

Mikrobiologische Sicherheit von Rohwurstprodukten – Wirkung von Nitrit und Pflanzenextrakten auf enterohämorrhagische *Escherichia coli* und *Salmonella spp.*

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Max-Rubner-Institut (MRI) Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Kulmbach PD Dr. Charles Franz/Dr. Rohtraud Pichner
Forschungsstelle II:	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährung und Lebensmittelforschung Abt. Mikrobiologie Prof. Dr. Siegfried Scherer/Dr. Stefanie Müller-Herbst
Industriegruppen:	Bundesverband der Deutschen Fleischwarenindustrie e. V. (BVDF), Bonn Deutscher Fleischerverband e. V. (DFV), Frankfurt
	Projektkoordinator: Johannes Kurz Ponnath Produktions GmbH, Freiburg
Laufzeit:	2011 – 2014
Zuwendungssumme:	€ 662.400,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Zur Hemmung des Überlebens von unerwünschten pathogenen Mikroorganismen wird herkömmlich hergestellten Rohwürsten Nitritpökelsalz (NPS) zugegeben; dabei ist die Zugabe von NPS nur zu konservierenden, keimhemmenden Zwecken zugelassen. Der Verbraucher steht allerdings dem Einsatz von chemischen Zusatzstoffen, wie NPS, zunehmend kritischer gegenüber, weshalb vor allem Produzenten von traditionellen oder unter ökologischen Gesichtspunkten hergestellten Rohwurstprodukten versuchen, die Nitritkonzentration in den Produkten zu senken, ganz darauf zu verzichten oder Nitritersatzstoffe, wie nitrathaltige Pflanzenextrakte, zu verwenden. Ungeklärt ist dabei allerdings, wie weit die Nitritkonzentration in Rohwürsten gesenkt werden kann, ohne die mikrobiologische Sicherheit der Produkte zu gefährden. Hierfür sind Studien nötig, die unter Einbezug multifaktorieller Aspekte, wie a_w -Wert, pH-Wert und

Temperatur, die Bedingungen identifizieren, unter denen der Nitritstress maximal ist. Des Weiteren werden Rohwürste in der Literatur häufig als Risikoprodukte für lebensmittelassoziierte EHEC-/Salmonellen-Erkrankungen des Menschen genannt, da *Salmonella spp.* oder enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in rohem Fleisch und damit auch in Rohwürsten vorkommen und überleben können. Aufgrund der daraus abgeleiteten Forderung nach einem Negativbefund dieser Erreger kann ein Nachweis von Salmonellen/EHEC im verkaufsfertigen Endprodukt zu kostenintensiven, rufschädigenden bis hin zu existenzbedrohenden Rückrufaktionen führen. Dabei findet bei positiven Salmonellen- oder EHEC-Befunden in Lebensmitteln keine Differenzierung zwischen Lebensmittelisolaten, die noch nicht mit einem Ausbruch in Verbindung gebracht wurden und Ausbruchsisolaten statt. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass lebensmittelassoziierte Stämme den Reifungsprozess unter Umständen besser überleben können als

Ausbruchsisolate. Ein besseres Wissen hierüber könnte helfen, das Risiko von kostspieligen Rückrufaktionen zu senken. Hierzu fehlen systematisch durchgeführte Studien, die zeigen, welche Stämme sich im Rahmen einer praxisnahen Mischkontamination im Endprodukt durchsetzen. Auch stehen Rohwursthersteller vor der Problematik, dass, trotz negativer Befunde in der Eigenkontrolle, Planprobenuntersuchungen positiv ausfallen können. Kenntnisse über die räumliche Verteilung der Gram-negativen Pathogenen im Produkt wären hier von großem Nutzen für eine gezielte Probennahme bei der Qualitätskontrolle und somit auch für eine Erhöhung der Produktsicherheit.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, die Basis zu schaffen für Empfehlungen zur Reduktion der Menge der Zusatzstoffe Nitrit bzw. Nitrat sowie für eine Herstellung mit einem Zusatz von Pflanzenextrakten anstelle von NPS. Auf diese Weise sollte das Projekt zu einer erhöhten Sicherheit von Rohwurstprodukten beitragen.

