

Arch Lebensmittelhyg 64,
168–174 (2013)
DOI 10.2376/0003-925X-64-168

© M. & H. Schaper GmbH & Co.
ISSN 0003-925X

Korrespondenzadresse:
kuehnast@vetmed.uni-leipzig.de

Institut für Lebensmittelhygiene, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig,
An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Deutschland

„Evaluierung der antimikrobiellen Wirkung von Pflanzenextrakten auf *Listeria monocytogenes* in Weichkäse“

„Evaluation of antimicrobial activities of plant extracts on *Listeria monocytogenes*
in manufactured red smear-ripened cheese“

Karin Kühnast, Peggy G. Braun

Zusammenfassung

Der antimikrobielle Effekt von Pflanzenextrakten aus Hopfen (*Humulus lupulus*) und Rooibos (*Aspalathus linearis*) auf *Listeria monocytogenes* auf Weichkäse Limburger Art wurde während einer 24-tägigen Reifung evaluiert.

Die in Höhe von 10^2 – 10^3 *Listeria*/g Käse künstlich kontaminierte Oberfläche wurde beginnend am Tag nach dem Salzbad und dann täglich mit hopfenextrakthaltiger (30 µg/ml Schmierlösung bzw. 30 µg/g Käse) und rooibosextrakthaltigen Lösung (0,5 g/100 g Käse) bestrichen bzw. geschmiert. Die Probenahmen erfolgten am Tag 1, 2, 3, 7, 10, 17 und 24, um die *Listeria*-Zahl zu bestimmen. Zusätzlich wurde der Einfluss der Pflanzenextrakte auf den pH-Wert, den Reifungsverlauf sowie die sensorischen Eigenschaften der Käse geprüft.

Wurde der Extrakt aus Hopfen direkt auf den Käse aufgetragen, war eine signifikante Wachstumshemmung von *Listeria monocytogenes* festzustellen, während er als Zugabe in der Schmierlösung wirkungslos blieb. Rooibosextrakt zeigte keinen hemmenden Effekt auf *Listeria monocytogenes*. Beide Pflanzenextrakte beeinflussten leicht die sensorischen Eigenschaften der Käse, die Käsereifung nicht.

Schlüsselwörter: Hopfen, Rooibos, *Listeria monocytogenes*, Käsereifung, Sensorik

Summary

The antimicrobial effect of extracts of hop (*Humulus lupulus*) and rooibos (*Aspalathus linearis*) on *Listeria monocytogenes* in manufactured red smear-ripened cheese over a period of 24 days was evaluated.

The surface of the cheeses was contaminated with 2–3 log *Listeria monocytogenes*/g cheese. Initiating with the brine bath the cheeses were daily smeared with a solution containing hop (30 µg/ml smear solution or 30 µg/g cheese) or rooibos (0.5 g/100g cheese). During cheese ripening the growth of *Listeria monocytogenes* was monitored at day 1, 2, 3, 7, 10, 17 und 24 after brine bath. Additional the influence on pH, cheese maturation including the organoleptic quality was evaluated.

Hop extract, directly smeared on the surface of the cheese, showed a statistically significant antimicrobial activity on *Listeria monocytogenes*, whereas the extract as additive in the smear solution was ineffective. Rooibos extract had no antilisterial effect. Both extracts had a slight impact on the organoleptic quality but the maturation was unaffected.

Keywords: hop, rooibos, *Listeria monocytogenes*, cheese ripening, organoleptic quality

Einleitung

Im Zusammenhang mit *Listeria monocytogenes*-Infektionen des Menschen durch den Verzehr von Lebensmitteln wurden Weichkäse bereits häufiger als Auslöser bekannt (Robert Koch Institut, 2010; Becker und Holzapfel, 2000). Ein Ansatzpunkt zur Zurückdrängung von Zoonoseerregern in Lebensmitteln ist, neben der strikten Einhaltung der guten Herstellungspraxis, der Zusatz von Pflanzenextrakten mit antibakterieller Aktivität.

Der südafrikanische Rooibos wird aufgrund seiner gesundheitsfördernden Eigenschaften als koffeinfreier und tanninarmer Kräutertee weltweit getrunken. Als wirksame Bestandteile wurden die Dihydrochalcone Aspalathin und Nothofagin sowie die Flavonoide Luteolin, Orientin, Isoorientin, Vitexin, Isovitexin, Rutin, Quercetin und Isoquercetin vor allem als Antioxidativum bei kardiovaskulären, tumorösen und allergischen Erkrankungen bestätigt (Wang und Mazza, 2002; Joubert und de Beer, 2011).

Verschiedene *In-vitro*-Studien belegen, dass der unfermentierte aspalathinreiche Extrakt wachstumshemmende Effekte auf *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus mutans*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Aspergillus niger* zeigt (Grüner-Richter et al., 2008; Almajano et al., 2008; Coetzee et al., 2008). Der fermentierte aspalathinarme Rooibosextrakt erwies sich in *In-vitro*-Studien ebenfalls wirksam auf *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus mutans* und *Saccharomyces cerevisiae* (Schepers, 2001; Sandasi et al., 2010). Eigene Ergebnisse zur Wirkung eines fermentierten Rooibosextraktes in *In-vitro*-Kultur konnten nach einmaliger Zugabe (Konzentration: 5 mg/ml) bei einer Ausgangskeimzahl von 10^2 – 10^3 KbE/ml einen bakteriostatischen Effekt auf *Listeria monocytogenes* über 14 Tage bei 10 °C belegen. Der Extrakt hatte keine darstellbare antibakterielle Wirkung auf die getesteten Milchsäurebildner, *Bacillus* spp., *Brochothrix* spp., *Pseudomonas fluorescens* und *Salmonella Enteritidis* (Kuehnast und Braun, 2013a). Zur antimikrobiellen Wirkung von Rooibosextrakten nach Zusatz zum Lebensmittel liegen bisher keine Daten vor.

