

Einfluss der Wasseraktivität auf Vermehrung und Stoffwechsel von Propionsäurebakterien

M. Rüegg, H. Glättli und B. Blanc
Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, CH-3097 Liebefeld
Direktor: Prof. Dr. B. Blanc

EINLEITUNG

Neben dem Angebot an Nährstoffen, dem pH-Wert und der Temperatur stellt für das Wachstum der Mikroorganismen das Vorhandensein von genügend Wasser ein ausschlaggebender Faktor dar. Dabei kommt dem absoluten Wassergehalt des Substrates eine geringere Bedeutung zu als dem Zustand oder der «Verfügbarkeit» des vorhandenen Wassers. Scott hat als erster in diesem Zusammenhang den Begriff der Wasseraktivität (a_w -Wert) eingeführt [1, 2]. Zwischen der Aktivität des Wassers in einer Lösung und dem Dampfdruck des Wassers über der Lösung besteht die Beziehung $a_w = p/p_0$ (ideales Verhalten des Gases vorausgesetzt). Der a_w -Wert lässt sich demnach aus dem relativen Wasserdampfdruck p/p_0 , der sich in einem geschlossenen Raum über der zu messenden Lösung einstellt, ermitteln. Der relative Wasserdampfdruck p/p_0 seinerseits ist definiert als das Verhältnis aus dem Teildruck des Wasserdampfes in der Versuchsatmosphäre zum Dampfdruck des reinen Wassers bei gleicher Temperatur und Gesamtdruck [3].

Ähnlich der Wasseraktivität charakterisiert auch der osmotische Druck den Zustand des Wassers in Lösungen. Beide Grössen, der a_w -Wert und der osmotische Druck, lassen sich unter anderem aus Dampfdruckmessungen berechnen [4]. In der Lebensmittelwissenschaft hat sich das Konzept der Wasseraktivität zur Charakterisierung des Zustandes oder der «Verfügbarkeit» des Wassers durchgesetzt. Dies dürfte nicht zuletzt auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass der a_w -Wert einer Lösung in einer einfachen Beziehung zum relativen Wasserdampfdruck und somit auch zur relativen Luftfeuchtigkeit (r. F.) über der Lösung steht. Die relative Luftfeuchtigkeit entspricht nämlich in erster Näherung dem 100-fachen Wert der Wasseraktivität: r. F. $\cong a_w \cdot 100$ [3].

In den letzten 15 Jahren wurden zahlreiche Studien über die Beeinflussung der Vermehrung und des Stoffwechsels von Mikroorganismen durch die Wasseraktivität veröffentlicht (siehe z. B. [4—7]). Die meisten dieser Arbeiten hatten zum Ziel, den Einfluss des a_w -Wertes von Lebensmitteln auf deren Haltbarkeit respektive Verderblichkeit durch Mikroorganismen zu studieren. Es wurde bereits eine grosse Zahl von Mikroorganismen auf ihre a_w -Toleranz untersucht. In Tabelle 1 sind für einige Gruppen von Mikroorganismen die entsprechenden a_w -Richtwerte aufgeführt, bei denen eine vollständige Vermehrungshemmung erwartet wird [4, 7].

Tabelle 1 Ungefähre a_w -Grenzwerte für die Vermehrung von Mikroorganismen [4, 7]

Organismen	a_w -Bereich
Gramneg. Bakterien	0,98 — 0,95
Bakterien (allgemein)	0,95 — 0,91
Hefen	0,91 — 0,88
Schimmelpilze	0,88 — 0,80
Halophile Bakterien	0,80 — 0,75
Xerophile Schimmelpilze	0,75 — 0,65
Osmophile Hefen	0,65 — 0,60

In der Literatur findet man Angaben über die Ansprüche verschiedener technologisch wichtiger Mikroorganismen an die Wasseraktivität (z. B. [6-10]). Unseres Wissens wurden hingegen die a_w -Grenzwerte für das Wachstum und die Aktivität von Propionsäurebakterien nie untersucht. Da die Propionsäurebakterien bei der Herstellung von Emmentaler-Käse eine bedeutende Rolle spielen und man weiss, dass sie als CO_2 -Produzenten bei der Entstehung der Nachgärung mitverantwortlich sind, hat man sich zu dieser Arbeit entschlossen. Sie stellt einen Versuch dar, das Wachstum und die Säureproduktion von *Propionibacterium shermanii* als Funktion der Wasseraktivität, unter Verwendung einer neuartigen Versuchsanordnung, zu bestimmen.

