



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 220 222 A5

4(51) A 23 B 4/14
A 23 B 4/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP A 23 B / 261 871 6
(31) 483,801

(22) 11.04.84
(32) 11.04.83

(44) 27.03.85
(33) US

(71) siehe (73)
(72) Dahlstrom, Robert V., US
(73) Stauffer Chemical Company, Connecticut 06881, US

(54) Verfahren zur Wachstumshemmung von Clostridium botulinum in Fleischerzeugnissen

(57) Die Erfindung betrifft ein Fleischkonservierungsverfahren, bei dem insbesondere das Wachstum von Clostridium botulinum und/oder die Botulismustoxinproduktion gehemmt werden soll. Ziel der Erfindung ist es, weitere Möglichkeiten aufzudecken, den Nitritanteil in Fleischprodukten zu verringern. Erfindungsgemäß besteht das Verfahren darin, dem Fleischprodukt eine wirksame Menge der Verbindung 3-(4-Tolylsulfonyl)-acrylnitril sowie weniger als 120 ppm Alkalimetall-Nitritsalz hinzuzusetzen.

Erfindungsansprüche:

1. Verfahren zur Wachstumshemmung von **Clostridium botulinum** in Fleischerzeugnissen, **gekennzeichnet durch** Einarbeiten einer wirksamen Menge der Verbindung 3-(4-Tolylsulfonyl)acrylnitril sowie weniger als 120 ppm eines Alkalimetall-Nitritsalzes in ein Fleischprodukt.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß es sich bei dem Nitritsalz um Natriumnitrit handelt.
3. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Acrylnitril-Verbindung in einer Menge von etwa 25 bis etwa 50 ppm in das Fleischerzeugnis eingearbeitet wird.
4. Verfahren nach Punkt 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Alkalimetall-Nitritsalz in einer Menge von etwa 40 bis weniger als 120 ppm in das Fleischprodukt eingearbeitet wird.
5. Verfahren nach Punkt 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Alkalimetall-Nitritsalz in einer Menge von etwa 40 ppm in das Fleischprodukt eingearbeitet wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren sowie eine Zusammensetzung zur Hemmung des Wachstums von Bakterien der Art **Clostridium botulinum** in Fleischprodukten und dabei speziell in feinerkleinerten Fleischerzeugnissen und hierbei wieder ganz speziell in Schweinefleischerzeugnissen dieser Art.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Seit vielen Jahren besteht die Standardpraxis im Zusetzen von Natriumnitrit, um Fleischprodukte zu konservieren, indem das Wachstum von **Clostridium botulinum** sowie die Produktion von Botulinum-Toxin in den Fleischprodukten während der Lagerung gehemmt wird.

Das Vorhandensein von Natriumnitrit oder anderem Alkalimetallnitrat als Nahrungsmittelzusatzstoff speziell in geräucherten Fleischprodukten, die bei hohen Temperaturen gekocht werden, hat steigende Beachtung im Zusammenhang mit der Feststellung gefunden, daß sich Natriumnitrit in gekochten Fleischprodukten mit sekundären und tertiären Aminen unter Bildung von Nitrosaminen verbinden kann. Eine Reihe von Nitrosaminen hat sich bei Tieren als krebserregend erwiesen. Es ist daher wünschenswert, die Menge des in gelagerten Fleischerzeugnissen vorhandenen Nitrits zu reduzieren. Dabei ist es jedoch nicht erforderlich, die Produktion des tödlich wirkenden Botulismustoxins zu verhindern, welches bei der Lagerung auftreten kann. Seit dem 15. Juni 1978 fordert das U.S.-Landwirtschaftsministerium, daß sämtlicher unter Verwendung von Nitrit hergestellter Schinken 120 ppm Natriumnitrit zur Verhinderung der Bildung von Botulin sowie 550 ppm Natriumascorbat oder Natriumisoascorbat zur Hemmung der Bildung von Nitrosaminen aufweisen muß.

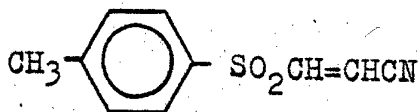
Der bisherige Stand der Technik beschreibt mehrere Substanzen, von denen sich gezeigt hat, daß sie das Wachstum von **Clostridium botulinum** und/oder die Produktion von Botulismustoxin hemmen, wenn sie einen Teil des Nitrits ersetzen. So beschreibt beispielsweise die FR-PS 7709 108 die Reduzierung der notwendigen Menge an Natriumnitrit durch Einsetzen großer Mengen an Sorbinsäure oder Sorbinsäuresalzen anstelle eines Teiles des Natriumnitrits. Die US-PS 4282 260 und 4348 419 beschreiben das Ersetzen von Natriumnitrit durch hypophosphorige Säure oder deren Natrium-, Kalium-, Calcium- oder Mangansalze. Diesen US-Patenten zufolge kann durch den Einsatz dieser Säure oder der von ihr abgeleiteten Salze die Menge des im Fleischerzeugnis vorhandenen Natriumnitrits von einem Stand von 120 ppm auf ein Niveau von ungefähr 40 ppm reduziert werden.