Hopfen (*Humulus lupulus*), eine auf der Nordhalbkugel seit dem Mittelalter kultivierte Kletterpflanze, besitzt als antibakterielle Bestandteile α - und β -Säuren (Humulon und Lupulon) sowie deren Derivate. Die Hopfensäuren sind gut verträglich und zeigen eine hohe Bioverfügbarkeit (Hanske et al., 2005). Die antibakterielle Wirkung der Hopfenbestandteile richtet sich vor allem auf grampositive Mikroorganismen (Shimwell, 1937; Lewis et al., 1949). Neuere Ergebnisse belegen allerdings auch antibakterielle Effekte auf den gramnegativen *Helicobacter pylori* (Ohsugi, 1997). Hopfen stabilisiert den Bierbrauprozess durch seine hemmende Wirkung auf *Lactobacillen* (Haas und Barsoumian, 1994). Hansen (1947) konnte antibakterielle Effekte der Hopfenbestandteile auf *Staphylococcus aureus*, *Bacillus mesentericus* und *Bacillus subtilis* nachweisen. Keinerlei Hemmeffekte konnte Gerhauser (2005) in Versuchen mit Hefen und *E. coli* feststellen. Eigene *In-vitro*-Studien bewiesen nach einmaliger Zugabe eines Extraktes aus Hopfen (Konzentration: 30 μ g/ml) eine antibakterielle Wirkung auf Milchsäurebildner und *Brochothrix* spp. sowohl bei 10 °C als auch bei 25 °C über 28 Tage. Bei *Listeria monocytogenes* war bei 10 °C eine verlängerte lag-Phase mit anschließendem bakteriostatischem Effekt

nachweislich. Auf gramnegative Teststämme (*Pseudomonas fluorescens* und *Salmonella Enteritidis*) hatte dieser Extrakt keine Wirkung (Kuehnast und Braun, 2013b).

Larson (1996) verglich die Effekte verschiedener Extrakte aus Hopfen auf *Listeria monocytogenes* (Konzentration: 10^3 – 10^5 KbE/g bzw. ml) in Nährbouillon und in Weißkrautsalat, Milch, Cottage Cheese und Camembert. In Nährbouillon war im Vergleich zum Lebensmittel deutlich weniger Hopfenextrakt für eine vergleichbare antibakterielle Wirkung erforderlich. Die antilisterielle Wirkung ließ nach 14 Tagen Lagerung nach, was mit einer Resistenzbildung erläutert wurde. Shen (2009) untersuchte die Wirkung der Hopfensäuren auf *Listeria monocytogenes* (Ausgangskonzentration: 10^2 KbE/cm²) auf der Oberfläche von „Frankfurter Würstchen“. Bei Lagerungsversuchen konnte eine Reduktion von 1,3–1,6 log-Stufen dargestellt werden. Eine vollständige Inaktivierung der Testkeime wurde nicht erreicht. Qualitätseinschränkungen durch den Zusatz in Lebensmitteln aufgrund veränderter Sensorik bzw. ökonomischer Gesichtspunkte führten zu festgelegten Höchstmengen. 2001 bestätigten die U.S. Food and Drug Administration und das U.S. Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service (FSIS) die β -Hopfensäuren (Lupulon, Colupulon, Adlupulon) in einer Konzentration von 4,0 mg/kg als antimikrobielles Agens für gekochtes Fleisch und in einer Konzentration von 5,0 mg/kg als antimikrobieller Verpackungszusatz für Fleischprodukte (U.S. Department of Agriculture, 2012).

Ziel dieser Arbeit ist eine vergleichende Darstellung der antimikrobiellen Wirkung von Pflanzenextrakten (Rooibos und Hopfen) auf *Listeria monocytogenes* während der Reifung eines Weichkäses. Eine mögliche Anwendbarkeit in Weichkäse soll sowohl in Hinsicht auf Produktreifung, sensorische Qualität als auch auf eine mögliche Reduktion des Zoonoserisikos validiert werden.

Material und Methoden

Mikroorganismen

Zur Untersuchung wurde der *Listeria monocytogenes*-Stamm Li 589, Serovar 2c, vom Max-Rubner-Institut Kulmbach, isoliert aus Lebensmitteln, herangezogen. Der Bakterienstamm wurde bis zur Untersuchung bei –86 °C gelagert.

Zur Reaktivierung wurde *Listeria monocytogenes* in Nährbouillon (SIFIN TN 1172) überführt und 24 Stunden bei 37 °C bebrütet, auf Columbia-Agar mit Schafblut^{Plus} (5 %) (Oxoid Art.-Nr.: PB5039A) überimpft und wiederum 24 Stunden bei 37 °C aerob inkubiert, um ausreichend Koloniematerial zu erhalten. Für die weitere Verwendung wurde alle vier Wochen eine gut entwickelte Einzelkolonie passagiert.

Pflanzenextrakte (PE)

Die Pflanzenextrakte wurden von der Adalbert-Raps Lebensmittelforschung gem. GmbH Kulmbach zur Verfügung gestellt.

Der fermentierte und getrocknete Extrakt aus Rooibos (RE) wurde mittels eines ethanolisch-wässrigen Extraktionsverfahrens (80:20) bei Raumtemperatur für 1,5 bis 3 Stunden mit einem nachgeschalteten Ethylacetat-Waschschritt zur Entfernung des Chlorophylls gewonnen. Der Aspalathingehalt beträgt 15–20 % und der Anteil der Gesamtphenole mindestens 40 %.

Die Stammlösung des RE wurde durch Lösen des Pulvers in destilliertem Wasser hergestellt und in einer Konzentration von 0,5 g/100 g mit Hilfe eines sterilen Glaspatels auf dem Käse verteilt.

