



ISI FOOD PROTECTION

CENTRE OF EXPERTISE FOR
APPLIED FOOD MICROBIOLOGY

Prüfbericht:

Challengestudie in Rohwürsten zur Dokumentation der Wirksamkeit einer Schutzkultur gegen Listerien

21.06.2017

Prof. Dr. Dieter Elsser-Gravesen

ISI FOOD PROTECTION ApS
Agro Food Park 13
DK-8200 Aarhus N
cvr 3266664

ZIELSTELLUNG & TEST - DESIGN :

Der Einsatz von Schutzkulturen in Rohwurst-Erzeugnissen gegen Listerien hat sich heute am Markt fest etabliert. Für diesen Applikationsbereich werden verschiedene Kulturenkombinationen angeboten, die sich jedoch in ihrer Wirksamkeit gegen Listerien teilweise deutlich unterscheiden.

Ziel dieser Studie sollte sein, für eine Standardrezeptur die Wirksamkeit einer anti-listeriellen Kultur unter Praxisbedingungen in Übereinstimmung mit den EU-Standards (Technische Leitlinien-Dokumente) zu dokumentieren.

Hierzu wurden folgende Kulturen einsprechend der Kundenspezifikationen eingesetzt:

- Schutzkultur: **M-CULTURE Safe 3100 SSL** (interne Probennummer: NG-578)
- Starterkultur: **M-CULTURE SA 28-100** (interne Probennummer: NG-580)

Für die Challengestudien wurden Listerien-Isolate aus Rohwürsten sowie ein klinisches Isolat verwendet:

- L. monocytogenes* ISI 20, ISI 21 und ISI 22 (Isolate aus Fleischerzeugnissen)
- L. monocytogenes* ISI 26 (ATCC-Stamm, klinisches Isolat)

Die Listerien wurden wie folgt kaltadaptiert:

Die vier Stämme wurden getrennt vorbereitet, in dem diese zweimal subkultiviert wurden (in BHI Medium, über Nacht bei 37°C; anschließend wurde diese Kultur 1000-fach in BHI-Medium verdünnt und für die notwendige Kaltadaption bei 8°C für 5 Tage kultiviert). Folgend wurden die kaltadaptierten Kulturen in steriler Verdünnungs-lösung suspendiert und zur Keimdichtenbestimmung ausplattiert. Die Kulturen wurden über Nacht bei 8°C gelagert, bevor das Inokulum zur Kontamination der Proben mit einer theoretischen Keimdichte von 10⁴ KBE/ml zubereitet wurde.

Die Listeriendichten wurden zu Anfang (t_0 = Wiederfindung im Brät), nach 24h Stunden Reifungszeit (kritische Phase = lag-Phase) sowie nach fünf Tagen bestimmt. Die Untersuchungen wurden wie in den technischen Leitlinien gefordert als Dreifach-Ansatz durchgeführt. Als Referenz wurde eine Rohwurst ohne die Schutzkulturzugabe eingesetzt. Die Herstellung und Reifung erfolgt unter praxisgerechten Bedingungen. Die Reifungsparameter, die Rezeptur sowie die Dosierung der Reifungs- und Schutzkultur wurden von MEAT CRACKS vorgegeben (Reife-programm „langsamsäuernd“).

Herstellung der Rohwürste

Gefrorenes Fleischmaterial (Schweineschulter, 21%; Schweinerückenspeck, 23%) wurde mit den von MEAT CRACKS zur Verfügung gestellten Gewürzzusätzen sowie mit den Kulturen auf Körnung gekuttert (3 mm). Folgend wurde der Frischfleischanteil (Schweineschulter, schier, 3 mm; 56%) eingekuttert, zum Ende des Kutterungsprozesses wurde das Salz zugegeben.

Das Brät wurde in Faserdärme mit dem Kaliber 45 mm gefüllt und die Fermentation entsprechend des MC Reifeprogrammes in einem Rohwurst-Reifeschrank durchgeführt.

Mikrobiologische Analysen-Methoden

- Quantitativer Nachweis von *Listeria monocytogenes in situ*
ISO 11290-2:1998 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method with amendment ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004 Modification on the enumeration media. ALOA agar. Duplicate plating per sample as specified in ISO 7218:2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.
Nachweis-Grenze: 5 KBE/g

Ergänzend für Tag 5:

- Qualitativer Nachweis von *Listeria monocytogenes in situ* in 25 g nach ISO 11290-1

Begleitende Untersuchungen:

- Bestimmung pH-Wert zur Kontrolle Reifungsverlauf
- Bestimmung Wasseraktivitäten (a_w -Werte)
- Bestimmung Gewichtsverlust

Untersuchungszeitpunkte und Anzahl der Versuchsansätze*

	Tag 0 Wiederfindung	24 h	5 Tage
Rohwurst mit Schutzkultur	2	3	3
Muster ohne Schutzkultur	2	3	3
Gesamt	4	6	6

*Bestimmung der Listeriendichten im Doppelansatz

■ REF-DOKUMENTE

[1] Technical Guidance Document on shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. CRL for *Listeria monocytogenes* (Community Reference Laboratory), 14/11/2008.