EXPERIMENTELLES

Organismen

Für die Experimente wurde die Propionsäurebakterien-Kultur unserer Forschungsanstalt verwendet.

Bestimmung des Wachstums der Kultur

Das Wachstum der Kultur wurde mit Hilfe der Keimzahlbestimmung verfolgt. Als Nährboden diente Laktatagar folgender Zusammensetzung: 30 g Pepton (Merck), 20 g Hefeextrakt, 24 g Na-Laktat (50%), 10 g Agar, dest. Wasser ad 1000 ml. Zur Herstellung von Anaerobiosis wurde die hohe Schicht mit Laktatagar zusätzlich überschichtet. Die Bebrütung erfolgte während 5 Tagen bei 30 °C.

Bestimmung der Aktivität der Kultur

Die Aktivität der Propionsäurebakterien-Kultur wird ausgedrückt durch die mit 0,1 n NaOH titrierbare Menge wasserdampf-flüchtiger Säuren in 10 ml Kulturflüssigkeit, die während der Bebrütungszeit gebildet wurde (Destillationszahl).

Nährmedien für die Experimente

Als Nährmedium für die Wachstumsstudien wurde Peptonmolke mit folgender Zusammensetzung verwendet: 10 g Pepton (Merck), 6 g Hefeextrakt, 1 Liter enteiweisste Molke. Der pH-Wert dieses Mediums wurde mit 20%iger NaOH auf $6,6 \pm 0,1$ eingestellt. Die Bebrütung erfolgte während 5 Tagen bei 25 °C.

Die gewünschten a_w -Werte wurden auf zwei verschiedene Arten erhalten: 1. Durch Verringerung des Wassergehaltes der Peptonmolke in einem Rotationsverdampfer und 2., durch Hinzufügen von NaCl zum Nährmedium. Gegenüber der zweiten Methode (NaCl-Zugabe) und anderen gebräuchlichen Verfahren, die auf einer Erniedrigung des a_w -Wertes durch Auflösen von Salzen, Glycerin oder Zuckern im Medium beruhen (z. B. [8-10]), weist die erste Methode den Vorteil auf, dass keine Fremdzusätze notwendig sind. Bei Zusatz von anorganischen oder organischen Verbindungen zum Nährmedium wird ein neuer Versuchsparameter eingeführt, der wachstumsfördernd oder -hemmend wirken kann und dadurch die Interpretation der Resultate erschwert.

Messung der a_w -Werte

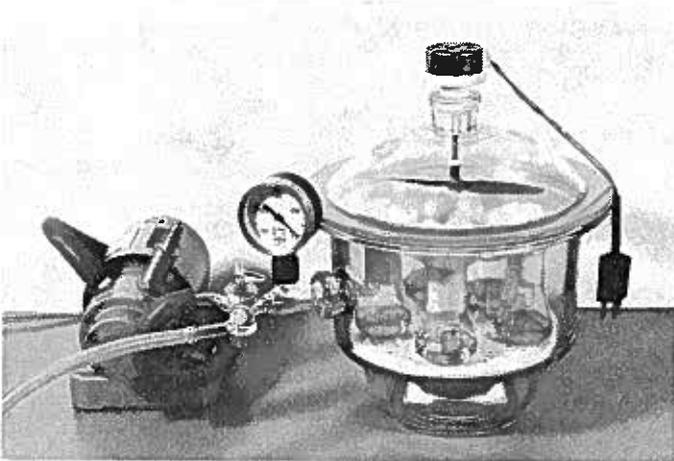
Die Wasseraktivitäten in den Nährmedien wurden mit einer SINA-Feuchtigkeits-Messeinrichtung bestimmt (NOVA-SINA A. G., Zürich). Die Eichung der Geber (Typ eZFBA-4) erfolgte mittels gesättigter Salzlösungen und verdünnter Schwefelsäurelösungen [11, 12]. Bei der unbehandelten Peptonmolke wurden Gefrierpunktmessungen mit einem Halbmikro-Osmometer (Firma KNAUER, Berlin) vorgenommen und der a_w -Wert mit Hilfe der empirischen Näherungsformel von Lewis und Randell [13]: $\log a_w = -0,004211\Delta T - 0,000022\Delta T^2$, unter Vernachlässigung der Temperaturabhängigkeit von a_w , berechnet. Der mittlere Fehler der experimentell bestimmten a_w -Werte beträgt $\pm 0,5\%$.