Der zähflüssige Extrakt aus Hopfen (HE) wurde mittels CO_2 -Extraktion gewonnen. Die Hauptbestandteile sind β -Säuren (40 %) und Kaliumsalze, welche in Propylenglykol gelöst vorliegen. Der Gehalt an Propylenglykol beträgt 27 % $\pm$ 8 %. Aus dem Hopfenpflanzenextrakt wurde eine HE-Stammlösung mit einer Konzentration von 3 mg/ml, gelöst in einer sterilen Natriumchloridlösung, hergestellt. Während des Versuchsablaufs wurde sie in einer Konzentration von 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zur Schmiere gegeben bzw. in 30 $\mu\text{g}/\text{g}$ auf den Käse aufgetragen.

Käsen

Für die Versuche wurden je Durchgang 15 oberflächen-gereifte Weichkäse nach Art eines Rotschmirekases im Labormaßstab aus pasteurisierter Kuhvollmilch mit 3,5 % Fett hergestellt. Die Produktionsbedingungen wurden soweit wie möglich der industriellen Käsefertigung angepasst. Als Säuerungskulturen wurden CHOOZITTM MM100 LYO der Firma DANISCO eingesetzt (0,03 g/l, bis pH 6,4 erreicht). Des Weiteren wurden Calciumchlorid (34 %ig, 0,25 ml/l) sowie zum Einlaben Kälberlab (Naturlab 1:15000, Chymosin über 80 %, Fa. Hunsbichler GmbH, 0,24 ml/l) zugesetzt. Das Schneiden und Verziehen des dikgelegten Bruches erfolgte 60 $\pm$ 5 Minuten nach Zugabe der Kälberlabs. Im Anschluss wurde die Molke abgeführt und der Bruch in gelochte Kunststoffformen ($\varnothing$ 8,5 cm) abgefüllt. Bei Raumtemperatur (22–24 °C) tropfte der Bruch ab und wurde dabei zum Ausformen 3x gewendet. Die Käse wurden im Anschluss im Klimaschrank (Binder KBF 240) bei 15 °C und 90 % relativer Luftfeuchte auf einem gelochten Kunststoffbrett 12 Tage gelagert. Am Tag 2 wurden die Kunststoffformen entfernt und die Käserohlinge kamen 30 Minuten in ein Salzbad (16 % NaCl, 15 °C, pH 4,8–5,0). Ab Tag 3 (Start der Challengeversuche) wurden sie täglich mit 2,5 ml Rotschmirekultur (CHOOZITTM PLA LYO Ripening Mix, Firma DANISCO + 3,5 % NaCl) je Seite geschmiert und gewendet. Nach 12 Tagen wurden die Käse in Pergamentpapier (Pely FRESH) und Aluminiumfolie einzeln verpackt und bei 8–10 °C weitere 14 Tage zur Weiterreife aufbewahrt. Die Käserohlinge hatten ein Gewicht zwischen 176 g und 221 g (Größe ca. 8,5 x 3 cm) zu Herstellungsbeginn, am Ende der Lagerung zwischen 168 g und 191 g (Größe ca. 8,0 x 2,7 cm).

Versuchsablauf Challengeversuche

Die Challengeversuche mit *Listeria monocytogenes* und Zugabe der Pflanzenextrakte zum Käse begannen ab Tag 3 des KäSENS mit dem Schmieren.

Challengeversuch 1 wurde 3x, Challengeversuch 2 5x und Challengeversuch 3 3x durchgeführt.

Eine gut entwickelte Einzelkolonie des *Listeria monocytogenes*-Stammes wurde in Nährbouillon (SIFIN TN 1172) verbracht und bei 37 °C 24 h bebrütet. Die Ausgangskeimzahl wurde durch eine Keimzählung mit Hilfe des Oberflächenverfahrens (Spatelverfahren) nach dem amtliche Untersuchungsverfahren § 64 LFGB bestimmt.

Um die Ausgangskeimzahl von circa 10^2 – 10^3 KbE/mg auf der Käseoberfläche zu erreichen, wurde eine Dezimalverdünnungsreihe in NaCl-Pepton (8,5 g NaCl, 1 g Pepton aus Casein gelöst in 1 l Aqua dest.) bis zu einer Ver-

dünnungskonzentration von 10^5 KbE/ml hergestellt. Aus dieser Verdünnungsstufe wurden jeweils 100 μl entnommen und davon je 50 μl auf die Ober- und Unterseite des Käses einmalig verteilt. Die erreichte Ausgangskonzentration im Käse wurde durch eine anschließende Probenahme (Käse 1) und quantitative Bestimmung der *Listeria monocytogenes* nach dem amtlichen Untersuchungsverfahren § 64 LFGB kontrolliert.

Challenge 1 (Hopfenextraktzugabe direkt in der Schmierelösung)

Für diese Versuchsdurchgänge wurde der HE ab Tag 3 des KäSENS in einer Konzentration von 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ direkt in die Schmierelösung eingebracht und täglich beim Schmieren des KäSENS beidseitig mit je 2,5 ml Schmiere durch eine Pipette auf 7 Käse aufgetragen. Die Flüssigkeit wurde mit einem rauen, nichtsaugenden Tuch in die Käseoberfläche eingerieben, und die Käse dabei gewendet. Parallel dienten 7 Käse als Kontrolle und wurden mit Schmierelösung ohne HE-Zusatz in gleicher Weise behandelt.

Challenge 2 (Hopfenextraktzugabe direkt auf die Käseoberfläche)

Hierfür wurden alle 14 Käse ab Tag 3 des KäSENS täglich beidseitig mit je 2,5 ml Schmierelösung mit einem rauen, nichtsaugenden Tuch eingerieben und gewendet. Im Anschluss daran wurde auf 7 Käse der flüssige HE täglich in einer Konzentration von 30 $\mu\text{g}/\text{g}$ Käse mittels einer Pipette aufgetragen und beidseits mit einem Glasspatel verteilt. Die restlichen 7 Käse (geschmiert, aber ohne Zugabe von HE) dienten als Kontrolle.