Forschungsergebnis:

Die Minimierung der Nitritkonzentration in Rohwurstprodukten bei gleichzeitiger Gewährleistung der mikrobiologischen Sicherheit erfordert ein tiefgehendes Verständnis der Anpassung pathogener Bakterien an Nitrit-Stress. Da in der Rohwurst vermutlich nicht Nitrit selbst das antibakterielle Agens ist, sondern Abbauprodukte wie Stickstoffmonoxid (NO), wurde die Beteiligung von NO-entgiftenden Systemen am Überleben von Nitrit-Stress unter Einfluss verschiedenster praxisrelevanter Parameter in *Salmonella typhimurium* und EHEC analysiert. Die In-Vitro-Wachstumsanalysen ergaben, dass unter den in der Literatur beschriebenen NO-detoxifizierenden Systemen HmpA, NorV und NrfA vor allem HmpA wichtig für das Wachstum von *S. typhimurium* und EHEC in LB-Medium in Gegenwart von 150 mg/l Natriumnitrit bei einem sauren pH-Wert ist. Weiterhin konnte in globalen Transkriptionsanalysen gezeigt werden, dass hauptsächlich die Transkription von *hmpA* in Gegenwart eines NO-Donors zunimmt. In Challengeversuchen in kurzgereifter streichfähiger Rohwurst konnte jedoch kein vermehrtes Absterben der Deletionsmutanten der eben beschriebenen Systeme von EHEC bzw. Salmonellen im Vergleich zum Wildtyp in Anwesenheit von NaNO₂ beobachtet werden. Somit scheint nach diesen Ergebnissen keines der bisher gut charakterisierten NO-detoxifizierenden Systeme

alleine eine Resistenz gegenüber Nitrit-Stress zu vermitteln. Es könnte sein, dass sich die NO-entgiftenden Systeme im Produkt gegenseitig kompensieren, d.h., dass bei Fehlen eines Systems dessen Funktion von den beiden anderen Systemen übernommen wird. Dies ist eine Hypothese, die zum gegenwärtigen Zeitpunkt weder widerlegt noch bestätigt werden kann. Eine weitere Hypothese, welche durch weiterführende Versuche gestützt wird, ist die Vermutung, dass im Produkt NO (alleine) nicht das inhibierende Agens ist, welches während des Rohwurstreifungsprozesses aus Nitrit entsteht.

Um die Anpassung von *S. typhimurium* an Nitrit-Stress bei sauren pH-Bedingungen besser zu verstehen, wurde sowohl während einer längerfristigen Anpassung als auch bei der Schockantwort auf Nitrit-Stress eine Zunahme der Expression von Systemen in den Bakterien beobachtet, für deren Produkte eine Rolle bei der Säureresistenz von *S. typhimurium* bekannt ist. Das Screening einer *Salmonella*-Mutantenbank auf einen Nitrit-sensitiven Phänotyp bei verschiedenen praxisrelevanten Parametern ergab, dass eine vermehrte intrazelluläre Ansäuerung eine neu beschriebene antibakterielle Wirkungsweise von Nitrit bei einem sauren pH-Wert ist. Hierbei scheint in Gegenwart eines sauren pH-Wertes aus Nitrit neben NO u.a. Salpetrige Säure gebildet zu werden, die als ungeladenes Molekül durch die Cytoplasmamembran diffundieren kann. Im annähernd neutralen Bakterieninneren zerfällt die salpetrige Säure wieder in Nitrit und ein Proton. Die freien Protonen tragen dann zur intrazellulären Ansäuerung bei. In Kombination mit Ergebnissen von In-Vitro-Wachstumsversuchen kann der Schluss gezogen werden, dass der inhibitorische Effekt von Nitrit besonders dann effektiv ist, wenn gleichzeitig ein saurer pH-Wert vorliegt.

