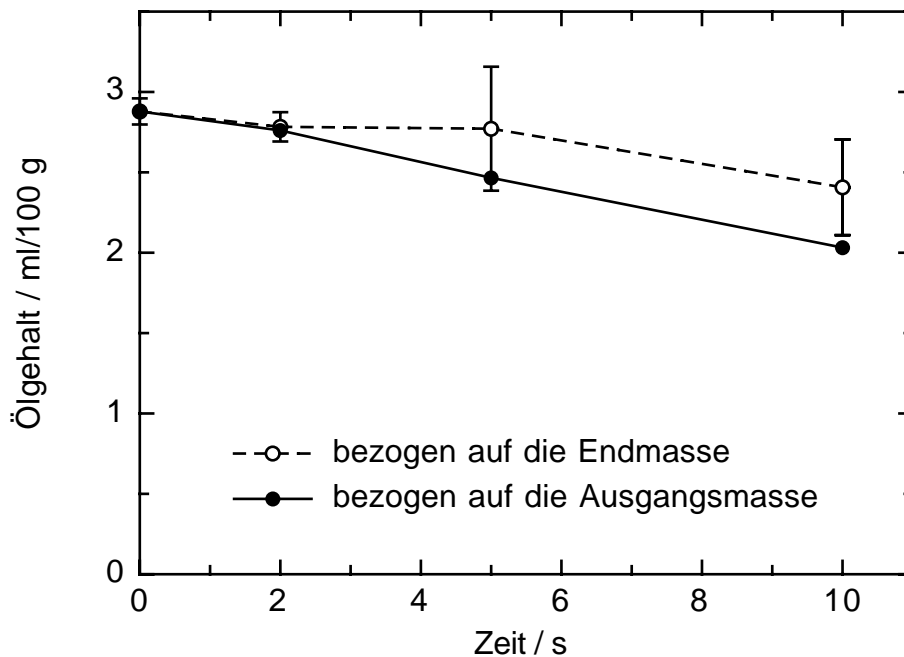


Abb. 4-36: Abnahme des Ölgehaltes mit der Behandlungszeit bei Erhitzung mit Stickstoff (Gastemperatur: 500 °C, Kaltgasvolumenstrom 3 m<sup>3</sup>/h).

Man erkennt wie auch beim Masseverlust, daß bei Verwendung von Luft der Ölverlust besonders groß ist. In Tabelle 4-6 sind die Ergebnisse zusammengefaßt und gegenübergestellt.

Tabelle 4-6: Öl- und Massenverlust bezogen auf die Anfangsmasse.

Verweilzeit	Luft		Kohlendioxid		Stickstoff	
	Ölverlust	Massenverlust	Ölverlust	Massenverlust	Ölverlust	Massenverlust
2 s	5 %	9 %	4 %	8 %	4 %	0,8 %
5 s	11 %	18 %	18 %	20 %	14 %	12 %
10 s	51 %	37 %	24 %	23 %	29 %	18 %

Bei Behandlungszeiten bis 5 s ändert sich der Ölgehalt bei den drei Gasen bezogen auf die Ausgangsmasse nur wenig. Bezogen auf die Masse nach der Behandlung nimmt der Ölgehalt sogar zu. Dann setzt bei Luft ein starker Abfall des Ölgehaltes ein. Bei Kohlendioxid und Stickstoff ist der Ölverlust im gesamten untersuchten Bereich noch tolerierbar.

Bei der Langzeitentkeimung mit Luft sind vermutlich außerdem chemische Reaktionen zu berücksichtigen. Dafür kommen vor allem Umsetzungen der ätherischen Öle mit Sauerstoff aus der Luft zu hydrophilen Substanzen wie Alkoholen, Ethern und Estern in Frage (vgl. Kapitel 2.2.2.1). Diese Reaktionsprodukte können mit der verwendeten Methode der Wasserdampfdestillation nicht mehr als Ölbestandteile nachgewiesen werden.

#### **4.4.3.4 Sensorische Beurteilung des behandelten Pfeffers**

Die sensorische Qualität des Pfeffers wurde in einer Studie der Firma DRAGOCO in Holzminden als zufriedenstellend eingestuft. Die sensorische Bewertung wurde extern durchgeführt, da nur eine Gruppe aus geschulten Personen (Sensorikpanel) ein aussagekräftiges Ergebnis liefern kann. Die Firma DRAGOCO, ein Aromahersteller, hat große Erfahrung in der Bewertung von Geschmacksunterschieden. Es wurde eine Geruchsprüfung und eine Verkostung in verschiedenen Soßen durchgeführt. Dabei sollten die Testpersonen den sensorischen Eindruck des behandelten Pfeffers beschreiben. Als Referenz diente der unbehandelte Pfeffer, dessen sensorische Qualität das Sensorikpanel als gut einstuft. Von 18 Testpersonen eines geschulten Sensorikpanels gaben sechs Personen dem behandelten Pfeffer den Vorzug vor dem unbehandelten. Der behandelte Pfeffer ist schärfer als der unbehandelte, ein von einigen Testern wahrgenommener Beigeschmack und Fremdgeruch sowie die dunklere Farbe führen zu der schlechteren Gesamtbewertung des behandelten Pfeffers

#### 4.4.4 Industrielle Umsetzung des Verfahrens

Bei der industriellen Umsetzung ist zu berücksichtigen, daß die Verweilzeitverteilung sehr eng sein muß. Damit die erforderliche Abtötung erzielt werden kann, dürfen die Körner den Verfahrensraum nicht vor Ablauf der notwendigen Erhitzungszeit verlassen. Um Qualitätsbeeinträchtigungen möglichst gering zu halten, sollten so wenige Körner wie möglich länger als notwendig im Verfahrensraum bleiben. Aus diesem Grunde scheidet Falltürme oder Wirbelschichtapparate aus. Ein Bandförderapparat mit einem Siebband, durch Stege auf dem Band eine Zwangsförderung realisiert erscheint gut geeignet. Für einen einstufigen Prozeß ist eine solche Anlage in Abb. 4-37 skizziert. Eine zweistufige Behandlung läßt sich dadurch realisieren, daß eine weiteres Förderband mit Heißgaskanal und eine Zwischenkonditionierung zwischen Abkühlbad und erster Heißgasstufe installiert wird.