Challenge 3 (Rooiboszusatz direkt auf die Käseoberfläche)

Der RE-Extrakt wurde aufgrund der Ergebnisse der *In-vitro*-Versuche (Kuehnast und Braun, 2013a; Kuehnast und Braun, 2013b) bzw. nach Feststellen der Wirkungslosigkeit von HE in der Schmierelösung nur direkt auf die Käseoberfläche aufgetragen.

Für diesen Versuch wurden je 2,5 ml Schmierelösung ab Tag 3 des KäSENS täglich beidseits in die Käseoberfläche der 14 Käse mittels eines rauen, nichtsaugenden Lappens eingerieben. Anschließend wurde auf 7 Käse der RE täglich in einer Konzentration von 0,5 g/100 g Käse durch eine Pipette auf die Ober- und Unterseite der Käse aufgetragen und mit einem Glasspatel gleichmäßig verteilt. Gleichzeitig wurden die Käse gewendet. Die restlichen 7 Käse ohne RE-Behandlung dienten wiederum als Kontrolle.

Die weiteren Probennahmen erfolgten bei allen KäSEN am Tag 1, 2, 3, 7, 10 vor dem erneuten Aufbringen des PE sowie am Tag 17 und 24 der Lagerung. Dafür wurden jeweils ein Käse mit PE-Zusatz und ein Kontrollkäse herangezogen. Es wurde jeweils eine quantitative und qualitative Bestimmung von *Listeria monocytogenes* nach dem amtlichen Untersuchungsverfahren § 64 LFGB durchgeführt. Zur Bestätigung der Listerien wurde die Katalase-Reaktion (Bactident[®] Katalase, Fa. MERCK), der Beleuchtungstest nach Henry, die Gram-Färbung, der CAMP-Test (Columbia-Agar mit Schafblut^{Plus} (5 %) (Oxoid Art.-Nr.: PB5039A)) und der Kohlenhydratabbau in Rhamnose- bzw. Xylose-Bouillon (10 g/l Fleischpepton, 1 g/l Fleischextrakt, 5 g/l Natriumchlorid, 0,02 g/l, Zusatz von 5 % Rhamnose bzw. Xylose) durchgeführt.

Einfluss der Pflanzenextrakte auf das KäSEN

Am Tag 3 (vor Beginn des Schmierens), Tag 10 (Ende des Schmierens und Verpackung) und Tag 24 (Ende der Lagerung) des Käses wurden bei allen hergestellten Käsen die pH-Werte (pH-Stick OMNI EASY pH) auf der Rinde und im Teig gemessen sowie die Gesamtkeimzahl, Lactobacillen und Hefen und Schimmelpilze nach den amtlichen Untersuchungsverfahren § 64 LFGB bestimmt. Zusätzlich wurde an den Tagen 10 und 24 *Brevibacterium (B.) linens* (Plate-Count-Agar (SIFIN TN 1189) + 3 % NaCl, 24 °C, aerob, > 1 Woche) als Nachweis für die Rotschmierekultur angezüchtet. Zusätzlich wurden die sensorischen Eigenschaften (Färbung, Geruch, Konsistenz) der selbstproduzierten Käse sowie eines gekauften (Limburger, Fa. Goldsteig) Käses festgehalten.

Statistik

Die erfassten *Listeria monocytogenes*-Daten wurden logarithmiert. Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde eine Normalverteilungsprüfung bestätigt. Die deskriptive Statistik erfolgte durch die Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichung. Durch die Zwei-faktorielle Varianzanalyse, die ANOVA und den Post-Hoc-Test mit dem Bonferroni- und dem T-Test wurde auf signifikante Mittelwertsdifferenzen geprüft. Als Signifikanzniveau sollte $p \leq 0,05$ erreicht werden. Die statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Softwareprogramm SPSS 20 (IBM München).

Ergebnisse

Die Abbildungen 1–3 stellen den Wachstumsverlauf der *Listeria monocytogenes* mit und ohne PE-Zusatz während der Challengeversuche dar.

Die pH-Werte, Gesamtkeimzahlen, Zahlen für die Lactobacillen, Hefen/Schimmelpilze und *B. linens* auf der Oberfläche sowie im Inneren der Käse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Challenge 1 (Hopfenextrakt)

Nach Verwendung der HE-haltigen Schmierlösung war keine Beeinflussung des Wachstumsverhaltens des *Listeria*-Stammes darstellbar. Ausgehend von der Ausgangskeimzahl ($1,3 \times 10^2$ KbE/g Käse) fiel die Zahl während der ersten 3 Tage sowohl mit als auch ohne HE-Zusatz zunächst auf < 10 KbE/g, um danach bis Ende der Lagerung Werte von $1,4 \times 10^6$ KbE/g mit HE-Zusatz und $5,7 \times 10^6$ KbE/g in der Kontrolle zu erreichen (Abb. 1).

Die Käsereifung wurde durch den HE nicht beeinflusst (s. Tab. 1). Auf der Käsoberfläche bildeten sich die erwarteten Mikrokulturen mit Ausnahme von *B. linens* leicht verzögert aus. Die Farbe von Rinde und Teig war gelblich. Im Anschnitt war eine Rindenbildung nachweisbar. Der Geruch war kräftig-aromatisch weichkäsetypisch und die Konsistenz fest-elastisch.

Challenge 2 (Hopfenextrakt)

Durch das Aufbringen des HE als separate Lösung nach dem Schmierern der Käserinde war eine deutliche Hemmwirkung auf *Listeria monocytogenes* statistisch nachweisbar. In

TABELLE 1: pH-Werte und Keimzahlentwicklung während der Lagerungsdauer.

