



Hochschule Neubrandenburg
University of Applied Sciences

Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften

Studiengang Lebensmitteltechnologie

WS 2011/12

**Keimreduzierung bei empfindlichen Rohstoffen mittels
überkritischem Kohlenstoffdioxid: Machbarkeitsstudie mit
mikrobiell belastetem Tee**

- Bachelorarbeit -

urn:nbn:de:gbv:519-thesis2012-0022-8

Verfasser: Martin Kison

Betreuer: Prof. Dr. Karl Steffens

Prof. Dr. Eckhardt Schulz

Abstract

The treatment with supercritical carbon dioxide is a non-thermal method to decrease the amount of microorganisms in food and beverage. Studies have shown that it is possible to achieve a survival rate about -5 log. This time it is intended to investigate the effect of scCO₂ on the contamination of sensitive raw products, exemplary tea. The dependence on time of treatment by constant pressure and temperature will be shown. First step is the application of scCO₂ and then the microbiological evaluation. At 1160 psi and 35 °C the maximum reduction was 0,808 log.

Inhalt

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Formelzeichen	4
1 Einleitung	5
2 Stand von Wissenschaft und Technik	6
2.1 Grundlagen und Wirkungsweise	6
2.2 Apparaturen zur Keimreduzierung	8
3 Material und Methoden	11
3.1 Behandlung mit überkritischem Kohlenstoffdioxid	11
3.2 Mikrobiologische Untersuchung	14
4 Ergebnisse	16
5 Diskussion	19
6 Zusammenfassung	21
7 Literaturverzeichnis	22
8 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	23
Anhang I: Verzeichnis der verwendeten Agenzien	25
Anhang II: Rohdaten	26
Anhang III: Überlebensraten	37
Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit	38

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Formelzeichen

BPW	Buffered Peptone Water
GF	Gewichtungsfaktor
GKZ	Gesamtkeimzahl
kbE	kolonienbildene Einheiten
MPa	MegaPascal
MW	Mittelwert
n.a.	nicht auszählbar
n.d.	nicht detektierbar
PBS	Phosphate Buffer Solution
psi	pound per square inch
scCO ₂	supercritical carbon dioxide (überkritisches Kohlenstoffdioxid)
ÜL	Überlebensrate
V	Volumen
Verd.St	Verdünnungsstufe
wt%	Masseprozent
\bar{x}_{gew}	gewichteter Mittelwert

1 Einleitung

Die Haltbarmachung sensibler Rohstoffe stellt die Lebensmittelindustrie immer wieder vor große Herausforderungen. Aufgrund ihrer hitzeempfindlichen Bestandteile kommen die konventionellen thermischen Konservierungsverfahren meist nicht in Frage. Auch die Anwendung von energiereicher Strahlung (Radioaktivität) ist, zumindest in Deutschland, untersagt. Chemische und biochemische Konservierungsstoffe sind deklarationspflichtig und stoßen beim Verbraucher auf eine geringe Akzeptanz.

In den letzten Jahrzehnten beschäftigte sich eine Vielzahl von Wissenschaftlern mit der Wirkung von Kohlenstoffdioxid, in den verschiedenen Aggregatzuständen, auf unterschiedliche Mikroorganismen. Sie verwendeten Reinkulturen in meist flüssigen Medien.

In dieser Studie soll nun untersucht werden, wie sich die Anwendung von überkritischen Kohlenstoffdioxid auf die Keimbelastung einer trockenen Substanz, in diesem Fall Pfefferminztee, auswirkt. Es wird von der natürlichen Mikrofauna ausgegangen, dass heißt es finden sich diverse zunächst unbekannte Arten von Mikroorganismen in der zu untersuchende Probe. Daher erfolgt die mikrobiologische Untersuchung vor und nach der Behandlung mit $scCO_2$ auf die Gesamtkeimzahl, Bakteriosporen, Enterobacter, sowie Hefen und Schimmelpilze. Bei dem Verfahren sollen die sensorischen Eigenschaften des Rohstoffes möglichst nicht beeinflusst werden, deswegen wird mit Parametern gearbeitet, welche gerade im überkritischen Bereich liegen.

2 Stand von Wissenschaft und Technik

2.1 Grundlagen und Wirkungsweise

Als überkritische Medien bezeichnet man Stoffe nach Überschreitung ihres kritischen Punktes, welcher durch eine Temperatur und einen Druck definiert ist. Sie verbinden die physikalischen Eigenschaften der Stoffe in den Aggregatzuständen flüssig und gasförmig. Für Kohlenstoffdioxid ist dieser Punkt mit 31,1 °C und 7,38 MPa festgelegt. Im überkritischen Zustand erhöhen sich die Durchdringungsfähigkeit und das Lösungsvermögen des Kohlenstoffdioxids. Es ist damit in der Lage, komplexe Strukturen zu durchwandern und Substanzen zu extrahieren. Dabei ist zu beachten, dass hohe Temperaturen vor allem die Extraktion fördern. Dies macht man sich besonders in der Gewinnung flüchtiger Verbindungen (Aromastoffe) zu Nutzen. Aus der Extraktionsfähigkeit des überkritischen Kohlenstoffdioxids heraus stellte man die Überlegung an, Verfahren zu entwickeln, um festzustellen ob sich dieser Stoff auch zur Reduzierung von Keimen anwenden lässt, da man annahm, dass lebenswichtige Bestandteile der Zellen entfernt werden können (Yuk et al., 2009). Ein entscheidender Vorteil in der Anwendung überkritischen Kohlenstoffdioxids liegt daran, dass im Gegensatz zu den üblichen thermischen Verfahren der Keimreduzierung (Sterilisation, Pasteurisation) mit wesentlich geringeren Temperaturen gearbeitet werden kann und damit die hitzeempfindlichen Inhaltsstoffe der behandelten Produkte geschont werden (Ballestra et al., 1996; Hong et al., 1999). Ein weiterer positiver Aspekt ist, dass sich das Kohlenstoffdioxid nach der Behandlung rückstandslos entfernen lässt, es ist nicht giftig, nicht brennbar, relativ umweltfreundlich und billig in der Herstellung (Gunes et al., 2006).

Bereits in den 1950er Jahren untersuchte Fraser die Wirkung von Gasen unter Hochdruck auf *Escherichia coli*. Er fand heraus, dass die Anwendung dieser Gase, insbesondere von Kohlenstoffdioxid eine Schädigung der Zellstruktur zur Folge hatte. Spätere Studien zeigten, dass der Druck, die Temperatur, die Ausgangskeimzahl, der pH-Wert, die Wasseraktivität, die Art der verwendeten Mikroorganismen und die Bauweise der Apparaturen einen entscheidenden Einfluss auf die Inaktivierung der Keime haben. Man stellte fest, dass die Hemmungen in unterschiedlichen Geschwindigkeiten, welche von der jeweiligen Methode abhing, abliefen. Daraus wurden drei kinetische Funktionen abgeleitet: slow-to-fast two-stage, one linear stage, fast-to-slow two-stage. Diese beschreiben die Überlebensrate der Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Dauer der Behandlung mit Kohlenstoffdioxid. Dabei zeigt sich, dass die Annäherung an die und Überschreitung der kritischen Parameter die Minimierung der Mikroorganismen nach der fast-to-slow two-stage Funktion zur Folge hat. Dass heißt, dass die hemmende Wirkung zu

Beginn der Behandlung am stärksten ist. Diese Beobachtung verstärkt sich je höher der Druck und die Temperatur sind, mit denen gearbeitet wird (Liao et al., 2007).