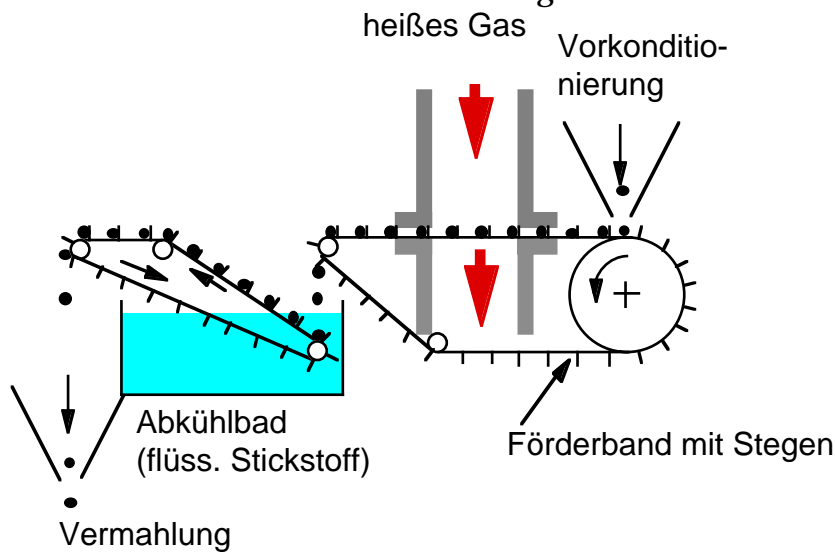


Abb. 4-37: Schema einer Produktionsanlage für die Heißgasbehandlung von Pfefferkörnern.

## 5 Zusammenfassung

Viele Lebensmittel werden durch Erhitzen haltbar gemacht. Dabei werden Enzyme inaktiviert und unerwünschte Mikroorganismen abgetötet. Es werden aber auch wertgebende Inhaltsstoffe wie Vitamine und Proteine abgebaut. Einige Bakterienarten sind in der Lage, Dauerformen (Sporen) zu bilden. Diese Bakteriensporen werden im allgemeinen erst bei hohen Temperaturen abgetötet; zur Beurteilung der erreichten Abtötung wird oft die Reduzierung der Zahl von *Bacillus stearothermophilus* Sporen herangezogen, da sie die höchste Hitzeresistenz aller in Lebensmitteln vorkommenden Sporen besitzen.

Da die Temperaturabhängigkeit der Abtötungsgeschwindigkeit von Mikroorganismen größer ist als die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der chemische Abbaureaktionen, ist es sinnvoll, die Behandlung von Lebensmitteln bei hohen Temperaturen und kurzen Zeiten durchzuführen. Viele Lebensmittel wie Milch werden deshalb im UHT-Bereich (ultra hohe Temperaturen) zwischen 130 °C und 140 °C für 20 s bis 2 s erhitzt. Um solche Anlagen zur Hitzebehandlung auslegen zu können, ist es notwendig, die Abhängigkeit der Abtötungsgeschwindigkeit von der Zusammensetzung des Produktes zu kennen. Ebenso muß die Inaktivierungskinetik, mit der der zeitliche Verlauf der Abtötung beschrieben werden kann, bekannt sein. Für den Bereich extrem hoher Temperaturen (EHT) oberhalb 140 °C existierte bisher keine zufriedenstellende Beschreibung der Abtötungskinetik.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluß der chemischen Zusammensetzung von Lebensmitteln auf die Abtötungsgeschwindigkeit am Beispiel von in Säurelösungen suspendierten *Bacillus stearothermophilus* Sporen. Es wurden Ascorbin-, Essig-, Milch- und Zitronensäure ausgewählt, die in der Lebensmittelindustrie als Säuerungsmittel eingesetzt werden. Die gewählten pH-Werte von 4 und 5 decken den Bereich der leicht sauren Lebensmittel ab, bei denen überlebende Bakteriensporen noch auskeimen und zu Verderb führen können.



Zur Klärung der Inaktivierungskinetik wurden Versuche mit in physiologischer Kochsalzlösung suspendierten *Bacillus stearothermophilus* Sporen durchgeführt. In früheren Untersuchungen am Institut für Lebensmittelverfahrenstechnik und in der Literatur wird zur Beschreibung der Inaktivierungskinetik bakterieller Sporen das Aktivierungs-Inaktivierungs-Modell als geeignet dargestellt. Das Aktivierungs-Inaktivierungs-Modell geht davon aus, daß die Sporen in einem aktivierten und einem ruhenden Zustand vorliegen. Vor der Abtötung müssen die Sporen aus dem ruhenden in den aktivierten Zustand überführt werden. Dieser Vorgang kann sich bei sehr kurzen Behandlungszeiten in einer Zunahme der nachweisbaren, also vermehrungsfähigen Keime ausdrücken. Eine am Institut für Lebensmittelverfahrenstechnik vorhandene Erhitzungsanlage wurde für Versuche bei sehr kurzen Verweilzeiten im EHT-Bereich optimiert. Im Rahmen dieser Optimierung wurden die Toträume der Anlage auf das technisch realisierbare Minimum reduziert und eine Regelung der Suspensionstemperatur aufgebaut. Mit dieser Anlage können bis 170 °C quasiisotherme Bedingungen realisiert werden. Das heißt, die Abtötung während der Aufheiz- und Abkühlphase ist so gering, daß sie vernachlässigt werden kann (Es werden weniger als 21 % = 0,1 Zehnerpotenzen der anfangs vorhandenen Keime abgetötet, dies ist angesichts der wesentlich größeren Steuungen bei der Keimzahlbestimmung als systematischer Fehler noch vernachlässigbar). Die kürzeste erreichbare Verweilzeit beträgt 10 ms.

Bei gleichem pH-Wert ist der Einfluß unterschiedlicher Säuren auf die Abtötungsgeschwindigkeit nur unterhalb 120 °C feststellbar. Oberhalb 125 °C gibt es keinen Einfluß der verwendeten Säure auf die Abtötungsgeschwindigkeit. Sie hängt nur noch vom pH-Wert ab. Die Abtötungsgeschwindigkeit wird durch die Geschwindigkeiten der thermischen Abtötung und des chemischen Angriffs bestimmt. Unter 120 °C ist der chemische Angriff schneller und somit geschwindigkeitsbestimmend. Über 125 °C ist die thermische Abtötung der geschwindigkeitsbestimmende Vorgang.