Versuch		Tag 3 (vor Schmierern)	Tag 10 (Ende Schmierern)	Tag 24 (Ende Lagerung)
Challenge 1				
pH	→ Rinde	4,84	4,98	5,24
	→ Teig	4,72	4,44	4,59
GKZ in KbE/g	→ Rinde	$2,9 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$
	→ Teig	$2,9 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$
Lb. in KbE/g	→ Rinde	$5,5 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$8,0 \times 10^7$
	→ Teig	$2,0 \times 10^7$	$8,3 \times 10^7$	$5,9 \times 10^7$
H/S in KbE/g	→ Rinde	$< 10^4$	$1,8 \times 10^7$	$8,5 \times 10^6$
	→ Teig	$< 10^4$	$3,8 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$
<i>B. linens</i> in KbE/g	→ Rinde	n. u.	$< 10^4$	$< 10^4$
	→ Teig	n. u.	$< 10^4$	$< 10^4$
Challenge 2				
pH	→ Rinde	4,84	4,97	5,60
	→ Teig	4,72	4,42	4,68
GKZ in KbE/g	→ Rinde	$2,9 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$
	→ Teig	$2,9 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$4,5 \times 10^7$
Lb. in KbE/g	→ Rinde	$5,5 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$7,0 \times 10^7$
	→ Teig	$2,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$	$5,5 \times 10^7$
H/S in KbE/g	→ Rinde	$< 10^4$	$8,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$
	→ Teig	$< 10^4$	$1,8 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$
<i>B. linens</i> in KbE/g	→ Rinde	n. u.	$< 10^4$	$< 10^4$
	→ Teig	n. u.	$< 10^4$	$< 10^4$
Challenge 3				
pH	→ Rinde	4,81	5,35	5,28
	→ Teig	4,71	4,78	4,59
GKZ in KbE/g	→ Rinde	$5,1 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$
	→ Teig	$7,8 \times 10^8$	$9,0 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$
Lb. in KbE/g	→ Rinde	$1,8 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$
	→ Teig	$1,6 \times 10^8$	$4,0 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$
H/S in KbE/g	→ Rinde	$< 10^4$	$< 10^4$	$8,3 \times 10^6$
	→ Teig	$< 10^4$	$< 10^4$	$3,0 \times 10^4$
<i>B. linens</i> in KbE/g	→ Rinde	n. u.	$< 10^4$	$< 10^4$
	→ Teig	n. u.	$< 10^4$	$< 10^4$
Kontrolle				
pH	→ Rinde	4,82	4,98	5,24
	→ Teig	4,71	4,44	4,59
GKZ in KbE/g	→ Rinde	$3,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$
	→ Teig	$4,5 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$
Lb. in KbE/g	→ Rinde	$8,5 \times 10^7$	$8,0 \times 10^7$	$8,0 \times 10^7$
	→ Teig	$7,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
H/S in KbE/g	→ Rinde	$< 10^4$	$2,3 \times 10^7$	$8,5 \times 10^6$
	→ Teig	$< 10^4$	$2,7 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$
<i>B. linens</i> in KbE/g	→ Rinde	n. u.	$< 10^4$	$< 10^4$
	→ Teig	n. u.	$< 10^4$	$< 10^4$
gekaufter Limburger				
pH	→ Rinde	n. u.	n. u.	7,13
	→ Teig	n. u.	n. u.	5,17

Erläuterung: GKZ = Gesamtkeimzahl, Lb. = Lactobacillen, H/S = Hefen/Schimmelpilze, *B. linens* = *Brevibacterium linens*, n. u. = nicht untersucht

den ersten drei Tagen reduzierte sich die Zahl des getesteten Stammes (Ausgangskeimzahl $1,4 \times 10^2$ KbE/g) mit HE auf $2,2 \times 10^1$ KbE/g und ohne HE auf $5,4 \times 10^1$ KbE/g. Ab Probenahmetag 7 fiel die Listerienzahl auf der Käsober-

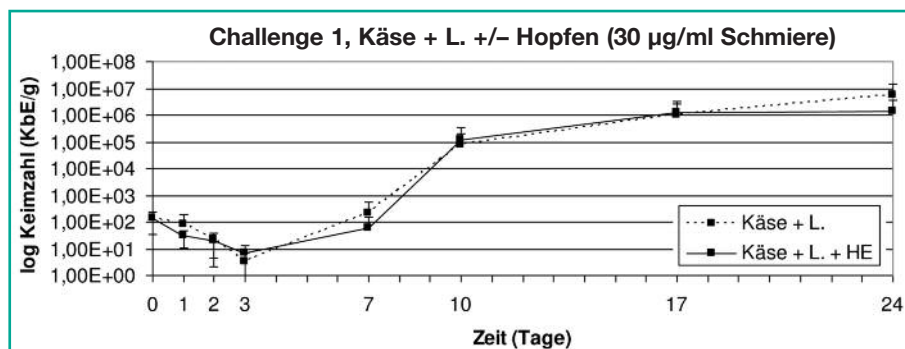


ABBILDUNG 1: Keimzahlentwicklung von *Listeria monocytogenes* (L.) auf der Käserinde mit (+ HE) und ohne Hopfenextrakt, HE in der Schmierlösung auf die Käsoberfläche aufgebracht.

fläche mit HE-Zusatz auf $1,2 \times 10^1$ KbE/g, um dann auf $2,8 \times 10^1$ KbE/g am Tag 10 und auf $4,0 \times 10^1$ KbE/g am Tag 17 anzusteigen. Zum Ende der Lagerung konnte die Zahl auf $6,0 \times 10^0$ KbE/g reduziert werden. Eine vollständige Inaktivierung war nicht darstellbar. Die Listerien im Kontrollkäse stiegen bis Tag 17 auf $2,1 \times 10^5$ KbE/g an. Am Lagerungsende (Tag 24) wurden Werte von $9,3 \times 10^3$ KbE/g ermittelt (Abb. 2).