Versuchsordnung

Die Bebrütung der beimpften Nährlösungen (je ca. 15 ml in Erlenmeyerkolben) erfolgte in speziellen Exsikkatoren bei 25°C (Fig. 1). Um während der gesamten Inkubationszeit von 5 Tagen ein Feuchtgleichgewicht in der Versuchsatmosphäre aufrechtzuerhalten, wurde im unteren Teil der Exsikkatoren eine Schwefelsäurelösung geeigneter Konzentration [12] gegeben und die Luft mittels eines eingebauten Ventilators umgewälzt. Nach dem Beimpfen der Nährlösungen wurden die Exsikkatoren bis auf einen Druck von 15 Torr evakuiert und mit einem Stickstoff/CO₂-Gasgemisch (90% N₂, 10% CO₂) gefüllt, um anaerobe Bedingungen zu schaffen.

Trotz der getroffenen Vorsichtsmassnahmen zur Aufrechterhaltung eines Feuchtgleichgewichtes veränderten sich die a_w -Werte der Testlösungen im Laufe der Bebrütung geringfügig. Im Mittel nahmen die a_w -Werte um 0,004 Einheiten ab. Für die Auswertung wurde jeweils der Mittelwert berechnet.

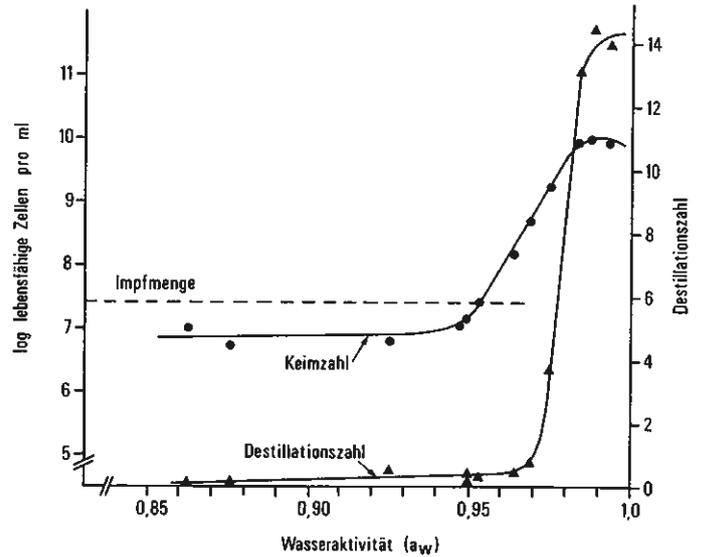
Fig. 1: Apparatur zur aeroben oder anaeroben Bebrütung von Nährmedien bei konstanter Luftfeuchtigkeit (Erläuterungen siehe Text)



RESULTATE UND DISKUSSION

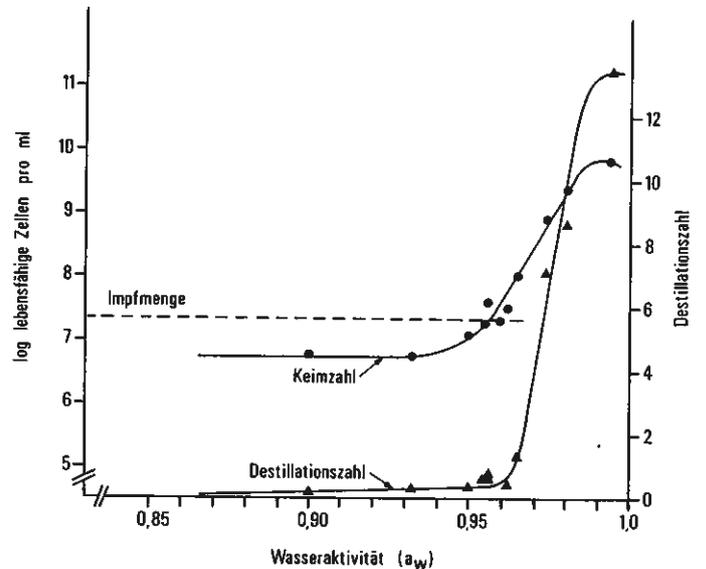
Fig. 2 zeigt Resultate aus Versuchen in denen die Wasseraktivität durch stufenweises Verringern des Wassergehaltes des Nährmediums eingestellt wurde. In Fig. 3 sind die gleichen Messgrößen wiedergegeben, wie sie aus Versuchen mit Zugabe von NaCl zum Peptonmolke-Medium erhalten wurden.