Für in physiologischer Kochsalzlösung suspendierte Sporen wurde im EHT-Bereich keine Aktivierung ruhender Sporen gefunden. Die gemessenen Schulterkurven sind durch das neu eingeführte Agglome-

rat-Modell erklärbar. Das Agglomerat-Modell berücksichtigt die Größenverteilung der in der Suspension enthaltenen Sporenagglomerate. Ein Sporenagglomerat wird bei mikrobiologischen Nachweisverfahren erst dann nicht mehr als keimbildende Einheit erfaßt, wenn alle in ihm enthaltenen Sporen abgetötet sind. Sind Sporenagglomerate in der Suspension vorhanden, verläuft die Abtötungskurve zunächst waagrecht und nähert sich dann asymptotisch der Steigung für die Abtötung einzelner Sporen. Betrachtet man z.B. eine Suspension, die nur aus Agglomeraten mit 100 Sporen besteht, verläuft die Abtötungskurve für die Dauer von ca. 1,4 D-Werten (für einzelne, frei suspendierte Sporen) waagrecht, knickt dann ab. Der D-Wert  $D(\nu)$  (dezimale Reduktionszeit) ist die Behandlungszeit, die erforderlich ist, um die Mikroorganismenpopulation bei der Temperatur  $\nu$  um eine Zehnerpotenz auf 10 % ihrer Anfangskeimzahl zu reduzieren. Die gleiche Abtötungsrate wird im Vergleich zu einzelnen, frei suspendierten Sporen erst bei einer um 2 D-Werte längeren Behandlungszeit erreicht. Nach ca. 3 D-Werten verlaufen die Abtötungskurven für die Sporenagglomerate und die einzelnen, frei suspendierten Sporen parallel.

Für die Abtötung der einzelnen Sporen gilt die bisher übliche Kinetik erster Ordnung. Die in früheren Untersuchungen gefundenen und aus der Literatur bekannten positiven Überlebensraten sind auf das Aufbrechen von Sporenagglomeraten durch Scherbelastung zurückzuführen. Berücksichtigt man die Agglomeratgrößenverteilung vor und nach dem Versuch, wird dieser Verlauf durch das Agglomerat-Modell wiedergegeben.

Die Aktivierungsenergie für die Abtötung von *Bacillus stearothermophilus* Sporen in physiologischer Kochsalzlösung bei  $\vartheta = 160^\circ\text{C}$  beträgt  $E_A = 186 \pm 10$  kJ/mol. Damit ist noch bei dieser Temperatur eine Qualitätsverbesserung beim Sterilisieren gegenüber einer Behandlung bei tieferen Temperaturen möglich, da die Aktivierungsenergie bei chemischen Reaktionen ca.  $E_A = 80\text{-}100$  kJ/mol beträgt.

Der dritte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Übertragung des Prinzips der EHT-Behandlung auf stückige, oberflächlich verkeimte Lebensmittel. Beispielhaft wurde das in Deutschland meistverwendete Gewürz schwarzer Pfeffer untersucht. Dieses Gewürz stellt mit einer

Keimbelastung von bis zu  $5 \cdot 10^7$  keimbildenden Einheiten pro Gramm (KBE/g) eine bedeutende Kontaminationsquelle bei der Herstellung von Wurstwaren und Konserven dar.

Bei der Heißgasbehandlung oberflächlich verkeimter Lebensmittel am Beispiel von schwarzem Pfeffer zeigte sich, daß das verwendete Erhitzungsgas keinen signifikanten Einfluß auf das Abtötungsergebnis hat. Erwartungsgemäß steigt die Abtötungsrate bei höherer Gastemperatur. Zu langen Behandlungszeiten wird der Abtötungsverlauf flacher; bei einer Verdoppelung der Behandlungszeit von 5 s auf 10 s wird der Abtötungseffekt kaum gesteigert. Durch eine Behandlung mit Stickstoff bei 560 °C für 2 Sekunden kann die Keimzahl unter  $10^4$  KBE/g gesenkt werden. Damit wird das Kriterium keimarm erfüllt.

Um den Einfluß der natürlichen Mischpopulation auszuschalten, wurden Versuche mit monoseptisch kontaminierten Glaskugeln, die als Modellpartikeln verwendet wurden, und Pfefferkörnern, die vor der Rekontamination durch Behandlung mit ionisierender Strahlung sterilisiert wurden, durchgeführt. Alle bisherigen Befunde deuten darauf hin, daß das Protoplasma der Sporen durch die schnelle Trocknung in den Glaszustand überführt wird. Im Glaszustand verläuft die Abtötung der Sporen sehr langsam. Werden die Körner nach einer Hitzebehandlung in einer Umgebung mit ca. 80 % relativer Feuchte zwischenkonditioniert, geht das Protoplasma in den normalen Zustand über, und die anfängliche Abtötungsgeschwindigkeit kann wieder erreicht werden.

Neben der zweistufigen Behandlung besteht die Möglichkeit, die erzielbare Abtötung zu erhöhen, wenn die Körner unmittelbar vor der Behandlung mit einem Sprühnebel befeuchtet werden.

Das Gewicht der Pfefferkörner erniedrigt sich durch die Behandlung. Es werden dabei Wasser und ätherische Öle an das Heizgas abgegeben. Der Verlust an ätherischen Ölen beträgt 4% des Anfangsölgehalts bei der oben erwähnten Behandlung bei 560 °C für 2 s. Dieser Verlust ist im Vergleich zu anderen Hitzepasteurisationsverfahren äußerst gering.

Das Aussehen des Produktes ändert sich ebenfalls. Die braune Färbung wird dunkler, nach langen Behandlungszeiten sind die Körner schwarz. Wird Luft als Erhitzungsgas verwendet, tritt regelrecht Abbrand auf, die Körner verlassen die Anlage glühend. Bei der empfohlenen Behandlung mit Stickstoff von 560 °C und einer Einwirkzeit von 2 s verändert sich die Farbe des gemahlten Produkts jedoch nur unwesentlich.

Die sensorische Qualität des Pfeffers (Stickstoff, 560 °C für 2 s) wurde in einer Studie der Firma DRAGOCO in Holzminden als zufriedenstellend eingestuft. Es wurde eine Geruchsprüfung und eine Verkostung in verschiedenen Soßen durchgeführt. Von 18 Testpersonen eines geschulten Sensorikpanels gaben sechs Personen dem behandelten Pfeffer den Vorzug vor dem unbehandelten.

Das hier vorgestellte Verfahren zur Pasteurisierung von Pfefferkörnern kann auf einfache Weise als Bandförderapparat in den industriellen Maßstab übertragen werden.

## 6 Literaturverzeichnis

[1] CONDON, S.; SALA, F.J.: Heat Resistance of *Bacillus subtilis* in Buffer and Foods of Different pH. *Journal of Food Protection* 55 (1992), Nr. 8, S. 605-608.

[2] KESSLER, H.G.: Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik - Molkereitechnologie. 4. Auflage. München: A. Kessler, 1996.

[3] HAAS, J.: Untersuchung zur thermischen Abtötung hitzeresistenter Bakteriensporen. Dissertation, Universität Karlsruhe, 1992.

[4] ZAGON, J.; DEHNE, L.I.; BÖGE, K.W. (HRSG.): Die Entkeimung von Gewürzen mittels Ozon. Berlin: Institut für Sozialmedizin und Epidemiologie des Bundesgesundheitsamtes, 1991. (SozEp-Hefte 6/1991)

[5] DIEHL, J.F.: Sind bestrahlte Lebensmittel ohne Nährwert? Heidelberg: Hüthig, 1991.