Dass die Ansäuerung ein weiterer wichtiger Faktor ist, der das Überleben von pathogenen Bakterien hemmt, wurde ebenfalls in diesem Projekt gezeigt. In Challengeversuchen in kurzgereifter streichfähiger Rohwurst war *S. typhimurium* in Produkten, die ohne den Zusatz von Nitritpökelsalz hergestellt wurden, in der Lage, sich während der ersten Reifetage zu vermehren. Jedoch konnte auch in diesen Produkten ab Reifetag 3 keine Vermehrung von *S. typhimurium* mehr beobachtet werden. Innerhalb der ersten Reifetage des Produkts kommt es zu einer Ansäuerung durch die Aktivität der Starterkulturen. Diese Beobachtung wurde durch Transkriptionsanalysen weiter bestärkt. Weitere Ergebnisse aus

Challengeversuchen in Rohwurst zeigten, dass Nitrit vor allem in den ersten Reifetagen das Wachstum der Pathogene hemmte, eine Beobachtung die ebenfalls durch Ergebnisse aus globalen Transkriptionsstudien belegt werden kann. In einem rohwurstähnlichen Medium, welches Reifetag 0 (RTO) bzw. Reifetag 3 (RT3) Bedingungen simuliert, bewirkte die Anwesenheit von Natriumnitrit (150 mg/l (RTO) bzw. 30 mg/l (RT3)) nur in RTO-Medium eine Veränderung im Transkriptionsprofil. Auch die Analysen für EHEC deuten darauf hin, dass eine Vermehrung dieses Keims in Gegenwart von Nitrit gehemmt ist.

Für die fleischverarbeitende Industrie sind diese Ergebnisse von großem Nutzen. Die Daten zeigen, dass es sich bei einer Kombination von Ansäuerung und Gegenwart von Nitrit um effektive Hürden während des Rohwurstreifungsprozess handelt. Eine schnellere Ansäuerung könnte eine Reduktion der Menge an eingesetztem Nitrit bei gleichzeitiger Gewährleistung der mikrobiologischen Sicherheit erlauben.

Diese Erkenntnisse sind besonders dann von Bedeutung, wenn Rohwurstprodukte unter ökologischen Gesichtspunkten hergestellt werden, bei denen anstelle von Nitrat- oder Nitritpökelsalz Pflanzenextrakte eingesetzt werden sollen. Im Rahmen dieses Projektes wurden sechs Pflanzenextrakte hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung auf das Wachstum von *S. typhimurium* und EHEC in vitro untersucht. Nur zwei der Extrakte, einer auf Selleriebasis und ein Chili-Aufguss, führten in vitro zu einer Verminderung der maximal erreichten Zellzahl in den Kulturen. Zur Bewertung der sensorischen Eigenschaften wurden langgereifte schnittfeste Rohwürste mit Sellerie-, Melisse- und Brennesselextrakt hergestellt. Dabei erreichten die mit Sellerieextrakt hergestellten Produkte die höchste Akzeptanz durch die Vertreter des Projektbegleitenden Ausschusses. Auch wurden in den mit Sellerieextrakt hergestellten Würsten schnellere Keimreduktionen für Salmonellen und EHEC erreicht als in den Produkten mit einem Zusatz von 150 mg Nitrat/kg Rohwurst. Globale Transkriptionsanalysen, die in RTO-Medium in Anwesenheit von Sellerieextrakt (10 g/l, enthält 70 mg/l Nitrat) oder Kaliumnitrat (70 mg/l) durchgeführt wurden, gaben keine Hinweise darauf, dass neben dem im Extrakt enthaltenen Nitrat noch weitere Substanzen des Sellerieextraktes einen Einfluss auf die Transkription von *S. typhimurium* haben. Diese Daten deuten darauf hin, dass das im Extrakt enthaltene Nitrat der Hemmstoff ist. Da die

Würste mit Pflanzenextrakten eine Anfangsnitratkonzentration von etwa 80 mg Nitrat/kg Brät aufwiesen, dokumentieren die Resultate der Challengeversuche mit Pflanzenextrakten, dass höhere Nitratkonzentrationen die mikrobiologische Sicherheit nicht zwangsläufig erhöhen, sondern diese sogar minimieren können.