Nach Yuk et al. (2009) und Gunes et al. (2006) beruht die hemmende Wirkung des Kohlenstoffdioxids auf verschiedenen Theorien. Man vermutet, dass in wässrigen Lösungen der intrazelluläre pH-Wert gesenkt wird. Dies hat zur Folge, dass Zellenzyme inaktiviert werden und der Metabolismus gestört wird. Spilimbergo et al. (2002) zeigte, dass die Änderung des pH-Werts abhängig vom Druck war. Je höher der Druck anstieg, desto langsamer senkte sich der pH-Wert. Ferner werden die Lipide der Zellmembranen durch das Kohlenstoffdioxid entfernt und damit die Zellstruktur nachhaltig zerstört. Besonders Ballestra et al. (1996) und Hong et al. (1999) zeigten mit ihren Studien, wie sich die Behandlung mit überkritischen Kohlenstoffdioxid sowohl auf gram-negative, als auch auf gram-positive Bakterien auswirkt. Dies ist in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt.

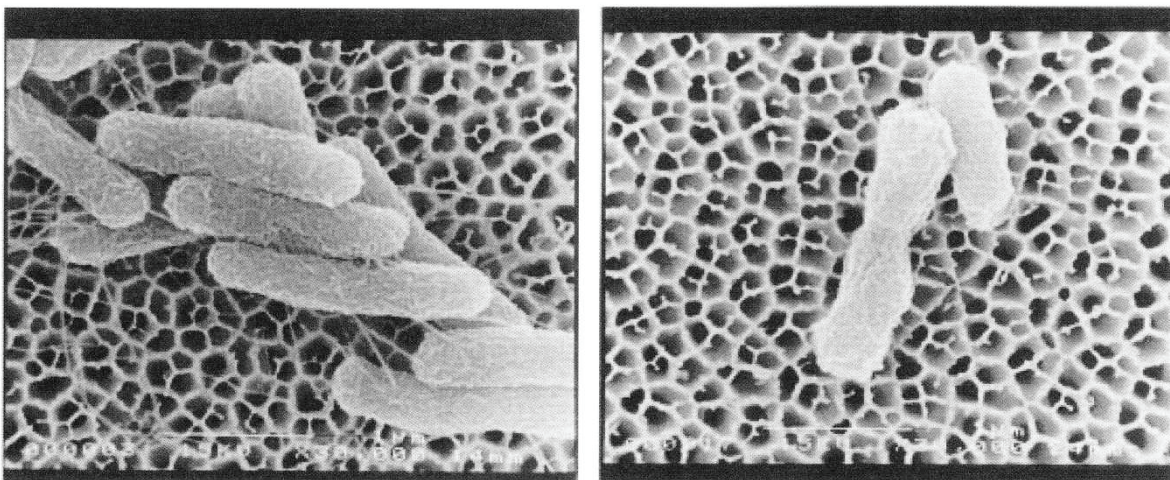


Abbildung 1: *E. coli* vor (links) und nach (rechts) der Behandlung mit CO₂ (5 MPa, 35 °C, 15 min) (Ballestra et al., 1996)

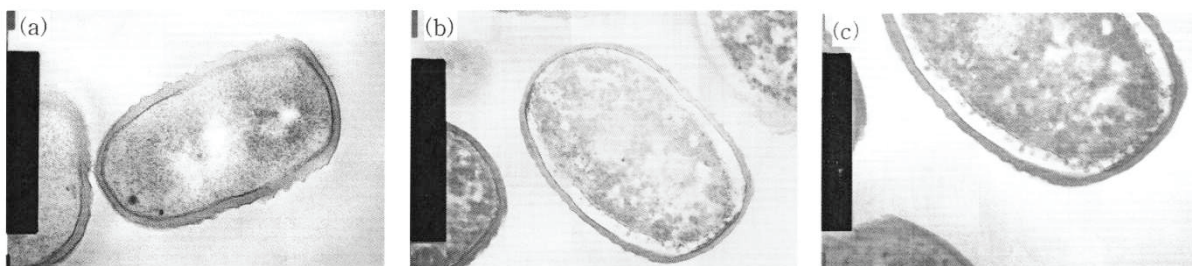


Abbildung 2: *L. plantarum* vor (a) und nach (b, c) der Behandlung mit CO₂ (70 kg/cm², 30 °C, 1 h) (Hong et al., 1999)

2.2 Apparaturen zur Keimreduzierung

Bei der Anwendung von überkritischem Kohlendioxid wird grundsätzlich zwischen zwei Verfahren unterschieden: dem diskontinuierlichen (Batch) und dem kontinuierlichen.

In der Abbildung 3 ist das Verfahren nach Zhong et al. (2008) dargestellt. Sie untersuchten die Inaktivierung von *Escherichia coli* K-12 auf frischen Spinatblättern. Die Ausgangskeimzahl, mit der das Produkt belegt wurde, betrug 8,3 log kbE/ml. Nach einer Trocknungsphase von 2 Stunden behandelten sie den Spinat im Batch-Verfahren mit Kohlendioxid über unterschiedliche Zeiten und Drücke bei jeweils 40 °C. Es zeigte sich, dass schon bei 7,5 MPa ein deutlicher Rückgang der Population zu erkennen war. Diese Annahme beschränkt sich allerdings auf die oberflächliche Kontamination.

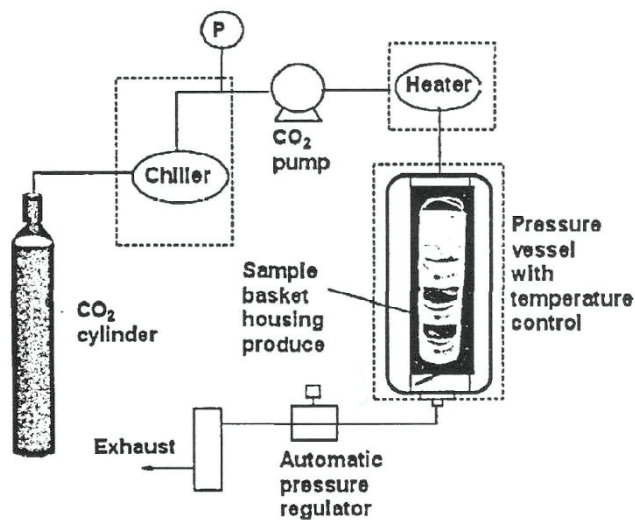


Abbildung 3: Schema des Batch-Verfahrens nach Zhong et al. (2008)

Die meisten Studien wurden mit Bakterienkulturen in flüssigen Medien durchgeführt. So erreichten Liao et al. (2007) bei Behandlung von *Escherichia coli* in Apfelsaft bei 20 MPa und 37 °C eine Absenkung der Keimzahl von mehr als 3 log innerhalb von 15 Minuten. Die Behandlung von *Lactobacillus plantarum* in 0,1 M PBS bei 10,3 MPa und 30 °C führte zu einer Reduzierung der Keimzahl um 2 log innerhalb von 10 Minuten (Hong et al., 1999).