[6] SCHLEGEL, H.G.: Allgemeine Mikrobiologie. 7. Auflage. Stuttgart: Thieme, 1992.

[7] CANO, R.J.; BORUCKI, M.K.: Revival and Identification of Bacterial Spores in 25- to 40-Million-Year-Old Dominican Amber. *Science*, 268 (1996), S. 1060-1064.

[8] SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. (Hrsg.): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 2. Auflage. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986.

[9] KRÄMER, J.: *Lebensmittel-Mikrobiologie*. Stuttgart: Eugen Ulmer, 1987.

[10] FINLEY, N.; FIELDS, M.L.: Heat Activation and Heat Induced Dormancy of *Bacillus stearothermophilus* Spores. *Applied Microbiology* 10 (1962), S. 231-236.

- [11] RUSSEL, A.D.: The Destruction of Bacterial Spores. London: Academic Press, 1982.
- [12] SILLA, M.H.: Acidification as a Factor to Lower the Resistance of Bacterial Spores. *Revista Espanola de Ciencia y Tecnologia de Alimentos* 33 (1993), Nr. 1, S. 13-28.
- [13] MALLIDIS, C.G.; SCHOLEFIELD, J.: Relation of the Heat Resistance of Bacterial Spores to Chemical Composition and Structure. Relation to Core Components. *Journal of Applied Bacteriology* 62 (1987), S. 65-69.
- [14] MURRELL, W.G.; WARTH, A.D.: Composition and Heat Resistance of Bacterial Spores. In: Campbell, L.L.; Halverson, H.D. (Hrsg.): *Spores*. Ann Arbor: American Society for Microbiology, 1965, S. 1-23.
- [15] CORNELL, B.C.; LINDSAY, J.A.:  $^{31}\text{P}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR Studies of DNA/DPA Interaction Model System Study of Spore Heat Resistance. *Spore Newsletter* 7 (1981), S. 44-45.
- [16] SAPRU, V.; LABUZA, T.P.: Temperature Dependence of Thermal Inactivation Rate Constants of *Bacillus stearothermophilus* Spores in Glassy State. In: Blanshard, J.M.V.; Lillford, P.J. (Hrsg.): *The Glassy State in Foods*. Loughborough: Nottingham University Press, 1993.
- [17] SAPRU, V.; LABUZA, T.P.: Glassy State in Bacterial Spores Predicted by Polymer Glass-Transition Theory. *Journal of Food Science* 58 (1993), Nr. 2, S. 445-448.
- [18] WILLIAMS, M.L.; LANDEL, R.F.; FERRY, J.D.: The Temperature Dependence of Relaxation Mechanisms in Amorphous Polymers and other Glass-Forming Liquids. *Journal of the American Chemical Society* 77 (1955), S. 3701-3707.
- [19] BEHRINGER, R.; KESSLER, H.G.: Abtötung der Sporen wichtiger *Bacillus*-Arten in Milch - eine Literaturübersicht. *Internationale Zeitschrift für Lebensmitteltechnologie und -verfahrenstechnik (ZFL)* 42 (1991), Nr. 5, S. EFS22-EFS29.

[20] DAVIES, F.L.: Heat Resistance of *Bacillus* Species. *Journal of the Society of Dairy Technology* 28 (1975), Nr. 2, S. 69-78.

[21] COOK, A.M.; GILBERT, R.J.: Factors Affecting the Heat Resistance of *Bacillus stearothermophilus* Spores. The Effect of Sporulating Conditions and Nature of the Heating Medium. *Journal of Food Technology* 3 (1968a), S. 295-302.

[22] ORDAL, J.Z.; LECHOWICH, R.V.: Some Factors Influencing Thermal Resistance of Bacterial Spores. In: *Proceedings of the Tenth Research Conference*. Chicago: American Meat Institute Foundation, 1958, S. 91-99.

[23] MURRELL, W.G.; SCOTT, W.J.: The Heat Resistance of Bacterial Spores at Various Water Activities. *Journal of General Microbiology* 43 (1966), S. 411-425.

[24] ANDERSON, E.E.; ESSELEN W.B.; FELLERS C.R.: Effect of Acids, Salt, Sugar and Other Food Ingredients on Thermal Resistance of *Bacillus thermoacidurans*. *Food Research* 14 (1949), S. 499-510.

[25] HÄRNULV, B.G.; JOHANSSON, M.; SNYGG, B.G.: Heat Resistance of *Bacillus stearothermophilus* Spores at Different Water Activities. *Journal of Food Science* 42 (1977), S. 91-93.

[26] PFEIFFER, J.: Einfluß der Wasseraktivität sowie des Milieus zwischen Dichtungen und Dichtflächen auf die Hitzeinaktivierung von Mikroorganismen am Beispiel bakterieller Sporen. Dissertation, Technische Universität München, 1992

[27] CERNY, G.; FINK, A.: Untersuchungen zur Abhängigkeit der thermischen Abtötung von Mikroorganismen von Viskosität und Wasseraktivität der Erhitzungsmedien. *Internationale Zeitschrift für Lebensmitteltechnologie und -verfahrenstechnik (ZFL)* 37 (1986), Nr. 2, S. 110-115.

[28] GRECZ, N.; TANG, T.; RAJAN, K.S.: Relation of Metal Chelate Stability to Heat Resistance of Bacterial Spores. In: Halvorson, H.O.;

Hanson, R.; Campbell, L.L. (Hrsg.): Spores V. Washington: American Society for Microbiology, 1972.

[29] LINDSAY, J.A.; MURRELL, W.G.; WARTH, A.D.: Spore Resistance and the Mechanism of Heat Resistance. In: Harris, L.E.; Skopek, A.J. (Hrsg.): Sterilization of Medical Products. Botany (Australia): Johnson and Johnson Pty Ltd., 1985.

[30] MURRELL, W.G.: Biophysical Studies on the Molecular Mechanisms of the Spore Heat Resistance and Dormancy. In: Levinson, H.S.; Sonenshein, A.L.; Tipper, D.J. (Hrsg.): Sporulation and Germination. Washington: American Society of Microbiology, 1981.

[31] MURRELL, W.G.: Bacterial Spores - Nature's Ultimate Survival Package. In: Murrell, W.G.; Kennedy, I.R. (Hrsg.): Microbiology in Action. New York: John Wiley and Sons, 1988.

[32] KADOTA, H.; IJIMA, K.: The X-ray Diffraction Pattern of Spores of *Bacillus subtilis*. Agricultural and Biological Chemistry 29 (1965), S. 80-81.

[33] CARSTENSEN, E.L.; MARQUIS, R.E.; GERHARDT, P.: Dielectric Study of the Physical State of Electrolytes and Water within *Bacillus stearothermophilus* Spores. Journal of Bacteriology, 107 (1971), S. 106-113.