Fig. 2: Einfluss der Wasseraktivität auf die Vermehrung und die Produktion wasserdampfflüchtiger Säuren von Propionsäurebakterien



Peptonmolke-Medien mit unterschiedlichen Wassergehalten; Bebrütung: 5 Tage bei 25°C; Destillationszahl: ml 0,1 n NaOH pro 100 ml Wasserdampfdestillat aus 10 ml Kulturflüssigkeit.

Fig. 3: Einfluss des a_w -Wertes auf die Vermehrung und die Produktion wasserdampfflüchtiger Säuren von Propionsäurebakterien



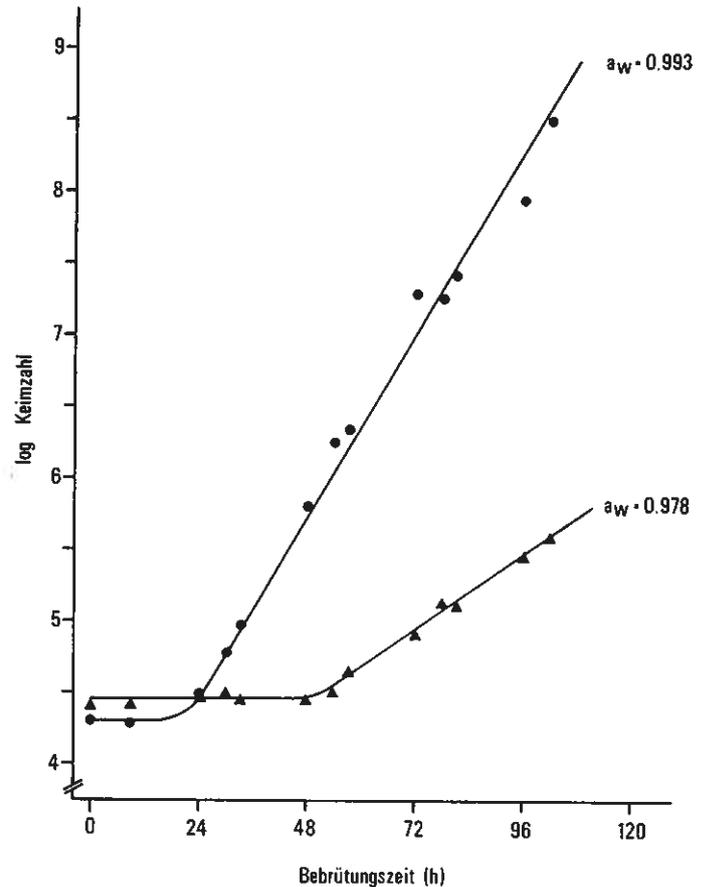
a_w -Wert variiert durch Zugabe von NaCl zum Peptonmolke-Medium; Bebrütung: 5 Tage bei 25°C; Destillationszahl: ml 0,1 n NaOH pro 100 ml Wasserdampfdestillat aus 10 ml Kulturflüssigkeit.

Die Resultate aus beiden Versuchsserien sind nahezu identisch, was auf einen geringfügigen Einfluss der Na⁺- und Cl⁻-Ionen auf die Propionsäurebakterien schliessen lässt. Die wachstumshemmende Wirkung der steigenden NaCl-Konzentration beruhte demnach zur Hauptsache auf der Erhöhung des osmotischen Druckes im Nährmedium. Gemessen an der Konzentration wasserdampfflüchtiger Säuren nach 5-tägiger Inkubationszeit, ist in beiden Fäl-

len ein sehr starker Einfluss der Wasseraktivität auf den Stoffwechsel der untersuchten Bakterien feststellbar. Dabei ist von Interesse, dass, unter im übrigen günstigen Wachstumsbedingungen, schon bei Unterschreitung eines a_w -Wertes von 0,98 die Säureproduktion stark abnimmt und innerhalb eines sehr engen Bereiches (0,98—0,97) auf ein Minimum reduziert wird. Die Vermehrung der Bakterien ist andererseits in einem breiteren a_w -Bereich möglich. Nach den Ergebnissen in Fig. 2 und Fig. 3 scheinen optimale Wachstumsbedingungen im a_w -Bereich von etwa 0,985 bis 0,995 vorzuliegen. Unterhalb $a_w=0,98$ nimmt der Logarithmus der Anzahl lebensfähiger Zellen nahezu linear mit der Wasseraktivität bis $a_w=0,955$ ab. Bei einem a_w -Wert von ungefähr 0,95 wird die Vermehrung der Bakterien vollständig gehemmt. Bei Unterschreitung dieses kritischen a_w -Wertes schliesslich, beginnt ein Absterben der Bakterien. Der kritische a_w -Wert von 0,955 entspricht einer NaCl-Konzentration im verwendeten Nährmedium von ca. 6%.