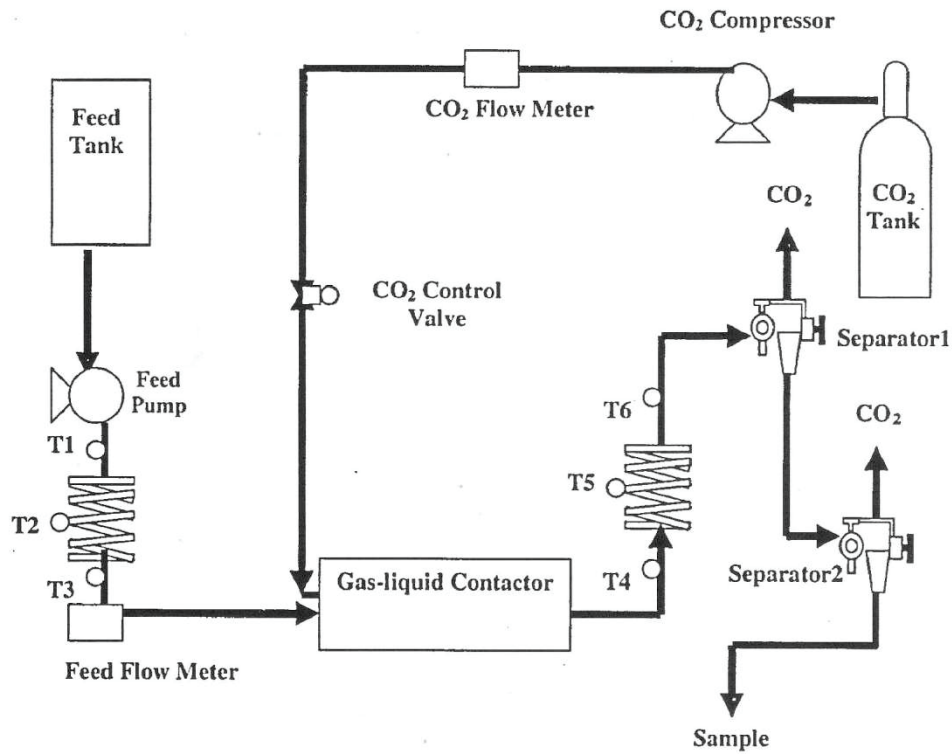


Abbildung 4: Schema des kontinuierlichen Verfahrens nach Yuk et al. (2009)

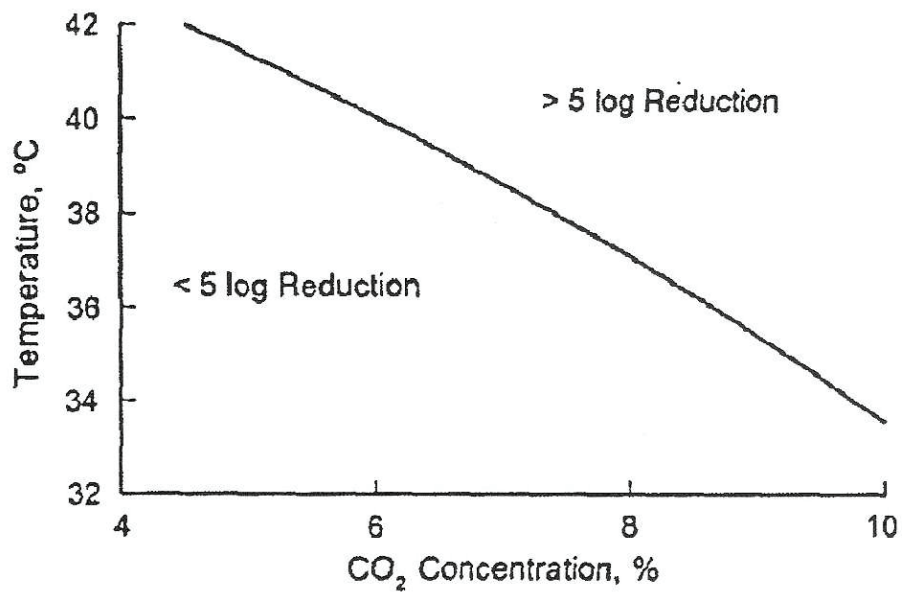


Abbildung 5: Abhängigkeit der Keimreduzierung von CO₂-Konzentrationen und Temperatur bei konstantem Druck (Yuk et al., 2009)

Yuk et al. (2009; 2010; 2011) beschrieben die Entwicklung eines kontinuierlichen Verfahrens (Abbildung 4) zur Behandlung flüssiger Medien mit überkritischen Kohlenstoffdioxid. Sie untersuchten zunächst die Keimreduzierung von *Escherichia coli* K-12 in 0,1 % BPW. Der Druck bei allen Versuchen betrug konstant 7,58 MPa über eine Zeit von 20 Minuten. Die Temperatur und die Konzentration des Kohlenstoffdioxids wurden variiert. Bei 8,2 wt% Kohlenstoffdioxid und 42 °C wurde die maximale Keimreduzierung von 5,8 log erreicht. Man stellt fest, dass ein Zusammenhang zwischen Temperatur und CO₂-Konzentration in Bezug auf Minimierung der Keimzahl besteht. Dieser ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Versuche mit *Escherichia coli* K-12 und *Lactobacillus plantarum* in Apfel-Cider bestätigten die Abhängigkeit der Keimreduzierung von Temperatur und CO₂-Konzentration (Abb. 6).

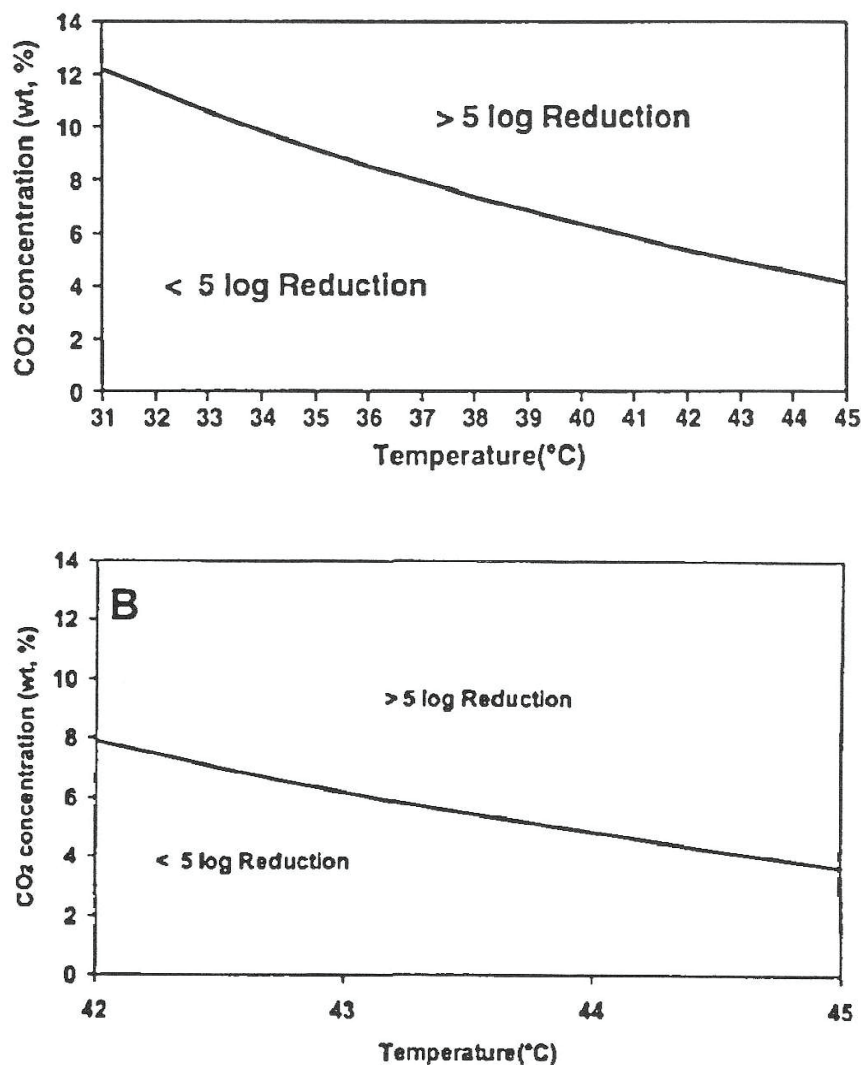


Abbildung 6: Abhängigkeit der Keimreduzierung von CO₂-Konzentrationen und Temperatur bei konstantem Druck; oben *E. coli* K12, unten *L. plantarum* (Yuk et al., 2010, 2011)