[34] LEVINE, H.; SLADE, L.: A Food Polymer Science Approach to Structure-Property Relationships in Aqueous Food Systems: Non-Equilibrium Behaviour of Carbohydrate-Water Systems. In: Levine, H.; Slade, L. (Hrsg.): Water Relationships in Foods. New York: Plenum Press, 1991.

[35] ROOS, Y.H.: Phase Transitions in Foods. San Diego: Academic Press, 1995.



- [36] MAYOU, J.L.; JEZESKI, J.J.: Effect of Using Milk as a Heating Menstruum on The Apparent Heat Resistance of *Bacillus stearothermophilus* Spores. *Journal of Food Protection* 40 (1977), Nr. 4, S. 228-231.
- [37] PFLUG, I.J.; SMITH, G.M.: Survivor Curves of Bacterial Spores Heated in Parental Solutions. In: Barker, A.N.; Wolf, J.; Ellar, D.J.; Dring, G.J.; Gould, G.W.: *Spore research 1976*. New York: Academic Press, 1977, S. 501-525.
- [38] SRIMANI, B.; LONCIN, M.: Determination of Decimal Reduction Time of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis* Spores at 100 °C. *Lebensmittel -Wissenschaft und -Technologie* 13 (1980), S. 190-192.
- [39] MICHIELS, L.; SPILOTIS, V.; ETOA, F.X.: Nouvelle methode de denombrement de bacteries sporulees: application a la mesure de la thermoresistance. *Annales des falsifications et de l'expertise chimique et toxicologique* 78 (1985), Nr. 837, S. 171-181.
- [40] CERNY, G.: Abhängigkeit der thermischen Abtötung von Mikroorganismen vom pH-Wert der Medien. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 170 (1980), S. 180-186.
- [41] BEHRINGER, R.; KESSLER, H.G.: Influence of pH and Concentration of Skimmilk on Heat Resistance of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus stearothermophilus* Spores. *Milchwissenschaft* 47 (1992) Nr. 4, S. 207-211.
- [42] BROWN, K.L.; THROPE, R.H.: The Effect of pH on the Heat Resistance and Recovery of Bacterial Spores and the Effect of Media Additives on the Recovery of *Bacillus stearothermophilus*. *Technical Memorandum Nr. 176*. Chipping Campden: Campden Food Preservation Research Association, 1977.
- [43] HUTTON, M.T.; KOSKINEN, M.A.; HANLIN, J.H.: Interacting Effects of pH and NaCl on Heat Resistance of Bacterial Spores. *Journal of Food Science* 56 (1991), Nr. 3, S. 821-822.

- [44] STEINBUCH, E.: The Acid Sensitization of Heat Resistant Bacterial Spores. In: Barker, A.N.; Wolf, J.; Ellar, D.J.; Dring, G.J.; Gould, G.W.(Hrsg.): Spore research 1976. New York: Academic Press, 1977, S. 615-624.
- [45] ROBERTS, T.A.; HITCHINS, A.D.: Resistance of Spores. In: Gould, G.W.; Hurst, A. (Hrsg.): The Bacterial Spore. New York: Academic Press, 1969, S. 611-670.
- [46] SENHAJI, A.F.; LONCIN, M.: The Protective Effect of Fat on the Heat Resistance of Bacteria (I). *Journal of Food Technology* 12 (1977), S. 203-216.
- [47] ABABOUC, L.; BUSTA, F.F.: Effect of Thermal Treatments in Oils on Bacterial Spore Survival. *Journal of Applied Bacteriology* 62 (1987), S. 491-502.
- [48] LONCIN, M.; WEISSER, H.: Die Wasseraktivität und ihre Bedeutung in der Lebensmittelverfahrenstechnik. *Chemie-Ingenieur-Technik* 49 (1977), Nr. 4, S. 312-319.
- [49] COOK, A.M.; GILBERT, R.J.: Factors Affecting the Heat Resistance of *Bacillus stearothermophilus* Spores. The Effect of Recovery Conditions on Colony Count of Unheated and Heated Spores. *Journal of Food Technology* 3 (1968b), S. 285-293.
- [50] COOK, A.M.; GILBERT, R.J.: The Effect of Sodium Chloride on Heat Resistance and Recovery of Heated Spores of *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Applied Bacteriology* 32 (1969), S. 96-102.
- [51] DAUDIN, J.D.; CERF, O.: Influence des chocs thermiques sur la destruction des spores bacteriennes par la chaleur. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 10 (1977), S. 203-207.
- [52] FRANK, H.A.; CAMPBELL, L.L.: The Nonlogarithmic Rate of Thermal Destruction of Spores of *Bacillus coagulans*. *Applied Microbiology* 5 (1957), S. 243-248.

[53] ABRAHAM, G.; DEREBRAY, E.; CANDU, Y.; PIAR, G.: Mathematical Model of Thermal Destruction of *Bacillus stearothermophilus* Spores. Applied and Environmental Microbiology 56 (1990), Nr. 10, S. 3073-3080.

[54] SHULL, J.J.; CARGO, G.T.; ERNST, R.R.: Kinetics of Heat Activation and of Thermal Death of Bacterial Spores. Applied Microbiology 11 (1963), S. 485-487.

[55] RODRIGUEZ, A.C.; SMERAGE, G.H.: System Analysis of the Dynamics of Bacterial Spore Populations During Lethal Heat Treatment. Transactions of the American Society of Agricultural Engineers 39 (2) (1996), S. 595-603.

[56] SIEWECK, F.: Exotische Gewürze - Herkunft, Verwendung, Inhaltsstoffe. Basel,: Birkhäuser, 1990.

[57] SCHWEIZERISCHES LEBENSMITTELBUCH, Gewürze: Untersuchungsmethoden / Monographien: Pfeffer. 5. Auflage, 2. Band. Bern: Eidgenössische Drucksachen- und Materialienzentrale, 1964.

[58] GASSNER, HOHMANN, B., DEUTSCHMANN, F.: Mikroskopische Untersuchungen pflanzlicher Lebensmittel. 5. Auflage. Stuttgart: Gustav Fischer, 1989.

[59] PÖHNL, H.: Persönliche Mitteilung. Gewürzmüller GmbH, Stuttgart, 1995.

[60] SCHIRM, M.: Vergleichende Untersuchungen über Gehaltsbestimmung von ätherischem Öl nach den Destillationsverfahren. Deutsche Apotheker-Zeitung 93 (1953), Nr.16, S. 273-280.

[61] GERHARDT, U.: Gewürze in der Lebensmittelindustrie: Eigenschaften, Technologien, Verwendung. 2. Auflage. Hamburg: Behr's, 1994.