[2] SANCO/1628/2008 ver. 9.3 (26112008) Guidance Document on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat foods, under Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs



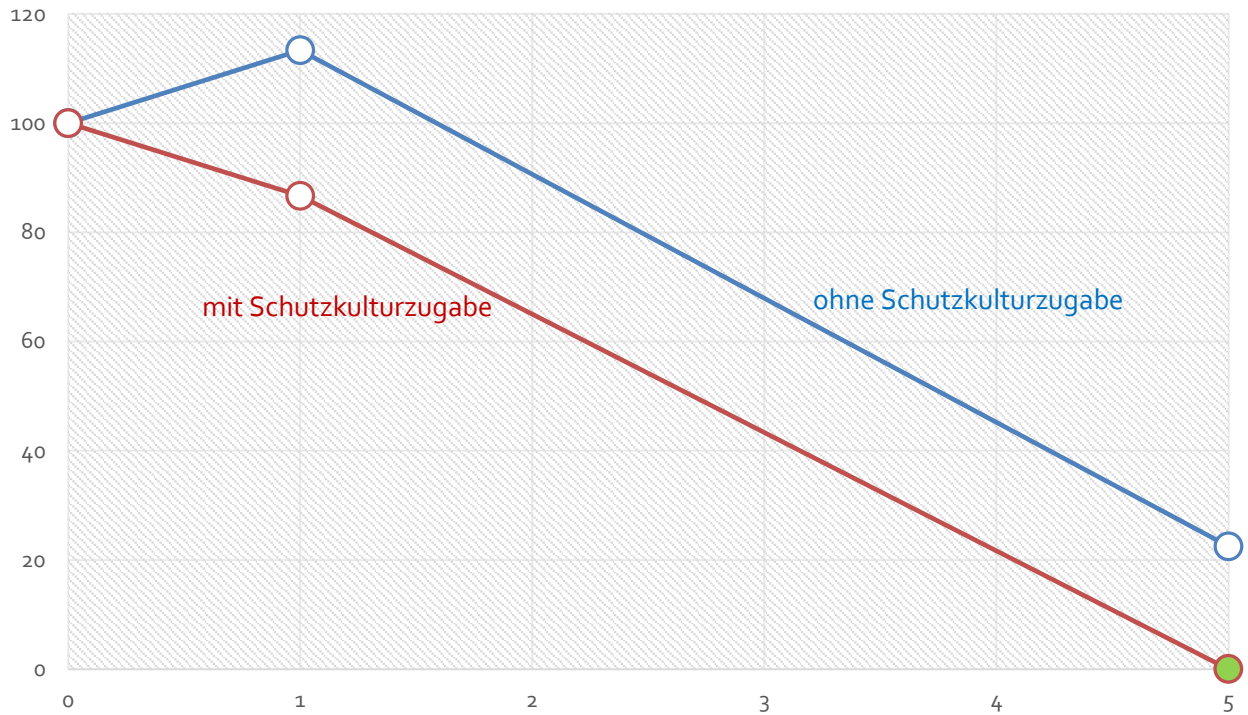


Abbildung: Listeriendichten [KbE/g] während der Reifung über einen Zeitraum von 5 Tagen

● Nach 5 Tagen Reifung waren in allen Proben (2 x 3), die mit der Schutzkultur behandelt wurden, in 25 g keine Listerien mehr nachweisbar

Erläuterungen zu den Ergebnissen:

Der Einsatz der Schutzkultur hatte zwei merkliche Auswirkungen, die sich **positiv auf die Produktsicherheit auswirken**:

1: Zum einen wurde in der kritischen lag-Phase (bevor es zu einer Listerien-hemmenden Wirkung durch die Absäuerung und durch den Gewichtsverlust und somit zu einer a_w -Wert-Absenkung kommt) bereits die Listeriendichten reduziert. Dahingegen kam es in den Proben ohne Schutzkultur zu einem leichten Anstieg der Listerien-Dichten (siehe Untersuchungszeitpunkt Tag 1).