Ziel der Erfindung

Es ist Ziel der Erfindung weitere Möglichkeiten aufzufinden, den Nitritanteil in Fleischerzeugnissen zu verringern.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Wachstumshemmung von **Clostridium botulinum** bei Fleischprodukten bereitzustellen, bei dem der Nitritanteil durch eine andere chemische Verbindung reduziert wird. Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung des Wachstums von **Clostridium botulinum** sowie der Bildung von Botulismustoxin während der Lagerung von Fleischprodukten durch Einarbeitung einer wirksamen Menge der Verbindung 3-(4-Tolyl-sulfonyl)acrylnitril in die Fleischprodukte. Diese Verbindung hat die Formel



und ist beispielsweise aus der US-PS 3 159 532 bekannt.

Es wurden Versuche durchgeführt, um die Wirkung der Verbindung 3-(4-Tolylsulfonyl)acrylnitril auf die Hemmung des Wachstums von **Clostridium botulinum** sowie die Produktion von Botulismustoxin in Fleischerzeugnissen und dabei speziell in Schweinefleischprodukten zu ermitteln. Darüber hinaus wurden Versuche angestellt, um jenes mögliche Maß der Reduzierung des Natriumnitrit-Gehaltes durch Einsetzen der Objektverbindung für Natriumnitrit zu ermitteln, bei dem die Wirksamkeit im Sinne der Bekämpfung von **Clostridium botulinum** erhalten bleibt und bei dem gleichzeitig die Bildung von Nitrosaminen auf Grund einer niedrigeren Nitritkonzentration reduziert wird.

Wie aus den nachfolgend dargestellten Experimenten hervorgeht, wurde festgestellt, daß das Einarbeiten der Objektverbindung speziell in einer Menge von 25... 50 ppm eine gegenüber Natriumnitrit gleichwertige oder sogar bessere Leistung hinsichtlich der Inhibition von **Clostridium botulinum** erbrachte, wobei es möglich war, die Menge des genannten Nitrits von einer Konzentration von 120 ppm auf eine Konzentration von etwa 40 ppm zu verringern.

Die nachstehend dargelegten Experimente wurden generell nach den folgenden Vorgehensweisen vorgenommen.

Zubereitet wurden Chargen von gepökeltm Schweinebauch folgender Zusammensetzung:

| | |
|--------------------|----------|
| Schweinebauch | 450,00 g |
| Wasser | 35,00 g |
| Salz | 6,75 g |
| Dextrose | 4,50 g |
| Natriumisoascorbat | 50 ppm |

Eine Mischsporensuspension von *Clostridium botulinum* wurde folgendermaßen zubereitet:

Vier gekühlte Stämme des Typs A sowie sechs Stämme des Typs B wurden zubereitet und dann auf ein Maß von ungefähr 100 Sporen/ml verdünnt. Ein gemischtes Inokulum der Suspensionen wurde hergestellt, indem je 3 ml jeder Kultur einer sterilen Flasche zugesetzt wurden. Als Sporenbestand im vermischten Inokulum wurden 93 Sporen/ml ermittelt.

Die Chargen gepökelter Schweinebauch wurden mit 10 ml der Mischsporensuspension beimpft, indem die Suspension beim Mischen dem gepökelten Fleisch zugesetzt wurde. Nach dem Mischen wurde jede Charge in einen dichtschießenden Behälter eingelegt und auf 53°C erhitzt; dies ist die verbreitetste Fertigstellungstemperatur in der Schinkenindustrie. Jede Charge wurde sodann in eine Kunststoff-Trennhülle eingebracht und vakuumverpackt. Die Vakuumpackungen wurden nunmehr in einen bei 26,5°C gehaltenen Brutschrank eingelegt. Die Packungen wurden bis zum Auftreten offensichtlicher Gasbildung bebrütet und daran anschließend hinsichtlich *Clostridium botulinum* analysiert.

Wurde die Prüfverbindung Acrylnitril verwendet, so wurde sie durch Auswiegen der für eine bestimmte Masse Fleisch erforderlichen Menge sowie durch Auflösen in einer minimalen Menge Wasser und schließlich durch gemeinsames Zerkleinern mit dem Fleisch zwecks Gewährleistung einer innigen Verteilung eingemischt.

Experiment 1: Wachstum von *Clostridium botulinum* auf Schweinebauchchargen

Drei Chargen von Pökelschweinebauch wurden in der obigen Weise hergestellt und als Chargen A, B und C bezeichnet. Die Chargen enthielten 0, 20 bzw. 40 ppm Natriumnitrit. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in der folgenden Tabelle I dargestellt. Es zeigt sich, daß die Fleischchargen günstige Medien für das Wachstum von *Clostridium* darstellten.