- [62] RICHARD, H.M., JENNINGS, W.G.: Volatile Composition of Black Pepper. *Journal of Food Science* 36 ( 1971 ), S.584-589.
- [63] VÖSGEN, B.: Über die Flavonolglycoside von Piment, Nelken und Pfeffer. Dissertation, Universität Hannover, 1979.
- [64] I-SAN LIN, R.: Pharmacological Properties and Medicinal Use of Pepper (*Piper Nigrum*). In: G.Charalambous ( Hrsg ): Spices, Herbs and Edible Fungi. London: Elsevier Applied Science, 1994.
- [65] THIEßEN, F., HOFMANN, K.: Aromatisierung: Veränderung von Gewürzen und Essenzen durch Hitzebehandlung. *Die Ernährungswirtschaft / Lebensmitteltechnik* 11 (1969), S.861-862.
- [66] KAMMER, I.: Über besondere Eigenschaften der Aeroben Bazillen in Gewürzen unter besonderer Berücksichtigung der Eiweißzersetzung. Dissertation, Universität Hannover, 1961.
- [67] BERKEL, H.: Differenzierung und Speziesverteilung von aus Fleischerzeugnissen stammenden Mikroorganismen der Gattung *Bacillus*. Dissertation, Universität Gießen, 1975.
- [68] PALUMBO, S.A.; RIVENBURGH, A. I.; SMITH, J.L.; KISSINGER, J.C.: Identification of *Bacillus subtilis* from Sausage Products and Spices. *Journal of Applied Bacteriology* 38 (1975), S. 99-105.
- [69] SEENAPPA, M.; KEMPTON, A.G.: A Note on Occurance of *Bacillus cereus* and other Species of *Bacillus* in Indian Spices of Export Quality. *Journal of Applied Bacteriology* 50 (1981), S. 225-228.
- [70] FABRI, I.; NAGEL, V.; DEAK, T.; SZABO SZABAD, J.; TABAJDI PINTER, V.; ZALAVARI, Z.: Bacterial Spore Profiles of Red Paprika and Black Pepper. FEMS-SAB Meeting: Fundamental and Applied Aspects of Spores, Cambridge University, 13.9. - 17.9.1982. Zitiert nach NEUMAYR, 1983.

[71] NEUMAYR, L.: Untersuchungen zur Entkeimung von Gewürzen und die Notwendigkeit der Verwendung entkeimter Gewürze für die Rohwurstherstellung. Dissertation, Technische Universität München, 1983.

[72] PIVNICK, H. (1980a): Curing Salts and Related Materials. In: Silliker, J.H. (Edt.): Microbial Ecology of Foods. Vol. I. Food Commodities. New York: Academic Press, 1980.

[73] PIVNICK, H. (1980b): Spices. In: Silliker, J.H. (Edt.): Microbial Ecology of Foods. Vol. II. Factors affecting life and death of microorganisms. New York: Academic Press, 1980.

[74] LANDWEHR, D.; POHL, M.H.: Abkühlverhalten von Pfeffer bei der Kaltzerkleinerung. Zeitschrift für Lebensmitteltechnologie und -verfahrenstechnik (ZFL) 42 (1987), Nr. (8), S. 660-673.

[75] PICHHARDT, K.: Lebensmittelmikrobiologie-Grundlagen für die Praxis. Berlin: Springer, 1984.

[76] DE MAN: The Probability of the Most Probable Number. European Journal of Applied Microbiology, 1 (1975), S. 67-78.

[77] SCHMIDT-LORENZ, W.: Sammlung von Vorschriften zur mikrobiologischen Untersuchung von Lebensmitteln. Band 1. Weinheim: Verlag Chemie, 1980.

[78] BRAUCKMANN, B.: Neue technische Lösungen bei der Gewürzherstellung der Fuchs GmbH in Melle: In der Weißwurst bleibt der Pfeffer unsichtbar. Chemische Rundschau 48 (1995), S.7.

[79] DAB 10: Gehaltsbestimmung des ätherischen Öles in Drogen. DEUTSCHES ARZNEIMITTEL-BUCH 10, Grundaufgabe, 1991.

[80] CLAVENGER, J.F.: Apparatus for the Determination of Volatile Oil. *Journal of the American Pharmaceutical Association* 17 (1928) Nr.4, S. 345-349.

[81] COOKING, T.T., MIDDLETON, G.: An Improved Method for the Estimation of the Essential Oil Content of Drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 8 (1935), S. 435-442.

[82] CAGLAR, S.: Institut für Strömungslehre und Strömungsmaschinen, Universität Karlsruhe, persönliche Mitteilung, 12.08.96.

[83] SCHLÜNDER, E.U.: Einführung in die Wärmeübertragung. 5. Auflage Braunschweig: Vieweg, 1986.

[84] SCHUBERT, H.: Skriptum zur Vorlesung "Lebensmittelverfahrenstechnik I". Institut für Lebensmittelverfahrenstechnik, Universität Karlsruhe, 1993.

[85] SCHUBERT, H.; EHLERMANN, D.: Lebensmittelbestrahlung. *Chemie-Ingenieur-Technik (CIT)* 60 (1988), Nr. 5, S. 203-216.

[86] CERF, O.: A Review. Tailing of Survival Curves of Bacterial Spores. *Journal of Applied Bacteriology* 42 (1977), S. 149-161.

[87] VDI-WÄRMEATLAS. 5. Auflage. Düsseldorf: VDI-Gesellschaft Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen (GVC), 1988.

[88] STEINBECK, M.: persönliche Mitteilung. Institut für Thermische Verfahrenstechnik, Universität Karlsruhe, 1996.

## Anhang

Tabelle A-1: Aktivierungs- und Inaktivierungskonstanten mit Standardabweichung nach dem A.-I.-Modell.

Temperatur / °C	$k_A \cdot s$	$k_I \cdot s$
145	72±4	85±46
150	150±8	160±39
155	240±13	520±128
160	450±25	10 000±2500

Tabelle A-2: Scheinbare D-Werte  $D_{app}$  mit Standardabweichung.

Temperatur / °C	$D_{app} / s$
145	0,032±0,007
150	0,015±0,003
155	0,0096±0,0018
160	0,0051±0,0011

Tabelle A-3: Aktivierungs- und Inaktivierungskonstanten mit Standardabweichung nach dem A.-I.-Modell bei Auswertung nach Fall 1.