Die Reifung der mit HE behandelten Käse verlief in den ersten Tagen leicht verzögert. Die Rindenbildung und die fest-elastische Konsistenz sowie der typische kräftig-aromatische Geruch waren jedoch am Ende der Lagerung ausgeprägt, wobei der bittere Eigengeruch des HE trotzdem schwach wahrnehmbar blieb. Die Farbe war auf der Oberfläche und im Inneren gelblich. Die Oberfläche des Käses blieb immer leicht feucht-schmierig. Lactobacillen und Hefen waren in der erwartenden Anzahl nachweisbar, *B. linens* nicht (s. Tab. 1).

Challenge 3 (Rooibosextrakt)

Nach Auftragen des RE auf die Käseoberfläche nach dem Schmieren war keine Beeinflussung des Teststammes statistisch nachweisbar. Während der ersten Woche verlief das Wachstum in der Gruppe mit RE-Zusatz als auch in der Kontrollgruppe ähnlich und erreichte Werte von $2,0 \times 10^1$ KbE/g. Ab Tag 10 wuchsen die Listerien trotz RE-Zugabe auf $4,6 \times 10^2$ KbE/g zum Ende der Lagerung und damit auf das 10fache der Listerienanzahl in der Kontrollgruppe ($3,6 \times 10^1$ KbE/g) (Abb. 3). Dieser Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant.

Die Reifung des Käses mit den erwarteten Mikroorganismen mit Ausnahme von *B. linens* war darstellbar (s. Tab. 1). Das Aussehen wird durch die intensiv orangefarbene Farbe des Rooibosextraktes, die sich von der Oberfläche bis ins Käseinnere zieht, beeinflusst. Der Geruch war leicht süßlich und die Konsistenz fest-elastisch.

Diskussion

Die antilisterielle Wirkung des Extraktes aus Hopfen in der Konzentration von $30 \mu\text{g/g}$ bei direkten, wiederholten Aufbringen auf die Käseoberfläche war statistisch nachweisbar. Die von Larson (1996) dargestellte entwickelte Resistenz der Listerien gegenüber dem Extrakt konnte nicht festgestellt werden. Die Anreicherung des HE auf der Oberfläche induzierte eine leichte Beeinträchtigung der sensorischen Merkmale, da ein schwacher Eigengeruch des HE wahrnehmbar war. Die Ausbildung der Hefen auf der Käseoberfläche wurde durch das wiederholte Auftragen des HE nach dem Schmieren nicht beeinflusst, dennoch verzögerte sich die Deacidifizierung, da nur pH-Werte von 4,5–5,2 erreicht wurden. Für die Weiterbesied-

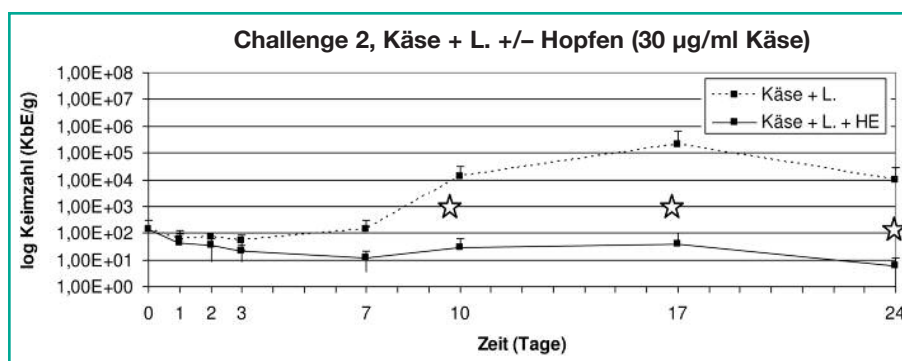


ABBILDUNG 2: Keimzahlentwicklung von *Listeria monocytogenes* (L.) auf der Käseoberfläche mit (+ HE) und ohne Hopfenextrakt (HE), HE nach dem Schmieren direkt auf die Käseoberfläche aufgebracht, ☆ Tage mit statistisch signifikanten Unterschieden.

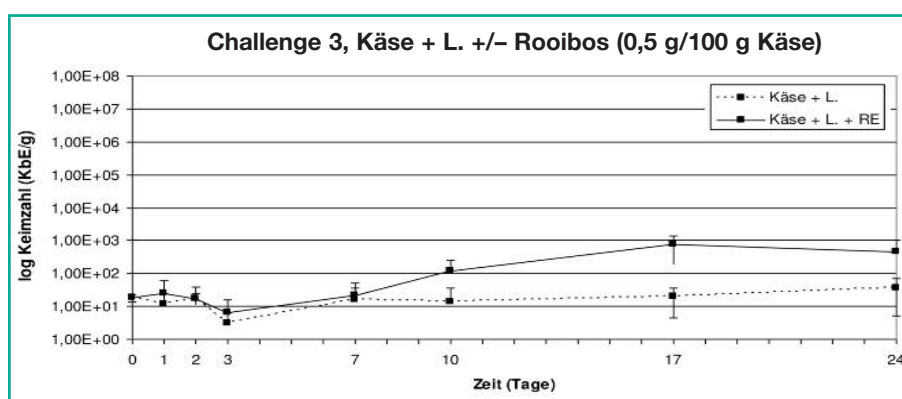


ABBILDUNG 3: Keimzahlentwicklung von *Listeria monocytogenes* (L.) auf der Käseoberfläche mit (+ RE) und ohne Rooibosextrakt (RE), RE nach dem Schmieren direkt auf die Käseoberfläche aufgebracht.

lung mit Schmierebakterien sollten die pH-Werte > 6 sein (Bockelmann et al., 2005). Durch den sauren pH-Wert wurden jedoch wahrscheinlich die antilisteriellen Wirkkomponenten des Hopfenextraktes unterstützt. Zum Ende der Lagerung war dennoch die produkttypische Flora nachweisbar.