Nach dem bisherigen Stand der Forschung werden selten EHEC- bzw. Salmonellenisolate aus Lebensmitteln isoliert, die genetisch mit Ausbruchsisolaten übereinstimmen. In den in diesem Projekt durchgeführten Challengeexperimenten mit vier verschiedenen Rohwürsten mit EHEC geben Hinweise auf eine bessere Überlebensfähigkeit des Lebensmittelisolats in allen Rohwurstprodukten. Bei den Salmonellenstämmen ließ sich eine verminderte Rekultivierbarkeit des Ausbruchsisolat gegenüber dem Lebensmittel- und Umweltisolat erkennen. Bei den Pflanzenextraktversuchen war bei den Salmonellen das Ausbruchsisolat am häufigsten an den verschiedenen Probenziehungstagen aus den Würsten rekultivierbar, während bei EHEC das Lebensmittelisolat die Population bis zum Ende der Reifung dominierte.

Auf Grundlage der in diesem Projekt erarbeiteten Daten sollte auf eine Zugabe von Nitrit bzw. in lang gereiften Produkten von Nitrat zu Rohwurstprodukten zur Gewährleistung der Lebensmittelsicherheit nicht verzichtet werden. Ohne Nitrit besteht vor allem in kurz gereifter, streichfähiger Rohwurst die Gefahr, dass Pathogene, wie Salmonellen oder EHEC, nicht inhibiert werden und sich sogar in den ersten Reifetagen vermehren können. Auch wenn letztendlich noch nicht geklärt ist, welche Nitrit- bzw. Nitratabbauprodukte keimhemmend auf die Bakterien wirken, belegen die Ergebnisse sehr deutlich die Notwendigkeit dieses traditionellen Zusatzstoffes als Teil der Hürdentechnologie in Rohwurst. Allerdings sollte der Zusatz gezielt und nicht mit den zugelassenen Höchstmengen erfolgen. Die nach der EU-Verordnung 1333/2008 (incl. Änderungsverordnung) zugelassenen Höchstmengen von Nitrit/Nitrat für Rohwurstzeugnisse liegen vor allem für Nitrat weit über der mikrobiologisch sinnvollen bzw. wirksamen Konzentration.

Herstellern, die Zusatzstoff-reduzierte Rohwürste produzieren, also den Zusatz von Nitrit/Nitrat verringern wollen, wird der Einsatz von schnell säuernden Starterkulturen empfohlen, da eine schnelle Ansäuerung die Wirkung von Nitrit/Nitrat in den kritischen ersten Reifetagen

verbessert und damit auch die Sicherheit der Rohwurstprodukte erhöht. Damit können auch, wie die Ergebnisse dieses Projektes auch zeigen, alternative Zusatzstoffe mit einem niedrigen Nitratgehalt von 80 mg Nitrat für die Herstellung von sicheren Rohwürsten verwendet werden.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Ergebnisse können die Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit vor allem von fleischverarbeitenden Betrieben erhöhen. Diese Sparte der Lebensmittelindustrie ist durch eine hohe Anzahl kleiner und mittelständischer Unternehmen geprägt: Sie erwirtschaftet jährlich einen Nettoumsatz von über 16 Mrd. €. Dabei werden jährlich etwa 400.000 Tonnen Rohwurst mit einem Wert von über 2 Mrd. € hergestellt; der Anteil der Rohwurstproduktion beträgt somit etwa ein Drittel der Gesamtproduktion von Wursterzeugnissen. Die Kosten der Herstellung stiegen dabei mehr als der Preis je Kilogramm Rohwurst, was den starken Wettbewerb und Preisdruck in diesem Lebensmittelsektor verdeutlicht.