Es wurde schon verschiedentlich gezeigt, dass die durch Erniedrigung der Wasseraktivität verursachte Wachstumshemmung sich auf zwei charakteristische Arten manifestiert [2, 14]: 1. Durch eine Verlängerung der Lag-Phase und 2., durch eine Erniedrigung der Wachstumsrate (Verlängerung der Generationszeit). Im Falle der Propionsäurebakterien konnten diese charakteristischen Phänomene ebenfalls beobachtet werden. Fig. 4 zeigt Wachstumskurven von den untersuchten Bakterien bei zwei verschiedenen a_w -Werten. Die Wachstumskurve für $a_w=0,993$ wurde mittels der unveränderten Peptonmolke erhalten, diejenige für $a_w=0,978$ entstammt einem Versuch, bei dem die Wasseraktivität durch Erniedrigung des absoluten Wassergehaltes des Mediums eingestellt wurde. Das Beispiel in Fig. 4 zeigt, dass eine relativ geringe Erniedrigung des a_w -Wertes von 0,993 auf 0,978 die Lag-Phase um mehr als das 2,5-fache verlängert und die Wachstumsrate bereits stark erniedrigt. Die Generationszeiten betragen im Beispiel 5,7 h bei $a_w=0,993$ und 13,7 h bei $a_w=0,978$.

Fig. 4: Wachstumsbeeinflussung der Propionsäurebakterien-Kultur durch die Wasseraktivität bei 25 °C.



Da die Abhängigkeit der Bakterienvermehrung von der Wasseraktivität in dieser Arbeit unter im übrigen günstigen Wachstumsbedingungen studiert wurde, ist eine Übertragung der Resultate auf andere Systeme als das verwendete Peptonmolke-Mediums, z. B. auf Käse als Nährboden, nicht vorbehaltlos möglich. Eine gleichzeitige Veränderung von zwei oder mehreren Wachstumsparametern (a_w und pH, Temperatur, Nährstoffangebot, etc.), wird die a_w -Toleranz beeinflussen. Es ist anzunehmen, dass die gefundene a_w -Toleranz (kritische Wachstumsschranke um $a_w=0,95$; maximale Wachstumsrate bei $a_w=0,99$), sich bei gleichzeitiger Veränderung von mehreren Wachstumsparametern nach höheren a_w -Werten verschiebt.

Wir danken Fri. A. Kocher und Frau E. Pieri für ihre sorgfältige technische Mitarbeit, sowie Herrn P. Knecht für die Konstruktion der Versuchsapparatur.