Der Nachweis von *B. linens* war in dieser Arbeit auf den Käsen mit PE als auch auf den Kontrollkäsen nur schwer darstellbar. Es ist allerdings nicht von einer spezifischen Wirkung der Pflanzenextrakte auf *B. linens* auszugehen, sondern vielmehr ergaben sich Probleme der Etablierung einer kommerziellen Starterkultur unter Laborbedingungen. Die Käsereifung ist ein komplexes Mikrosystem, abhängig von den eingesetzten Kulturen, dem Salzbad und den Reifungsbedingungen (Luftfeuchte, Temperatur, Mikroorganismen in der Luft). Kommerziell verfügbare Starterkulturen wachsen oft nur zögerlich (Goerges et al., 2008), so dass traditionell mit dem „Alt-Jung-Schmieren“ die etablierten Mikroorganismen vom gereiften auf den neuen Käse übertragen werden, was auch als Auslöser für das Verbreiten pathogener Keime führen kann (Bockelmann et al., 2005). Die Analyse der Schmierekulturen sowie die Bedeutung der verschiedenen Komponenten (Hefen, Schimmelpilze, Bakterien) für die Reifung wurden in verschiedenen Projekten gefördert (EU-Projekt CT98-PL 4220, FEI-Projekte AiF 12780 N und 13018 N). Hierbei konnte nach Einsatz kommerzieller Starterkulturen das Wachstum der typischen Mikroorganismen mit Ausbildung der erwarteten Sensorik (Geruch, Geschmack, Farbe, Kon-

sistenz) dargestellt werden (Bockelmann et al., 2005). Bei Untersuchungen von Limburger Käse konnten als hauptfarbgebende Komponenten der orange pigmentierende *Halomonas* sp. und der beige-pigmentierende *C. casei* mit 10–30 % der Oberflächenschmiere isoliert werden, während *B. linens* ebenfalls nur in variablen, meist geringen Zellzahlen detektiert wurde (Bockelmann et al., 2005).

Die Zugabe des HE direkt zur Schmiere führte weder zu einer Wirkung auf den Teststamm noch zu einer Beeinträchtigung der sensorischen Merkmale, was sich mit einem möglichen Verdünnungseffekt erklären lässt. Der Einsatz höherer Konzentrationen des HE ist aufgrund der sensorischen Einschränkungen eher als problematisch anzusehen.

Bei dem Extrakt aus fermentiertem Rooibos konnte während der Käseversuche im Gegensatz zu den *In-vitro*-Versuchen (Kuehnast und Braun, 2013a) kein antilisterieller Effekt dargestellt werden. Durch die Lebensmittelmatrix wird möglicherweise die Komplexbildung der flavonoiden Bestandteile des Rooibosextraktes mit der Bakterienzellwand zu sehr eingeschränkt.

Die durch den Extrakt induzierte Rotfärbung des Käses, ausgehend von der Rinde bis in den Teig ziehend, würde sicher aufgrund des positiven Images von Pflanzenextrakten von einem Großteil der Verbraucher akzeptiert werden. Den süßlichen Geruch empfindet der Verbraucher möglicherweise als eine Beeinträchtigung.

Zusammenfassend lässt sich aus den Versuchen schlussfolgern, dass eine antimikrobielle Wirkung auf *Listeria monocytogenes* mit Pflanzenextrakten allein nicht zu erreichen ist. Als zusätzliche Komponente könnten sie, wie auch bereits etablierte Starterkulturen und deren Bakteriozine (Eppert et al., 1997; Bockelmann et al., 2005), eingesetzt werden. Wechselwirkungen und unterstützende Bedingungen aufgrund der Lebensmittelmatrix (pH, Fettgehalt, Salzgehalt, Starterkulturen) müssen jedoch vor Einsatz in weiteren Untersuchungen geklärt werden, da der antibakterielle Effekt pflanzlicher Wirkstoffe auf Mikroorganismen in *In-vitro*-Studien beim Einsatz direkt im Lebensmittel gar nicht oder nur mit erhöhter Konzentration dieser nachgewiesen werden konnte (Burt, 2004). Dabei spielen auch Temperatur, Art der Verpackung (Vakuum, Luft, Gas) und die Eigenschaften der Mikroorganismen eine Rolle (Shelef, 1983; Tassou, 1995; Burt, 2004). So bieten z. B. Lebensmittel mit einem hohen Fettgehalt einen Schutz für Mikroorganismen (Aureli et al., 1992; Tassou, 1995). Dies wird durch die Ergebnisse von Larson (1996) an Camembert und Halbfettmilch bestätigt. Shen (2008) dokumentierte eine antilisterielle Hopfenwirkung bei erhöhtem Fettgehalt in „Frankfurter Würstchen“ dar.

Insgesamt bieten die durchgeführten Reifungsversuche an Weichkäsen nach Limburger Art mit Zugabe von Pflanzenextrakten zur Wachstumsunterdrückung von *Listeria monocytogenes* für eine mögliche industrielle Anwendbarkeit erste Anhaltspunkte, wobei nur der Extrakt aus Hopfen eine nachweisliche antilisterielle Wirkung entfaltet. Eine Beeinträchtigung der Käsureifung war bei den eingesetzten Konzentrationen weder durch den Extrakt aus Hopfen noch aus fermentiertem Rooibos gegeben. Allerdings wurden durch beide Extrakte leichte sensorische Beeinträchtigungen induziert.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch die Bereitstellung des Extraktes aus Rooibos und Hopfen sowie finanzieller Zuwendung der Adalbert-Raps-Lebensmittelforschung gem. GmbH Kulmbach ermöglicht. Für die gute Zusammenarbeit geht mein besonderer Dank an Frau Dr. Toelstede und Herrn Dr. Weinreich.