2: Von größerer Relevanz hinsichtlich der Produktsicherheit ist, dass am Ende der Reifungsphase in allen Proben ohne Schutzkulturen Listerien in geringen Dichten nachweisbar waren, während in den Proben mit Schutzkultur keine Listerien (nach Anreicherung von 25g) nachgewiesen werden konnten (siehe Untersuchungszeitpunkt Tag 5).



1. Keimdichten Listerien

<i>L. monocytogenes</i> KbE/g	Muster	WH	Tag 0	Tag 1	Tag 5
			18.05.17	19.05.17	23.05.17
Salami ohne Schutzkultur	T ₀	a	1.30E+02		
		b	1.10E+02		
	1	a		1.40E+02	
		b		1.20E+02	
	2	a		1.00E+02	
		b		1.20E+02	
	3	a		1.20E+02	
		b		8.00E+01	
	4	a			6.00E+01
		b			<10
	5	a			<10
		b			<10
	6	a			1.00E+01
		b			5.00E+01

<i>L. monocytogenes</i> KbE/g	Muster	WH	Tag 0	Tag 1	Tag 5
			18.05.17	19.05.17	23.05.17
Salami mit Schutzkultur	T ₀	a	6.00E+01		
		b	1.00E+02		
	1	a		1.40E+02	
		b		1.00E+01	
	2	a		8.00E+01	
		b		6.00E+01	
	3	a		9.00E+01	
		b		1.40E+02	
	4	a			n.n. in 25 g
		b			n.n. in 25 g
	5	a			n.n. in 25 g
		b			n.n. in 25 g
	6	a			n.n. in 25 g
		b			n.n. in 25 g



Gewichtsverlust:

			Tag 0	Tag 1 (24h)	Tag 5		
			18.05.17	19.05.17	23.05.17		
Gewicht [g]	Salami ohne Schutzkultur	1	239.3	236.93			
		2	220.7	218.98			
		3	247.5	244.05			
		4	228.6	244.57	179.51		
		5	249.1	246.33	192.50		
		6	240.1	238.92	189.12		
	Salami mit Schutzkultur	9	247.6	244.70			
		10	253.7	249.30			
		12	241.1	236.27			
		13	282.1	279.35	225.22		
		14	233.6	232.21	187.74		
		15	214.4	212.23	168.28		
		Gewichtsverlust [%]	Salami ohne Schutzkultur	1		1%	
				2		1%	
				3		1%	
4					21%		
5					23%		
6					21%		
Salami mit Schutzkultur	9			1%			
	10			2%			
	12			2%			
	13				20%		
	14				20%		
	15				22%		



pH-Wert:

pH	Muster	Tag 0	Tag 1	Tag 5
		18.05.17	19.05.17	23.05.17
Salami ohne Schutzkultur	T ₀	5.62		
	1		5,63	
	4			5,05
Salami mit Schutzkultur	T ₀	5.61		
	1		5,58	
	4			5,03

a_w-Wert:

a _w	Muster	Tag 0	Tag 1	Tag 5
		18.05.17	19.05.17	23.05.17
Salami ohne Schutzkultur	T ₀	0.92		
	1		0,93	
	4			0,92
Salami mit Schutzkultur	T ₀	0.93		
	1		0,93	
	4			0,93



ISI fast facts:

Das Unternehmen ISI Food Protection ApS wurde Ende 2009 aus der Motivation heraus gegründet, Produzenten von Lebensmitteln und Lebensmittelzusätzen eine unabhängige und kompetente Hilfestellung für die Herstellung von sicheren und haltbaren Erzeugnissen anbieten zu können.

Heute ist das Unternehmen im Bereich der angewandtem Lebensmittel- und Pflanzenmikrobiologie hoch spezialisiert:

- Expertise im allen relevanten mikrobiologischen Bereichen von der Primärproduktion bis zum verzehrfertigen Erzeugnis
- L3* klassifizierte Labore sowie ein L3* klassifiziertes Technikum
- Lebensmittelbranchen-übergreifendes und internationales Kundenportfolio
- Nach ISO 17025 akkreditiert
- Umfangreiche Stammsammlung von Lebensmittel-verderbenden und pathogenen Mikroorganismen (wie *Salmonella*, *E. coli* O157, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*); Zulassung zum Arbeiten mit *C. botulinum*

Aarhus, den 21.06.2017



Prof. Dr. Dieter Elsser-Gravesen

MANAGING DIRECTOR ISI FOOD PROTECTION
AFFILIATE ASSOCIATE PROFESSOR IN FOOD MICROBIOLOGY AARHUS UNIVERSITY