Temperatur / °C	$k_A \cdot s$	$k_I \cdot s$
145	86±21	72±5
150	160±25	150±7

## Grenzwertbetrachtung für das Agglomerat-Modell

Die berechneten Kurven für die Abtötung von Sporenagglomeraten weisen einen linearen Ast auf, der annähernd parallel zu der Überlebenskurve frei suspendierter Sporen verläuft. Die Steigung dieses Astes läßt sich durch eine Grenzwertbetrachtung ermitteln. Der Verlauf der Kurve wird durch

$$\lg\left(\frac{N}{N_0}\right) = \lg\left[1 - \left(1 - e^{-k \cdot t}\right)^i\right] \quad (\text{A-1})$$

beschrieben. Die Ableitung dieses Termes nach der Zeit beträgt

$$\frac{d}{dt}\left(\lg\left(\frac{N}{N_0}\right)\right) = \frac{i \cdot \left(1 - e^{-k \cdot t}\right)^{i-1} \cdot k \cdot e^{-k \cdot t}}{1 - \left(1 - e^{-k \cdot t}\right)^i} \quad (\text{A-2})$$

Der Grenzwert dieses Ausdruckes ist für  $t \rightarrow \infty$  nicht definiert. Er muß über den Satz, daß der Grenzwert eines Quotienten zweier Funktionen deren Grenzwert Null ist gleich dem Quotienten der Grenzwerte ihrer Ableitungen an dieser Stelle ist, berechnet werden (erste L'Hopital'sche Regel).

$$\text{wenn } \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{f(t)}{g(t)} = \frac{0}{0} \text{ dann gilt } \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{f(t)}{g(t)} = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{f'(t)}{g'(t)} \quad (\text{A-3})$$

wendet man dies auf den hier zu untersuchenden Ausdruck an, so erhält man

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \frac{d}{dt}\left(\lg\left(\frac{N}{N_0}\right)\right) = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{i(i-1)\left(1 - e^{-k \cdot t}\right)^{i-2} k^2 \left(e^{-k \cdot t}\right)^2 - i\left(1 - e^{-k \cdot t}\right)^{i-1} k^2 e^{-k \cdot t}}{i\left(1 - e^{-k \cdot t}\right)^{i-1} k e^{-k \cdot t}} \quad (\text{A-4})$$

der Ausdruck vereinfacht sich durch Kürzen und Zusammenfassen zu



$$\lim_{t \rightarrow \infty} \frac{d}{dt} \left( \lg \left( \frac{N}{N_0} \right) \right) = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{(i-1)k \cdot e^{-k \cdot t} - (1 - e^{-k \cdot t})k}{(1 - e^{-k \cdot t})} = -k$$

(A-5)

mit dem Grenzwert  $-k$ .

### Abschätzung des Wärmeübergangs durch Strahlung

Die Anordnung Pfefferkorn im Reaktorraum kann als eine Zylinder in Zylinder Anordnung angenähert werden [88]. Es ergibt sich dann für die Einstrahlzahl der Wert  $\varphi_{12} = 0,07$  [87]. Das Verhältnis von strahlungsbedingtem zu konvektivem Wärmeübergang beträgt somit 0,23 %. Selbst bei der maximal möglichen Einstrahlzahl von 1 beträgt das Verhältnis nur 3,37 %. Der Wärmeübergang durch Strahlung kann also bei der Berechnung vernachlässigt werden. Die Zahlenwerte sind in Tabelle A-4 gegenübergestellt.

Tabelle A-4: Einfluß der Strahlung auf den Wärmeübergang bei verschiedenen Einstrahlzahlen  $\varphi_{12}$ .

$\varphi_{12}$	$\alpha_{\text{rad}} / \text{W/m}^2 \cdot \text{K}$	$\alpha_{\text{konv}} / \text{W/m}^2 \cdot \text{K}$	$\alpha_{\text{rad}} / \alpha_{\text{konv}}$
0,07	0,68	287,88	0,23 %
0,1	0,97	287,88	0,34 %
0,5	4,85	287,88	1,68 %
1	9,71	287,88	3,37 %

## Berechnung des Temperaturverlaufes mit dem expliziten Differenzenverfahren

Der Rechenweg ist ausführlich im VDI-WÄRMEATLAS [87] (Kap. EC Instationäre Wärmeleitung in ruhenden Körpern) beschrieben, deshalb wird hier nur die Diskretisierung der Wärmeleitungsgleichung beschrieben.

Die Wärmeleitungsgleichung lautet in dimensionsloser Form:

$$\frac{d\theta}{d\tau} = \frac{d^2\theta}{d\xi^2} + \frac{m}{\xi} \cdot \frac{d\theta}{d\xi} \quad (\text{A-5})$$

Mit der dimensionslosen Temperatur

$$\theta = \frac{\vartheta - \vartheta_{\infty}}{\vartheta_0 - \vartheta_{\infty}}$$

der Fourier-Zahl

$$\tau = \frac{a \cdot t}{R^2}$$

und dem dimensionslosen Radius

$$\xi = \frac{x}{R}$$

Der Faktor  $m$  ist abhängig von der Art des Koordinatensystems. Für die hier verwendeten Kugelkoordinaten nimmt er den Wert  $m = 2$  an. Umgeformt in eine Differenzgleichung folgt:

$$\theta_{i+1,k} = \frac{\Delta\tau}{(\Delta\xi)^2} \cdot \left\{ \theta_{i,k+1} \left( 1 + \frac{m \cdot \Delta\xi}{2\xi_k} \right) + \theta_{i,k-1} \left( 1 - \frac{m \cdot \Delta\xi}{2\xi_k} \right) \right\} + \left( 1 - 2 \frac{\Delta\tau}{(\Delta\xi)^2} \right) \theta_{i,k} \quad (\text{A-6})$$

Mit Gleichung A-6 kann die Temperatur  $\theta_{i+1,k}$  an jeder beliebigen Stelle  $\xi_k$  zum Zeitpunkt  $\tau_{i+1} = \tau_i + \Delta\tau$  aus der Temperatur dieser und der beiden benachbarten Stellen  $\xi_{k-1}$  und  $\xi_{k+1}$  zum Zeitpunkt  $\tau_i$  berechnet werden. Auf diese Weise kann das Temperaturprofil als Funktion der Zeit für die gesamte Kugel berechnet werden. Die Aufteilung in einzelne Schalen ist in Abbildung A-1 zu sehen.