3 Material und Methoden

3.1 Behandlung mit überkritischem Kohlenstoffdioxid

Die Versuche wurden mit der SFT-100XW, einer diskontinuierlichen Anlage der Firma Super-critical Fluid Technologies Inc. (Newark, DE, USA) durchgeführt. Die Anlage arbeitet in einem Druckbereich von 0-10000 psi und einem Temperaturbereich von 0-150 °C. Die maximale Durchflussrate beträgt 24,00 ml/min. Zu der Anlage gehören zwei Druckbehälter, einer mit einem Nennvolumen von 500 ml und einer mit 50 ml. Beide Behälter sind für einen Betriebsdruck von 10000 psi und einer Betriebstemperatur von 200 °C ausgelegt. Der Sicherheitszuschlag beträgt jeweils 25 %, also 12500 psi und 250 °C. Der Aufbau der Anlage ist schematisch in der Abbildung 7 dargestellt.

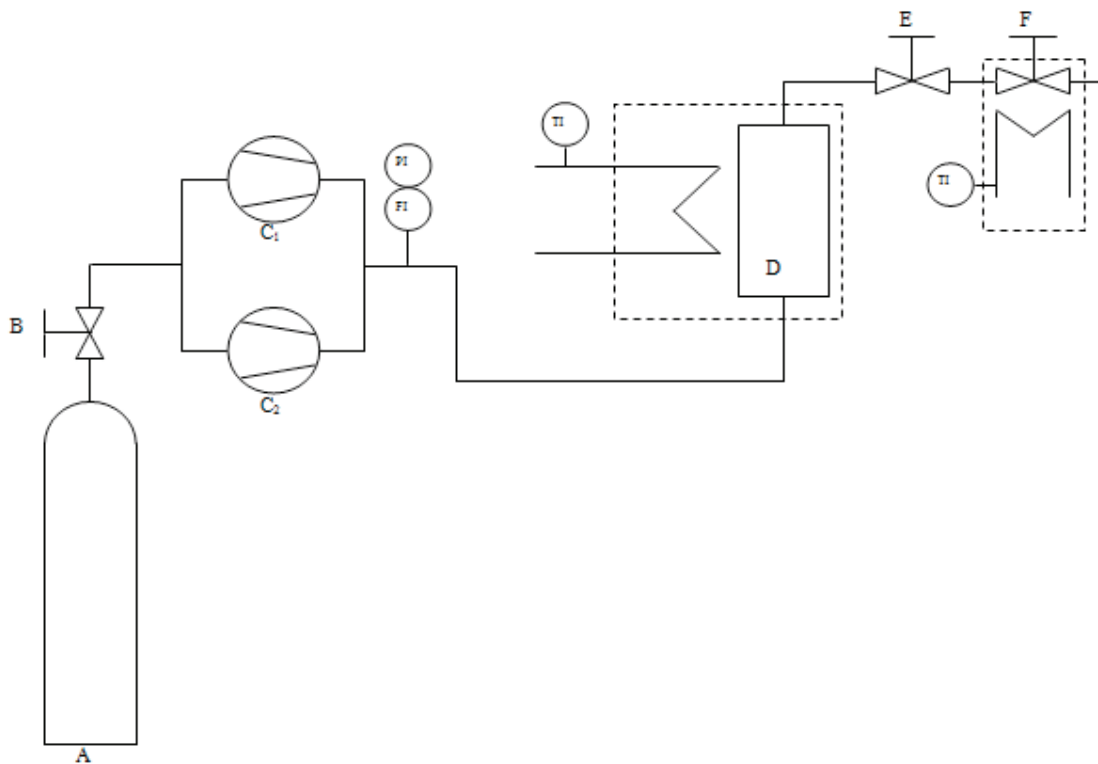


Abbildung 7: Schema der SFT-100XW

Bevor die Anlage mit Gas befüllt wird, muss die Lüftung für den Peltierkühler 20 min laufen. Der Schalter hierfür befindet sich unterhalb des Bedienfeldes an der Frontseite des Pumpmoduls. Am Bedienfeld kann durch das Drücken der Taste MODE zwischen den einzelnen Anzeigen gewechselt werden. Dabei steht eine blinkende LED für den aktuellen Wert, eine dauerhaft

leuchtende LED für den Sollwert, welcher durch das Betätigen der Pfeiltasten eingestellt werden kann. Die Versuche wurden alle bei 1160 psi ($\approx 7,998$ MPa) und 24,00 ml/min durchgeführt. Während des Kühlvorganges wird die zu behandelnde Probe in den Druckbehälter (D) eingefüllt, dieser in das Ofenmodul eingesetzt und mit den Zu- und Ableitungen verbunden. Es werden beide Heizungen am Ofenmodul eingeschaltet. Die Solltemperatur kann durch Drücken der Sternchentaste und gleichzeitiger Betätigung der Pfeiltasten eingestellt werden. In allen Versuchen wurde mit einer konstanten Temperatur von 35 °C gearbeitet. Nach Erreichen der Solltemperatur und dem Ablauf der 20 min Kühlzeit wird das Absperrventil (B) an der Druckgasflasche (A) geöffnet. Sobald sich der Druck gleichmäßig im System ausgebreitet hat, kann die Doppelkopfpumpe (C₁, C₂) durch das Betätigen der Taste RUN/STOP gestartet werden. Hinter der Pumpe befindet sich der Sensor für den Druck und den Durchfluss. Das komprimierte Gas wird durch eine Heizspirale geführt und auf die Solltemperatur erwärmt. Gleichzeitig wird der Kopfraum des Druckbehälters von außen über einen Luftschacht beheizt. Das Kohlenstoffdioxid gelangt in den Druckbehälter und somit in Kontakt mit der zu behandelnden Probe. Beim Erreichen des Solldruckes regelt die Pumpe automatisch ab. Nach Ablauf der Haltezeit wird die Pumpe durch das Betätigen der Taste RUN/STOP abgeschaltet und das Absperrventil (B) geschlossen. Anschließend werden die Ventile (E, F) geöffnet und der Druck abgelassen. Dabei ist zu beachten, dass die Temperatur des Drosselventils (F) nicht zu stark absinkt, um ein Vereisen zu vermeiden. Je nach Versuch wird der gesamte Vorgang entsprechend oft durchgeführt.

Die ersten beiden Versuche wurden mit dem größeren Druckbehälter durchgeführt. Hierbei wurden jeweils 25,00 g des zu behandelnden Tees eingefüllt. Aufgrund von technischen Problemen mit dem Druckaufbau, welche während der Bearbeitungszeit dieser Studie nicht behoben werden konnten, musste anschließend mit dem kleineren Druckbehälter weiter gearbeitet werden, woraus sich eine deutlich kleinere Einwaage (5,15 g) ergab. Die einzelnen Parameter der Versuche sind in der Tabelle 1 zusammengefasst. Um die Druckaufbauphase zu beschleunigen wurde im Fast Packing Modus gearbeitet, das heißt die Pumpenleistung wird für diesen Versuchsabschnitt über ihre durchschnittliche Leistung hinaus gesteigert. Diesen Modus erreicht man, indem beim Einschalten des Hauptschalters an der Rückseite des Pumpenmoduls gleichzeitig die Tasten PRIME und PFEIL NACH UNTEN betätigt. Am Display wird dann der eingestellte Modus (0 = Fast Packing On) und der Steigerungsgrad in Prozent angezeigt. Mit den Tasten MODE (Fast Packing Off) und PRIME (Fast Packing On) kann man den gewünschten Modus einstellen. Mittels des Betätigens der Taste RUN/STOP gelangt man wieder in den normalen Betriebsmodus.