Literaturverzeichnis

- Almajano MP, Carbo R, Jimenez JAL, Gordon MH (2008):** Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry* 108: 55–63.
- Aureli P, Costantini A, Zolea S (1992):** Antimicrobial Activity of Some Plant Essential Oils Against *Listeria-Monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 55: 344–348.
- Becker B und Holzapfel WH (2000):** Erhöhte Listeriose-Gefahr in Deutschland? Forschungsreport 2/2000 Heft 22: 10–13. www.bmelv-forschung.de/fileadmin/dam_uploads/Forschungs-Report/fr-2000-2.pdf
- Bockelmann W, Willems KP, Neve H, Heller KH (2005):** Cultures for the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal* 15: 719–732.
- Burt S (2004):** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223–253.
- Coetzee G, Marx IJ, Pengilly M, Bushula VS, Joubert E, Bloom M (2008):** Effect of rooibos and honeybush tea extracts against *Botrytis cinerea*. *South African Journal of Enology and Viticulture* 29: 33–38.
- Eppert I, ValdesStaubert N, Gotz H, Busse M, Scherer S (1997):** Growth reduction of *Listeria* spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium linens* as evaluated in situ on soft cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4812–4817.
- Gerhauser C (2005):** Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. *Molecular Nutrition & Food Research* 49: 827–831.
- Goerges S, Mounier J, Rea MC, Gelsomino R, Heise V, Beduhn R, Cogan TM, Vancanneyt M, Scherer S (2008):** Commercial ripening starter microorganisms inoculated into cheese milk do not successfully establish themselves in the resident microbial ripening consortia of a South German red smear cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 2210–2217.
- Grüner-Richter S, Otto F, und Weinreich B (2008):** Rooibos extract with increased aspalathin content, process for the preparation of such a rooibos extract, and cosmetic agent containing such a rooibos extract. US2008/0247974 A1, USA.
- Haas GJ und Barsoumian R (1994):** Antimicrobial Activity of Hop Resins. *Journal of Food Protection* 57: 59–61.
- Hansen M (1947):** The antiseptic activity of humulon and lupulon. *International Congress for Fermentation Industries, Lectures and Communications*, Ghent, 302.
- Hanske L, Hussong R, Frank N, Gerhauser C, Blaut M, Braune A (2005):** Xanthohumol does not affect the composition of rat intestinal microbiota. *Molecular Nutrition & Food Research* 49: 868–873.
- Joubert E und de Beer D (2011):** Rooibos (*Aspalathus linearis*) beyond the farm gate: From herbal tea to potential phytopharmaceutical. *South African Journal of Botany* 77: 869–886.

- Kuehnast K und Braun PG (2013a):** Evaluierung der antimikrobiellen Wirkung von Pflanzenextrakten auf lebensmittelhygienisch relevante Mikroorganismen in In-vitro-Kultur, Teil A: Rooibos. *Journal of Food Safety and Food Quality* 64: 24–30.
- Kuehnast K und Braun PG (2013b):** Evaluierung der antimikrobiellen Wirkung von Pflanzenextrakten auf lebensmittelhygienisch relevante Mikroorganismen in In-vitro-Kultur; Teil B: Hopfen. *Journal of Food Safety and Food Quality* 64: 84–90.
- Larson AE, Yu RRY, Lee OA, Price S, Haas GJ, Johnson EA (1996):** Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *International Journal of Food Microbiology* 33: 195–207.
- Lewis JC, Alderton G, Carson JE, Reynolds DM, Maclay WD (1949):** Lupulon and Humulon – Antibiotic Constituents of Hops. *Journal of Clinical Investigation* 28: 916–919.
- Ohsugi M (1997):** Antibacterial activity of traditional medicines and an active constituent lupulone from *H. lupulus* against *Helicobacter pylori*. *Journal of Traditional Medicines* 14: 186–191.
- Robert Koch Institut (2010):** Listeriose-Ausbruch in Deutschland und Österreich – Update. *Epidemiologisches Bulletin* 8: 78–78.
- Sandasi M, Leonard CM, Viljoen AM (2010):** The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 50: 30–35.
- Schepers S (2001):** Anti-microbial activity of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) on food spoilage organism and potential pathogens. South Africa, Department of Food Science, Faculty of Agriculture and Forestry Science, Universität of Stellenbosch, diss.
- Shelf LA (1983):** Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety* 6: 29–44.
- Shen C, Geornaras I, Kendall PA, Sofos JN (2009):** Control of *Listeria monocytogenes* on Frankfurters by Dipping in Hops Beta Acids Solutions. *Journal of Food Protection* 72: 702–706.
- Shen C und Sofos JN (2008):** Antilisterial Activity of Hops Beta Acids in Broth with or Without Other Antimicrobials. *Journal of Food Science* 73: M438–M442.
- Shimwell JL (1937):** On the relation between the staining properties of bacteria and their reaction towards hop antiseptic, part I, II. *Journal of the Institut of Brewing* 43: 111–118.
- Tassou C (1995):** Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 °C and 10 °C. *Journal of Applied Bacteriology* 78: 593–600.
- U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2012):** Safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry and egg products. <http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FSISDirectives/7120.1.pdf>. 6-12-2012
- Wang J und Mazza G (2002):** Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 4183–4189.

Korrespondenzadresse:

Karin Kühnast
Institut für Lebensmittelhygiene
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig
An den Tierkliniken 1
04103 Leipzig
kuehnast@vetmed.uni-leipzig.de

Kontakte

Sie interessieren sich für ein Abonnement des „Archivs“?

Telefon (0 51 81) 80 02-50
Telefax (0 51 81) 80 02-55
E-Mail dieter.meyer@p-d-ges.de

Sie interessieren sich für Anzeigen- oder Beilagenwerbung?

Telefon (0 51 81) 80 02-53
Telefax (0 51 81) 80 02-55
E-Mail a.m.peter@p-d-ges.de



Presse Dienstleistungs-
gesellschaft mbH & Co. KG

Ravenstraße 45 · 31061 Alfeld (Leine)
Postfach 16 42 · 31046 Alfeld (Leine)
Telefon (0 51 81) 80 02-0
Telefax (0 51 81) 80 02-55
E-Mail info@p-d-ges.de