Als Randbedingungen ergeben sich:

Symmetrie:  $\theta_{i,0} = \theta_{i,1}$

$$i=0 \quad \theta_{i,k_N+1} = \theta_{i,k_N} \left( 1 - \text{Bi} \frac{\Delta\xi}{2} \right)$$

$$i>0 \quad \theta_{i,k_N+1} = \theta_{i,k_N} \frac{1 - \text{Bi} \frac{\Delta\xi}{2}}{1 + \text{Bi} \frac{\Delta\xi}{2}}$$

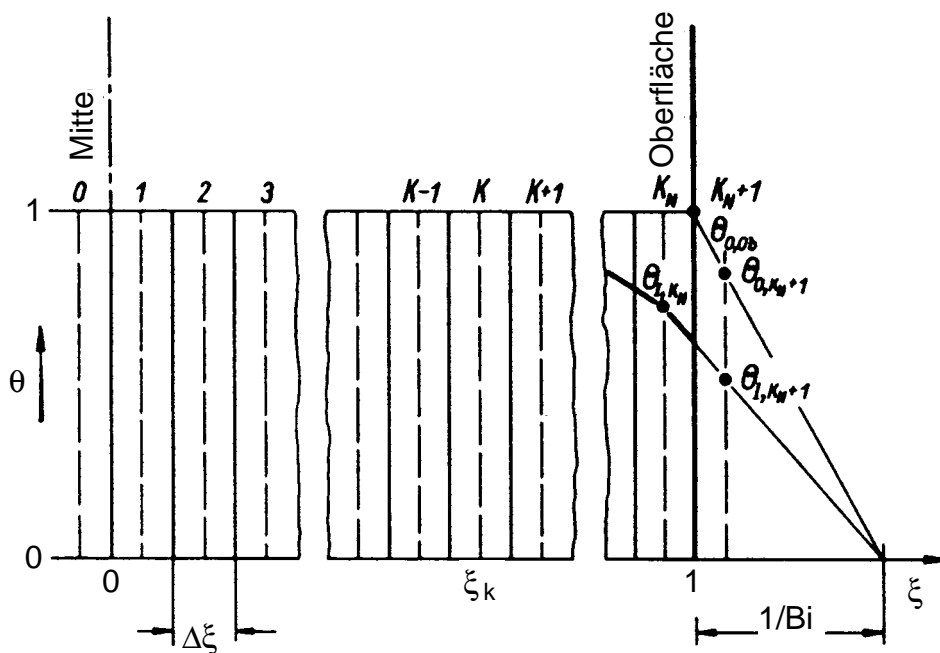


Abb. A-1: Aufteilung eines Körpers in  $k_N$  Schichten von der Dicke  $\Delta\xi$  zur Durchführung des Differenzenverfahrens [87].

Das Verfahren ist stabil, wenn folgende Bedingung erfüllt ist:

$$\frac{\Delta\tau}{(\Delta\xi)^2} \leq \frac{1}{2}$$

Zur Berechnung wurden die Schrittweiten so gewählt, daß das Gleichheitszeichen gilt, somit fällt in Gleichung A-6 der letzte Term weg. Nach jedem Zeitschritt wurden die Wärmeübergangskoeffizienten neu berechnet.

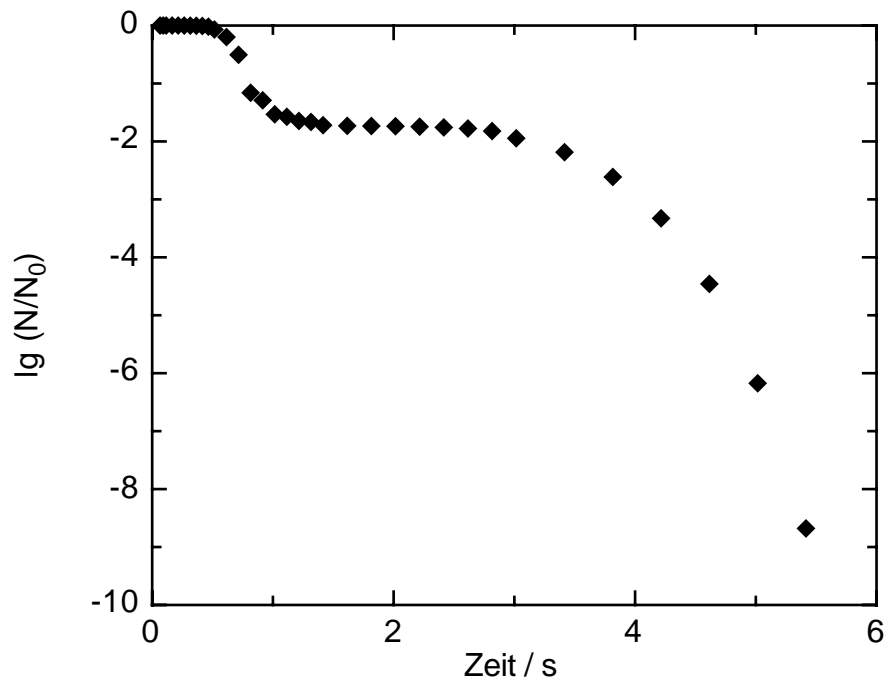


Abb. A-2: Berechneter Abtötungsverlauf unter Berücksichtigung der von PFEIFFER [26] gefundene Abhängigkeit der Hitzeresistenz von der Wasseraktivität. Es kommt während der Trocknung zur Ausbildung eines kurzen Plateaus. Wenn die Trocknung abgeschlossen ist, steigt die Abtötungsgeschwindigkeit aufgrund der steigenden Temperatur wieder stark an.

## L e b e n s l a u f

Name: Rainer Bültermann  
Anschrift: Am Rainle 4  
76227 Karlsruhe  
geboren am: 21.02.1967  
in: Rheinfeldern/Baden  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig  
Eltern: Reinhold Bültermann (Diplom-Ingenieur)  
Gudrun Bültermann (Medizinisch Technische Assistentin)

Schule:  
1973-1977 Neumatt Grundschule, Lörrach  
1977-1986 Hans-Thoma-Gymnasium, Lörrach  
03.06.1986 Abitur

Grundwehrdienst:  
1986-1987 LAR 3, Roth; Aufklärungsgeschwader 51, Bremgarten  
Dienstgrad: Obergefreiter

Studium:  
WS/87-SS/92 Studium der Verfahrenstechnik an der Universität Karlsruhe (TH)  
30.09.1989 Vordiplom  
18.09.1992 Diplom-Hauptprüfung  
Hauptfächer: thermische VT und mechanische VT  
Thema der Diplomarbeit:  
"Untersuchungen zur Querstromfiltration mit anorganischen Membranen im Hinblick auf die mikrobielle Denitrifikation von Gemüsesäften"

Praktika/Tätigkeiten:  
13 Wochen Industriepraktikum gemäß den Richtlinien der Fakultät für Chemieingenieurwesen, siehe Anlage  
WS/90-SS/92 Tätigkeit als Tutor für Technische Mechanik I+II am Institut für Angewandte Mechanik der Universität Karlsruhe (TH)

Promotion:  
01.10.1992 Wissenschaftlicher Mitarbeiter von Herrn Prof. Dr.-Ing. habil.  
bis 30.09.97 H. Schubert am Institut für Lebensmittelverfahrenstechnik der Universität Karlsruhe (TH)  
Thema der Dissertation: Untersuchungen zur Hitzeresistenz von Bakteriensporen und zum Pasteurisieren von oberflächlich verkeimten Lebensmitteln.

seit 01.12.97 BAYER AG Leverkusen