Durch die Verwendung eines anderen Reaktionsgefäßes ergaben sich deutliche Unterschiede in den Druckaufbau- und Entspannungsphasen, wie man der Abbildung 8 entnehmen kann.

Tabelle 1: Parameter der Behandlung mit scCO₂

Versuch	Behältergröße	Temperatur	Druck	Flussrate	Fast Packing	Zeit
1	500 ml	35 °C	1160 psi	24,00 ml/min	On, 250	2 h
2	500 ml	35 °C	1160 psi	24,00 ml/min	On, 250	1 h
3	50 ml	35 °C	1160 psi	24,00 ml/min	On, 250	2x 1 h; 0,5 h Pause
4	50 ml	35 °C	1160 psi	24,00 ml/min	On, 250	2x 1 h; 1 h Pause
5	50 ml	35 °C	1160 psi	24,00 ml/min	On, 250	2x 1 h; 1 h Pause

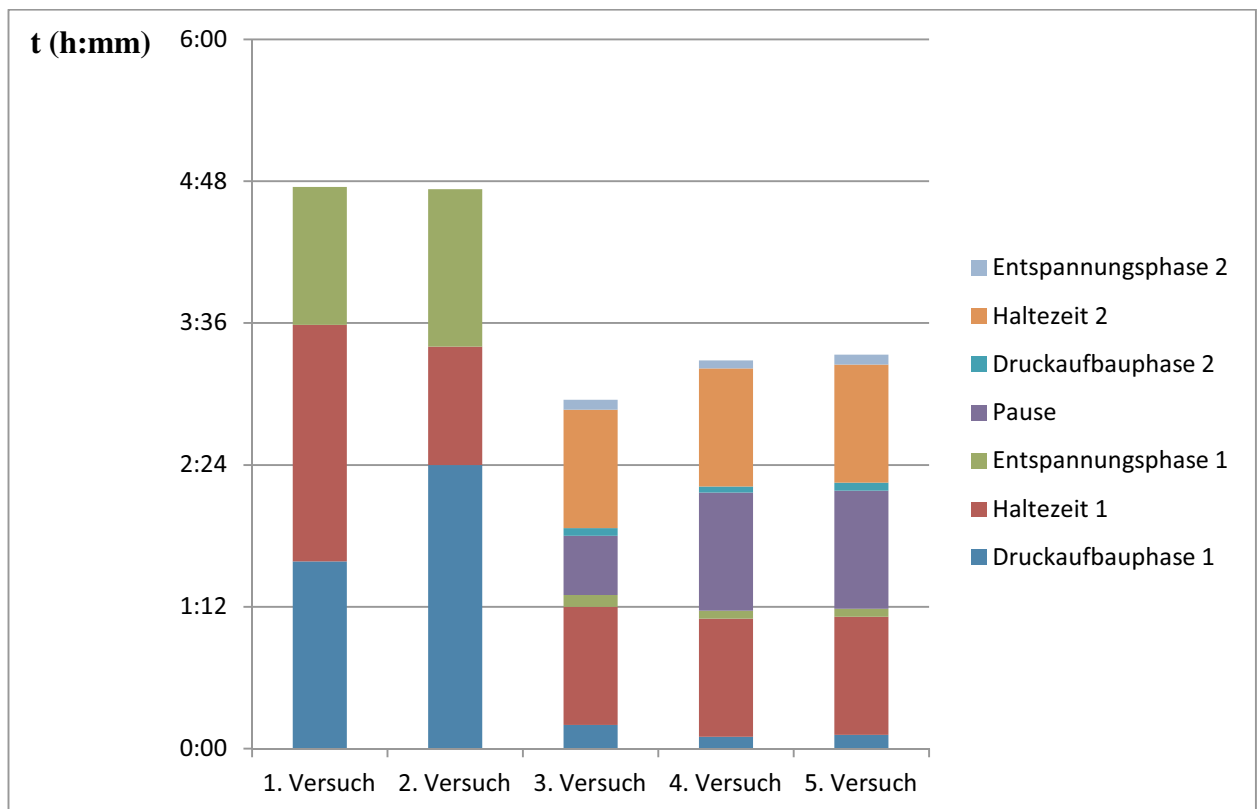


Abbildung 8: Zeitverläufe bei der Behandlung mit überkritischen Kohlenstoffdioxid

Nach dem Ablauf der jeweils letzten Entspannungsphase wurde der Druckbehälter aus der Anlage entnommen und die Anschlüsse mit Parafilm und Aluminiumfolie abgedeckt.

3.2 Mikrobiologische Untersuchung

Die Mikrobiologische Auswertung erfolgte für die Versuche mit dem 500 ml Behälter aus zeitlichen Gründen erst am nächsten Tag, für die anderen gleich im Anschluss an die Behandlung mit dem überkritischen Kohlenstoffdioxid.

Die Proben wurden auf die Gesamtkeimzahl, Bakteriosporen, Enterobacter, sowie Hefen und Schimmelpilze untersucht. Für die GKZ und Bakteriosporen wurde Caso-Agar (40 g/L), für die Enterobacter Endo-Agar (36,4 g/L) und für die Hefen und Schimmelpilze Sabouraud Dextrose (4%)-Agar (65 g/L) verwendet. Zum Ansetzen der Nährlösung wurden zunächst jeweils 500 ml entionisiertes Wasser erwärmt, dann die entsprechende Menge Nährmedium in Bechergläser eingewogen und anschließend mittels Magnetrührer im Wasser gelöst. Die Bechergläser wurden mit 100 ml Wasser gespült, welches der Nährlösung zugegeben wurde, sodass je Ansatz 600 ml Wasser verwendet wurde. Für die Verdünnungsreihe wurde 2,55 g Natriumchlorid mittels Magnetrührer in 300 ml entionisiertem Wasser gelöst und anschließend für die Versuche 1 und 2 90 ml in einen Erlenmeyerkolben pipettiert, für die Versuche 3-5 jeweils 45 ml. Die restliche Kochsalzlösung wurde zu je 9 ml in Reagenzgläser pipettiert. Die Erlenmeyerkolben und Reagenzgläser wurden mit Aluminiumstopfen verschlossen. Die Endo-Agar-Lösung wurde 40 min im Dampftopf bei 100 °C thermisiert, die anderen Nährlösungen und die Kochsalzlösung, sowie ein Becherglas, ein Spatel und ein Glasrührstab für 15 min bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert. Nach der Sterilisierung bzw. Thermisierung wurden die Nährlösungen im Wasserbad bei 50 °C temperiert. Die Kochsalzlösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt.

In das sterile Becherglas wurden 10,00 g bzw. 5,00 g Tee eingewogen und mit der Kochsalzlösung aus dem Erlenmeyerkolben übergossen. Anschließend wurde die Mischung mit dem Glasrührstab gründlich durchmischt. Damit ergab sich eine 10^1 - Verdünnung der zu untersuchenden Probe. Die Lösung wurde bis zur Stufe 10^8 verdünnt.