Erschwerend für die Branche ist auch, dass Rohwürste häufig als „Risikoprodukte“ genannt werden, weil sie sporadisch in Zusammenhang mit EHEC- bzw. Salmonellen-bedingten Krankheitsausbrüchen in Zusammenhang gebracht wurden. Schon der qualitative Nachweis von EHEC oder *Salmonella* spp. in einem Rohwurstprodukt führt zur Rücknahme der betroffenen Chargen. Welche wirtschaftlichen Folgen solche Rückrufaktionen haben, lässt sich nur schwer abschätzen. Die Verbraucher reagieren sehr sensibel auf tatsächliche oder vermeintliche Lebensmittelskandale und unterscheiden bei den betroffenen Produkten nicht zwischen den einzelnen Herstellern. Daher reagieren Handelsunternehmen und Discount-Ketten meist schnell auf entsprechende Pressemeldungen und entfernen betroffene bzw. in Verruf geratene Produkte aus ihrem Sortiment, unabhängig davon, ob eine Rückrufaktion bzw. Pressemeldung gerechtfertigt war. Solche Krisen können gerade für kleine und mittlere Betriebe, die Rohwürste produzieren, existenzbedrohend sein. Daher ist es für die Qualitätskontrolle der Betriebe, aber auch für Überwachungsbehörden von entscheidender Bedeutung, Kenntnisse über das Überleben von Pathogenen im Produkt zu haben.

Auch wenn die Verwendung von Zusatzstoffen bei der modernen Lebensmittelherstellung von vielen Verbrauchern in zunehmendem Maße kri-

tisch gesehen oder abgelehnt wird, sollte auf deren Einsatz in Hinblick auf die Sicherheit der Produkte nicht verzichtet werden. Dennoch geben die Ergebnisse dieses Projektes wichtige Hinweise für Rohwurstproduzenten, die Modifikationen in der Herstellungstechnologie ihrer Erzeugnisse, wie zum Beispiel den Einsatz von Pflanzenextrakten als Nitritersatzstoffe, beachtlichen.

Die Forschungsergebnisse sind darüber hinaus aber auch branchenübergreifend für alle Unternehmen nutzbar, die sich mit Pflanzenextrakten als Nitritersatzstoff im Rahmen der Herstellung von Lebensmitteln bzw. dem Nachweis von Lebensmittelinfektionserregern in Lebensmitteln und Kostensenkungspotenzialen in fleischverarbeitenden Betrieben befassen.

Die Ergebnisse über die Wirkung von Pflanzenextrakten auf die wichtigsten Gram-negativen Lebensmittelinfektionserreger können unmittelbar und langfristig bei der Produktion von sicheren Rohwürsten eingesetzt werden. Die mit der Umsetzung der Ergebnisse verbundenen Kosten sind niedrig bzw. dürften nicht die für eine Produktentwicklung üblichen Kosten übersteigen. Durch die Bereitstellung und den Transfer der Ergebnisse können die Unternehmen mittel- und langfristig die Herstellungstechnologie von Rohwürsten optimieren und den speziellen Bedürfnissen anpassen. Die Forschungsergebnisse können den Betrieben auch helfen, mit nitrat- bzw. nitritreduzierten Produkten neue Verbrauchergruppen anzusprechen. Das Wissen, wann und inwieweit der Nitrit- bzw. Nitratgehalt in den Produkten reduziert bzw. verzichtet werden kann, ist dabei von entscheidender Bedeutung.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2014.
2. Mühlig, A., Kabisch, J., Pichner, R., Scherer, S. und Müller-Herbst S.: Contribution of the NO-detoxifying enzymes HmpA, NorV and NrfA to nitrosative stress protection of *Salmonella typhimurium* in raw sausages. Food Microbiol. 42, 26-33 (2014).
3. Mühlig, A., Behr, J., Scherer, S. und Müller-Herbst, S.: Stress response of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* to acidified nitrite. Appl. Environ. Microbiol. 80 (20), 6373-82 (2014).

Der Schlussbericht ist für die interessierte Öffentlichkeit bei den Forschungsstellen abzurufen.

Weiteres Informationsmaterial:

Max-Rubner-Institut (MRI)
Bundesforschungsinstitut für Ernährung
und Lebensmittel
Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie
E.-C.-Baumann-Straße 20, 95326 Kulmbach
Tel.: +49 9221 803-220
Fax: +49 9221 803-331
E-Mail: rohtraud.pichner@mri.bund.de

Technische Universität München
Zentralinstitut für Ernährung und Lebensmittel-
forschung
Abt. Mikrobiologie
Weihenstephaner Berg 3, 85345 Freising
Tel.: +49 8161 71-3851
Fax: +49 8161 71-4512
E-Mail: siegfried.scherer@wzw.tum.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 9079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via:



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.