TABELLE I

WACHSTUM VON CLOSTRIDIUM BOTULINUM IM PRÜFSYSTEM

| Charge | NaNO ₂ · ppm | Zeit, Tage | C. botulinum/g |
|--------|-------------------------|------------|----------------|
| A | 0 | 0 | — |
| | | 3 | 11 000 000 |
| B | 20 | 0 | — |
| | | 4 | 8 500 000 |
| C | 40 | 0 | — |
| | | 5 | 12 000 000 |

Experiment 2: Wirkung der Prüfverbindung

Die Tests wurden wie in Experiment 1 mit Chargen von gepökeltem Schweinebauch durchgeführt, welcher variierende Konzentrationen Natriumnitrit sowie die Objektverbindung Acrylnitril enthielten. Die Resultate dieser Experimente sind in der folgenden Tabelle II dargestellt.

Tabelle II

| Acrylnitrilkonzentration (ppm) | Natriumisoascorbatkonzentration (ppm) | Nitritkonzentration (ppm) | Zeit bis zur Gasbildung (Tage) | <i>Clostridium botulinum</i> (Anzahl/Gramm) |
|--------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|---|
| 0 | 550 | 120 | 27 | 9 100 000 |
| 0 | 550 | 120 | 30 | 6 200 000 |
| 0 | 550 | 120 | 28 | 6 300 000 |
| 0 | 0 | 40 | 4 | 26 000 000 |
| 0 | 0 | 40 | 6 | 19 000 000 |
| 0 | 0 | 40 | 6 | 31 000 000 |
| 50 | 550 | 40 | *NG | 140 000 |
| 50 | 550 | 40 | 33 | 2 100 000 |
| 50 | 550 | 40 | *NG | 620 000 |
| 50 | 1 000 | 40 | *NG | 90 000 |
| 50 | 1 000 | 40 | *NG | 110 000 |
| 50 | 1 000 | 40 | *NG | 40 000 |
| 25 | 550 | 40 | 28 | 4 300 000 |
| 25 | 550 | 40 | 30 | 7 200 000 |
| 25 | 550 | 40 | 30 | 6 200 000 |
| 25 | 1 000 | 40 | 30 | 5 500 000 |
| 25 | 1 000 | 40 | 32 | 6 300 000 |
| 25 | 1 000 | 40 | 30 | 8 100 000 |
| 10 | 550 | 40 | 12 | 14 000 000 |
| 10 | 550 | 40 | 10 | 9 200 000 |
| 10 | 550 | 40 | 11 | 9 500 000 |
| 10 | 1 000 | 40 | 12 | 12 000 000 |
| 10 | 1 000 | 40 | 13 | 8 100 000 |
| 10 | 1 000 | 40 | 12 | 13 000 000 |

* Nach 35 Tagen keine Gasbildung erkennbar.

Die Entwicklung von Gas ist unter den gegebenen Bedingungen ein Anzeichen für das Wachstum von *Clostridium*-Organismen. Wie sich anhand der obigen Tabelle zeigt, lagen die hinsichtlich des *Clostridium*-Wachstums erzielten Ergebnisse bei Verwendung von 25 ppm der Acrylnitril-Prüfverbindung gemeinsam mit 40 ppm Nitrit auf etwa dem gleichen Niveau wie bei Einsatz einer Nitritkonzentration von 120 ppm sowie weit über dem Ergebnis der Kontrollvariante, d. h. bei Einsatz von lediglich 40 ppm Nitritkonzentration sowie bei Fehlen von Acrylnitril.

Wurde das Acrylnitril in einer Konzentration von 50 ppm eingesetzt, so übertrafen die Ergebnisse diejenigen aller anderen Varianten bei weitem; in den meisten Fällen wurde nach 35 Tagen keine Gasentwicklung beobachtet.

Experiment 3: Bestimmung der Toxinproduktion im Fleisch nach der Lagerung

In der weiter oben beschriebenen Weise wurden verschiedene Chargen von gepökeltm Schweinebauch mit Gehalten an 0,40, oder 120 ppm Nitrit sowie — in einer Gruppe — mit einer Kombination von 40 ppm Nitrit plus 50 ppm der Acrylnitril-Prüfverbindung hergestellt. Die Chargen wurden mit einer Mischsporensuspension beimpft und in der bereits beschriebenen Weise bebrütet. Nach 10, 20 und 40 Tagen wurden Extrakte der Fleischchargen hergestellt, und zu den gleichen Zeitpunkten wurden je zwei Mäuse mit Extrakten jeder der Chargen injiziert.

Die nachfolgende Tabelle III faßt die Ergebnisse dieser Tests zusammen. Eine Toxinbildung in den Fleischchargen während der Lagerung zeigt sich in Gestalt von Mortalitätswirkungen bei den Mäusen:

TABELLE III

| Test-Nr. | Nitrit (ppm) | Prüfverbindung (ppm) | Anzahl Mäuse (von jeweils 2), die nach der Injektion starb | | |
|----------|--------------|----------------------|---|---------|---------|
| | | | 10 Tage | 20 Tage | 40 Tage |
| 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 |
| 2 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 |
| 3 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 |
| 4 | 40 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| 5 | 40 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| 6 | 40 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| 7 | 40 | 50 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 40 | 50 | 0 | 0 | 1 |
| 9 | 40 | 50 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 120 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 120 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 120 | 0 | 0 | 0 | 0 |