Für die Bestimmungen der Hefen und Schimmelpilze wurde der Sabouraud Dextrose (4%)-Agar in Petrischalen gegossen. Nach dem Auskühlen des Agars wurde je Verdünnungsstufe drei Schalen mit jeweils 0,1 ml beimpft, welche mit dem Drigalski-Spatel verstrichen wurden. Nach dem Antrocknen der Probelösung wurden die Petrischalen kopfüber für 24 h im Brutschrank bei 30 °C inkubiert.

Die Bestimmungen der Gesamtkeimzahl und Enterobacter, sowie der Bakteriosporen erfolgte im Plattengussverfahren. Dazu wurde je Verdünnungsstufe 1,0 ml in die Petrischale gegeben und anschließend die Agar-Lösung aufgegossen. Durch das vorsichtige Umschwenken der Schalen vermischte sich die Probelösung mit dem Agar. Vor dem Pipettieren der Bakteriosporen-Lösung wurde diese für 15 min bei 85 °C im Wasserbad wärmebehandelt und anschließend wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach dem Aushärten des Agars erfolgte die Inkubation kopfüber für 48 h bei 37 °C.

Die Bestimmung der Ausgangskeimzahl erfolgt dementsprechend.

4 Ergebnisse

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Petrischalen ausgezählt und aus den Einzelergebnissen mittels der im Beispiel angeführten Formel der gewichtete Mittelwert, sowie die Keimbelastung in kbE/g Tee berechnet.

Beispiel: Berechnung der Ausgangskeimzahl (GKZ) für 10 g Tee

$$\bar{x}_{\text{gew}} = \frac{2940+2304+2260+367+329+40+41+38+1+1+2+1}{3,23301} = 2575$$

Hier ist die Verdünnungsstufe 10^1 maßgebend, dass heißt der gewichtete Mittelwert entspricht der Belastung von 0,1 g Tee, somit muss dieses Zwischenergebnis mit 10 multipliziert werden, um den Wert für 1 g Tee zu erhalten. Aufgrund von Rundungsfehlern beträgt dieser im Beispiel 25747 kbE/g Tee. Die Werte für alle Versuchsreihen können dem Anhang II entnommen werden.

Aus den Werten der Keimbelastung kann noch kein direkter Schluss auf den Erfolg der Behandlung mit überkritischem Kohlenstoffdioxid geschlossen werden. Daher wurden im Anschluss an die Versuche die Überlebensraten für die einzelnen Gruppen von Mikroorganismen berechnet und die Werte graphisch dargestellt (Abb.9-12). Um die Auswertung zu erleichtern sind alle Abbildungen im gleichen Maßstab angefertigt. Die Berechnung der Überlebensrate erfolgte nach folgender Formel:

$$\ddot{U}L = -\log(N_0/N)$$

Dabei steht N für Keimbelastung der Versuchsreihe und N_0 für die zugehörige Ausgangskeimzahl. Die Zahlenwerte können dem Anhang III entnommen werden.

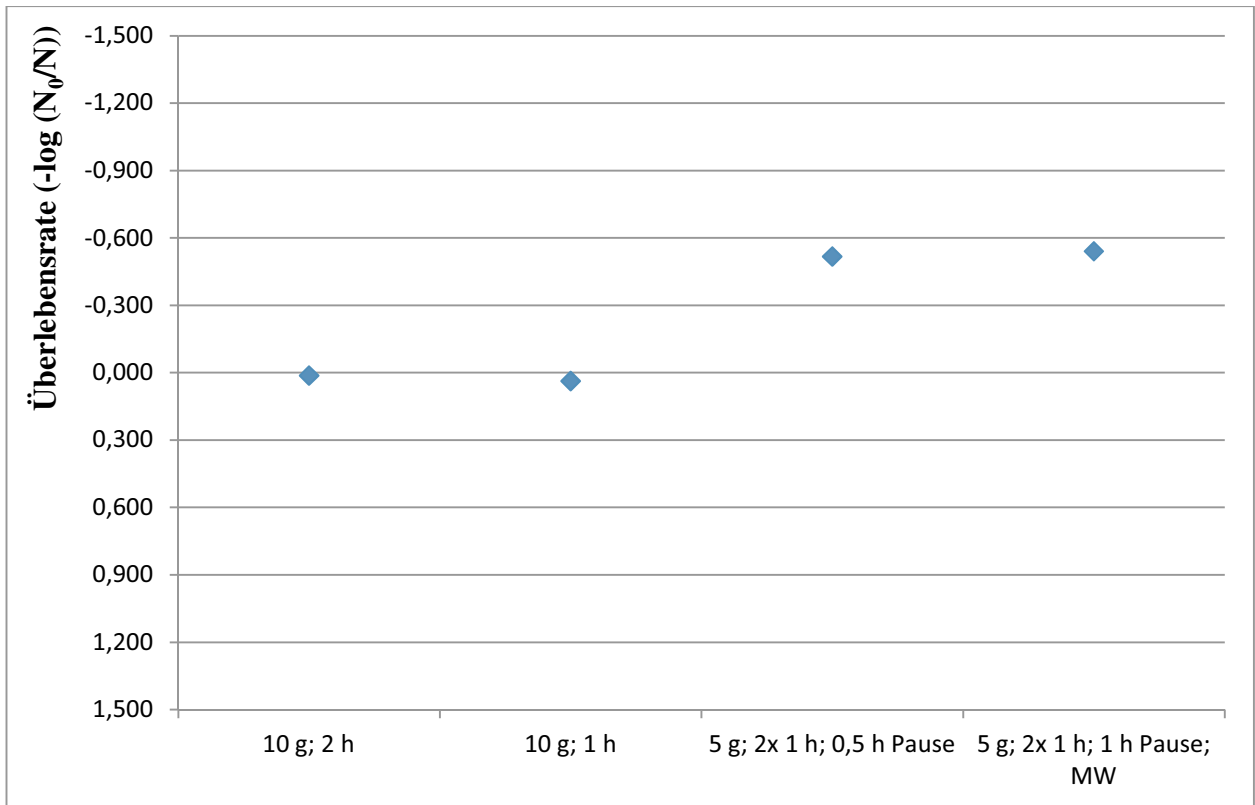


Abbildung 9: Überlebensraten (GKZ) in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer mit scCO₂