LITERATURVERZEICHNIS

- Scott, W. J. (1953). Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30 °C. *Austr. J. biol. Sci.* 6, 549—564.
- Scott, W. J. (1957). Water relations of food spoilage microorganisms. *Adv. Food Res.* 7, 83—127.
- Gál, S. (1972). Ueber die Ausdrucksweisen der Konzentration des Wasserdampfes bei Wasserdampf-Sorptionsmessungen. *Helv. Chim. Acta* 55, 1752—1757.
- Bone, D. P. (1969). Water activity — its chemistry and applications. *Food Product Development* 3, 81—94.
- Christian, J. H. B. (1963). Water activity and the growth of microorganisms. *Adv. Food Sci.* 3, 248—255.
- Troller, J. A. (1973). The water relations of food-borne bacterial pathogens. A review. *J. Milk Food Technol.* 36, 276—288.
- Rödel, W. (1975). Einstufung von Fleischerzeugnissen in leicht verderbliche, verderbliche und lagerfähige Produkte aufgrund des pH-Wertes und a_w -Wertes. *Diss. Freie Universität Berlin, Journal Nr. 859.*
- Horner, K. J. and G. D. Anagnostopoulos (1975). Effect of water activity on heat survival of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Salm. senftenberg*. *J. appl. Bact.* 38, 9—17.
- Hsieh, F., K. Acott, H. Elizondo and T. P. Labuza (1975). The effect of water activity on the heat resistance of vegetative cells in the intermediate moisture range. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.* 8, 78—81.
- Jakobsen, M. and H. C. Jensen (1975). Combined effect of water activity and pH on the growth of butyric anaerobes in canned pears. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.* 8, 158—160.
- Robinson, R. A. and R. H. Stokes (1959). *Electrolyte solutions*. Butterworth Sci. Publ., London.
- Gál, S. (1967). *Die Methodik der Wasserdampf-Sorptionsmessungen*. Springer-Verlag, Berlin.
- Lewis, G. N. and M. Randall (1923). *Thermodynamics and the free energy of chemical substances*. Mc Graw-Hill, New York.
- Wodzinski, R. J. and W. C. Frazier (1961). Moisture Requirements of bacteria. II. Influence of temperature, pH and mole fraction concentration on requirements of *Aerobacter aerogenes*. *J. Bact.* 81, 353—358.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde der Einfluss der Wasseraktivität (a_w -Wert) auf die Vermehrung und die Säureproduktion von Propionsäurebakterien (*Propionibacterium shermanii*) untersucht. Die gewünschten a_w -Werte wurden entweder durch Verringerung des absoluten Wassergehaltes des Nährmediums (Peptonmolke) oder durch Zugabe von NaCl eingestellt. Eine einfache Apparatur, die eine Aufrechterhaltung eines Feuchtgleichgewichtes unter anaeroben Bedingungen während der Bebrütung ermöglichte, wurde entwickelt.

Aus Wachstumskurven war ersichtlich, dass mit sinkendem a_w -Wert die Lag-Phase und die Generationszeit verlängert wurden. Der Gehalt der Kulturflüssigkeit an wasserdampfgefährlichen Säuren nach der Bebrütung nahm bei Unterschreitung eines a_w -Wertes von ca. 0,98 stark ab und reduzierte sich innerhalb eines engen Bereiches (0,98—0,97) auf ein Minimum. Unterhalb $a_w=0,98$ nahm der Logarithmus der Anzahl lebensfähiger Zellen nahezu linear mit der Wasseraktivität bis $a_w=0,955$ ab. Bei $a_w \leq 0,95$ wurde die Vermehrung vollständig gehemmt. Unterhalb dieses kritischen a_w -Wertes begann ein Absterben der Bakterien.

RÉSUMÉ

Influence de l'activité de l'eau sur la croissance et le métabolisme des bactéries propioniques

L'influence de l'activité de l'eau (a_w) sur la croissance et la production en acides des bactéries propionique (*Propionibacterium shermanii*) fut étudiée. Les activités désirées furent obtenues soit en diminuant le contenu absolu en eau du milieu de culture (peptonelactoserum), soit en y ajoutant du NaCl. Un appareillage simple a été cons-

truit pour la culture en anaérobiose et pour assurer une humidité constante.

Il ressort des courbes de croissance que la phase de latence et le temps de génération s'allongent pour une activité de l'eau décroissante. La teneur du milieu de culture en acides après incubation diminue rapidement en dessous d'une activité d'env. 0,98 et passe à un minimum dans l'espace d'un très petit domaine (0,98—0,97). En dessous de $a_w=0,98$, le logarithme du nombre de cellules vivantes diminue de manière presque linéaire jusqu'à une valeur de $a_w=0,955$. A $a_w \leq 0,95$ la croissance est entièrement inhibée. En dessous de cette valeur critique, les bactéries meurent lentement.

SUMMARY

Influence of water activity on growth and metabolism of *Propionibacterium shermanii*

The influence of water activity (a_w) on the acid production and growth of propionic acid bacteria cultures has been studied. The desired water activities were obtained either by varying the water content of the culture media (peptone-whey) or by adding NaCl. A simple apparatus has been developed which allowed incubations to be carried out under constant humidity and anaerobic conditions.

Growth curves showed that generation time and lag phase increased with decreasing water activity. The amount of acid in the culture media after incubation decreased significantly in the narrow a_w -range of 0.98—0.97 and below 0.97 remained minimal. The logarithm of the number of viable bacteria decreased linearly with water activity from 0.98 to 0.955. In the vicinity of $a_w=0.95$ inhibition of bacterial growth occurred. Reducing water activity below this critical value caused slow death of the cultures.

Bei der Redaktion eingetroffen am 20. 2. 1976