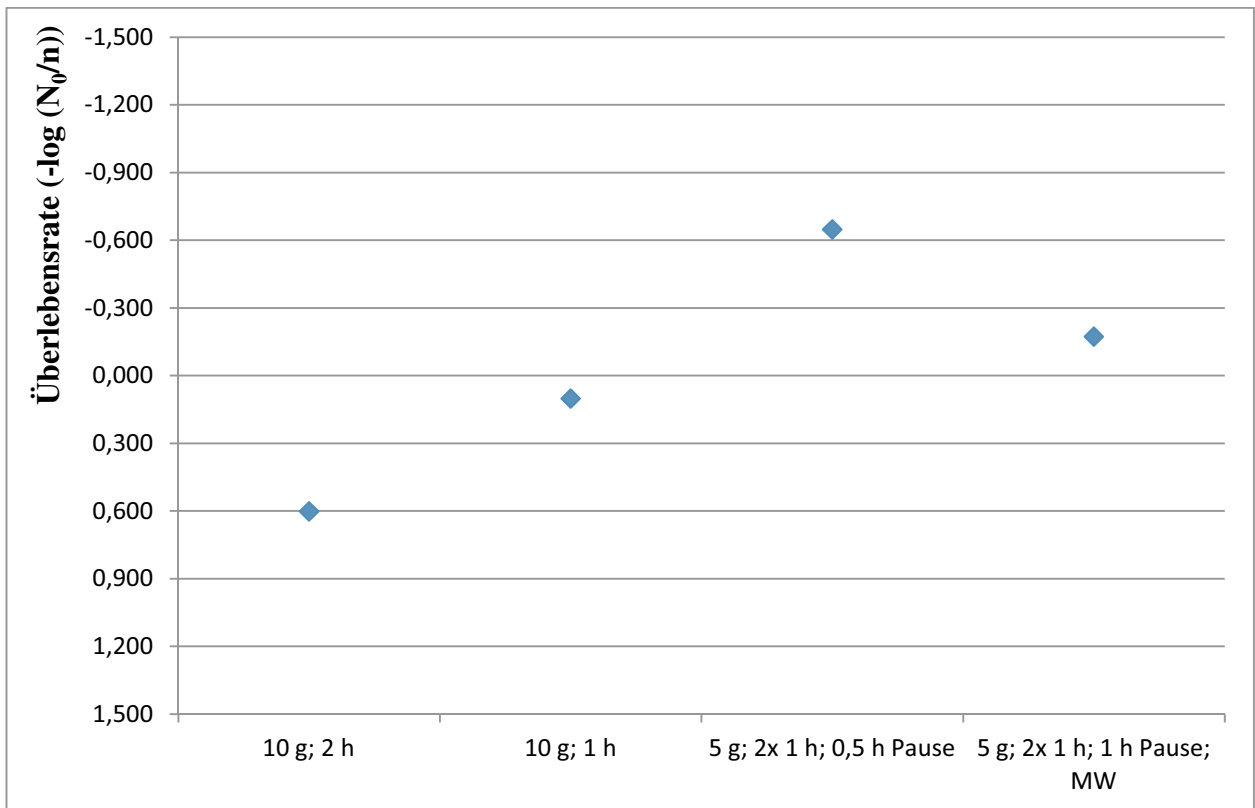


Abbildung 10: Überlebensraten (Hefen & Schimmelpilze) in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer mit scCO₂

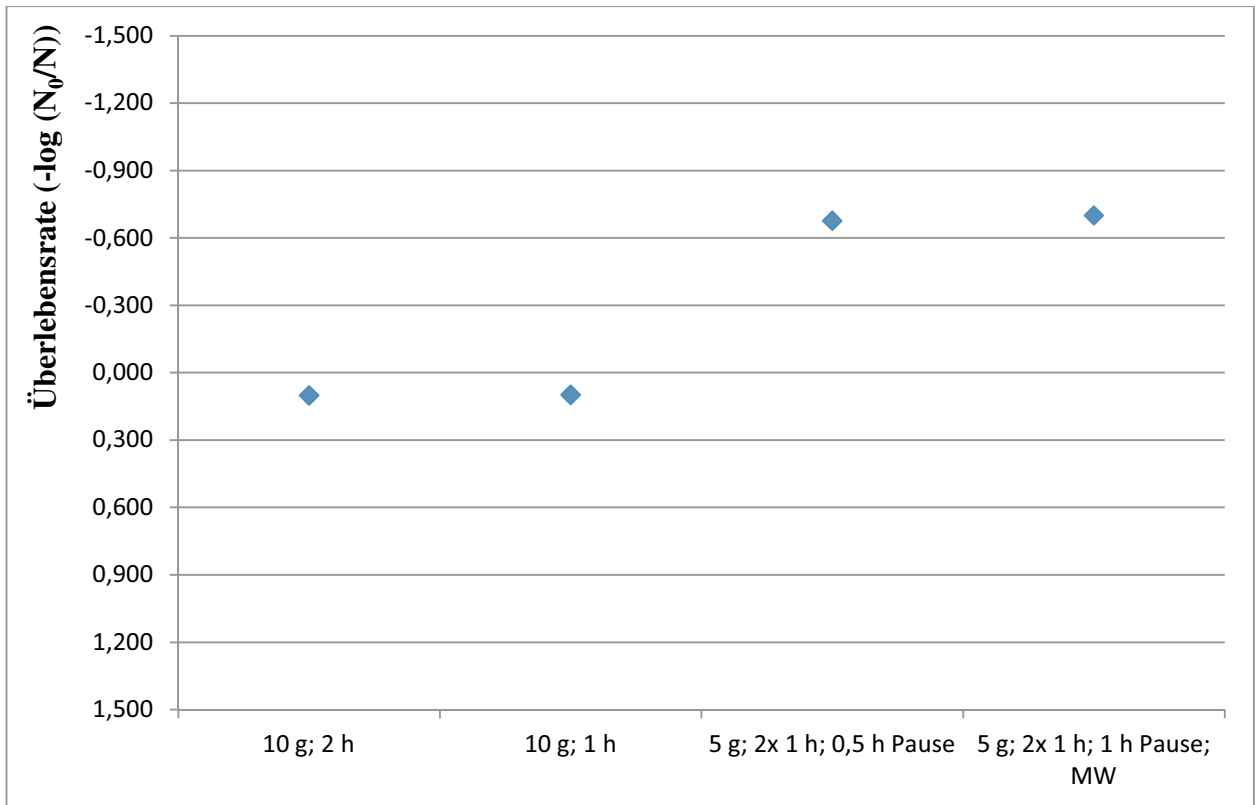


Abbildung 11: Überlebensraten (Enterobacter) in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer mit scCO₂

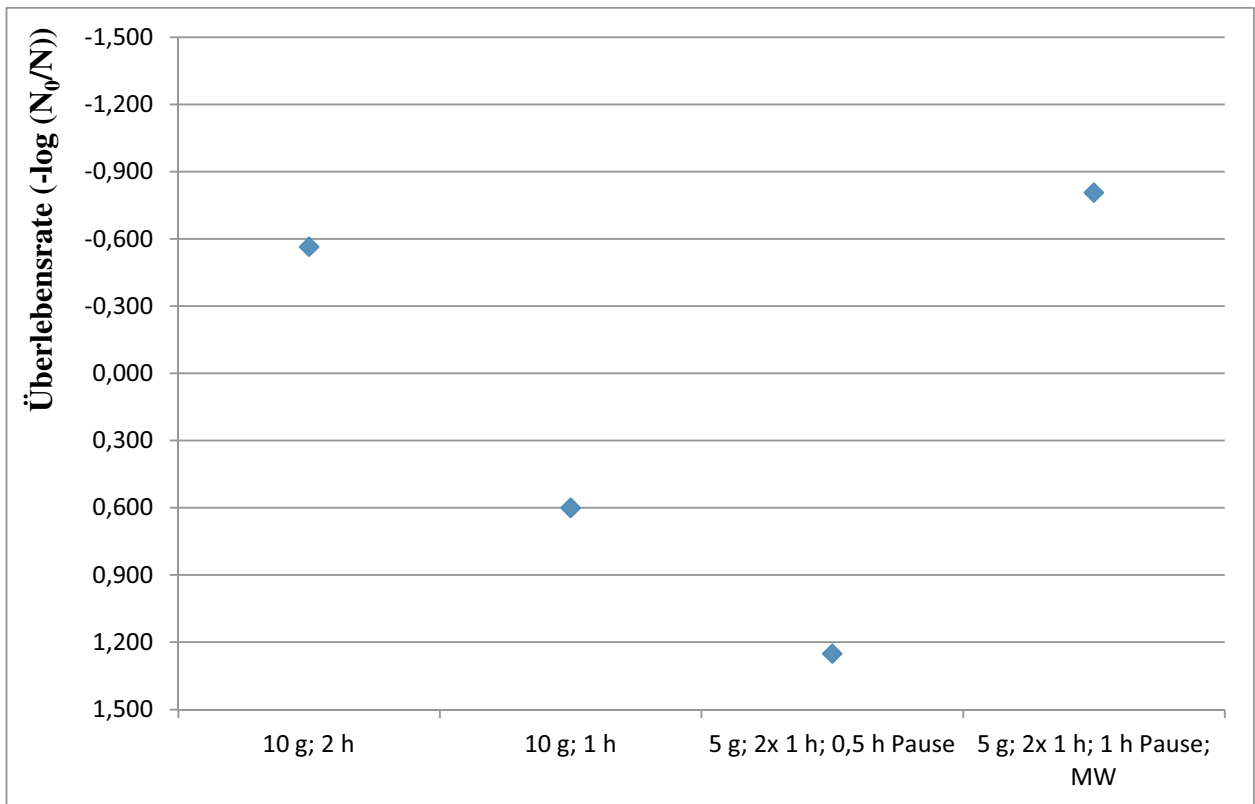


Abbildung 12: Überlebensraten (Bakteriosporen) in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer mit scCO₂

5 Diskussion

Die Werte der Überlebensraten zeigen, dass sich tendenziell auch an trockenen, empfindlichen Rohstoffen eine Keimreduzierung mit überkritischem Kohlenstoffdioxid. Sie belegen aber auch, dass die Keimminderung noch nicht in ausreichendem Maße erreicht wurde, da eine maximale Reduzierung um 0,808 log (vergleiche Abb.12 und Tabelle 34, Bakteriosporen) nicht signifikant genug ist.

Gerade bei den Versuchen mit dem 500 ml Druckbehälter zeigt sich dass sich trotz unterschiedlicher Haltezeiten eine annähernd gleiche Behandlungsdauer ergab, da die Druckaufbauphase im zweiten Versuch (Abb. 8) wesentlich länger dauerte. Hierdurch verfälschen sich natürlich auch die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen, da auch während des Druckauf-/abbaus eine Wirkung des Kohlenstoffdioxids nicht ausgeschlossen ist.

Die Anzahl der durchgeführten Versuche reicht zudem nicht aus, um eine hinreichend aussagekräftige Fehlerwertberechnung durchzuführen. Hinzu kommt, dass bei den Versuchen mit dem 50 ml Druckbehälter die Probenmenge in Relation zur Packungsgröße sehr gering ist. Sie reicht ferner nicht aus, um eine zweite oder gar dritte mikrobiologische Auswertung von einer Behandlung durchzuführen.

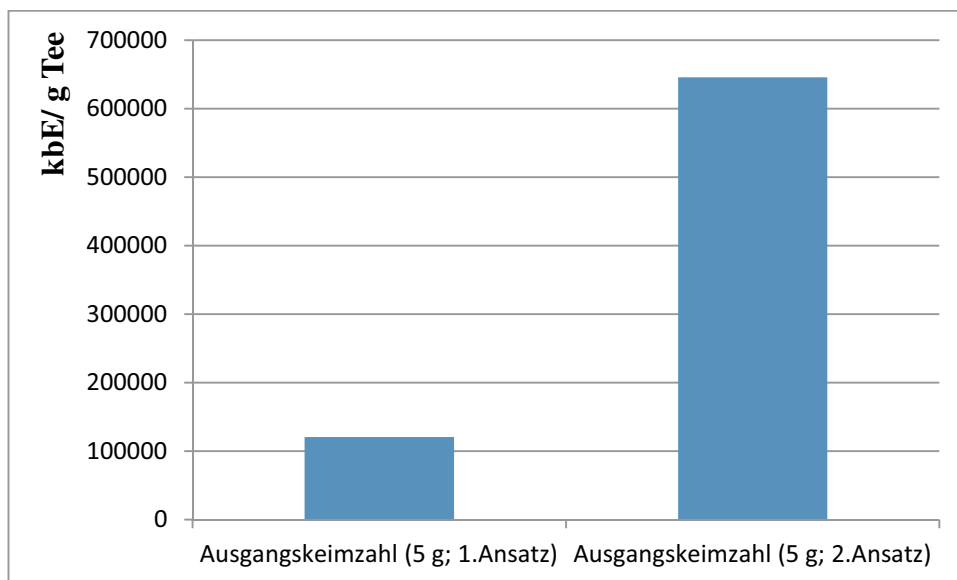


Abbildung 13: Darstellung der Ausgangskeimbelastung mit Hefen & Schimmelpilzen

Ein weiterer Punkt, der die Zuverlässigkeit der Bestimmung der Keimbelastung minimiert, ist die erste Verdünnungsstufe. Es zeigte sich, dass die zugegebene Menge Natriumchloridlösung nicht ausreichte, um den Tee vollständig zu bedecken. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Mikroorganismen ungleichmäßig in der Probenlösung verteilt waren, was solche

Differenzen wie in Abbildung 13 dargestellt, zwischen zwei an sich gleichen Versuchsreihen zur Folge haben kann.

Aus den Abbildungen 9-12 wird ersichtlich, dass die verschiedenen Mikroorganismen unterschiedlich auf die Behandlung mit überkritischem Kohlenstoffdioxid ansprechen. Während die Gesamtkeimzahl, sowie die Belastung mit Enterobacter und Bakteriosporen bei der Behandlung über zweimal eine Stunde mit einer Stunde Pause am stärksten zurückgeht, trifft dies für die Hefen und Schimmelpilze auf die Behandlung mit einer Unterbrechung von 0,5 Stunden zu. Dies bestätigt die Hypothese nach Liao et al. (2007). Die Minimierung der Überlebensrate ist im Vergleich zu Yuk et al. (2009, 2010, 2011) aber weit hinter den Erwartungen zurückgeblieben.

Der Einfluss der pH-Wert-Änderung konnte aufgrund der zu geringen Flüssigkeitsmenge nicht untersucht werden.

Für weitere Untersuchungen wird die Verwendung des 500 ml Druckbehälters und einer hinreichend großen Probeneinwaage empfohlen. Es sind insbesondere die Versuche mit der Behandlungsunterbrechung interessant, wobei der Parameter Temperatur eventuell noch variiert werden kann.

Die mikrobiologische Untersuchung sollte aus einer Anfangsverdünnung von 1:19 heraus erfolgen, um eine gleichmäßigere Verteilung der Keime zu gewährleisten.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war die Reduzierung der Keimbelastung empfindlicher Rohstoffe mittels der Behandlung mit überkritischem Kohlenstoffdioxid. Mit diesem non-thermalen Verfahren sollen die Inhaltsstoffe bei gleichzeitiger Erhöhung der Haltbarkeit geschont werden. Die Versuche wurden im Batch-Verfahren bei konstanten Drücken und Temperaturen, sowie der Variation der Prozesszeiten durchgeführt.

Ausgehend von vorangegangenen Studien wurde eine Minimierung der Keimbelastung von 5 log angestrebt. Erreicht wurden nur maximal 0,808 log. Es bestätigte sich jedoch die Vermutung, dass die Mikroorganismen unterschiedlich stark auf die Behandlung mit überkritischem Kohlenstoffdioxid ansprechen. Probleme traten in der Zuverlässigkeit der Versuchsanlage und der Wiederholbarkeit der Versuche auf.

Sensorische Untersuchungen und physikalische Analysen wurden nicht durchgeführt.

7 Literaturverzeichnis

Ballestra, P.; Silva, A. A. D.; Cuq, J. L.: Inactivation of *Escherichia coli* by carbon dioxide under pressure. *Journal of Food Science* 61 (1996), Nr. 4, S. 829-831

Gunes, G.; Blum, L. K., Hotchkiss, J.H.: Inactivation of *Escherichia coli* (ATCC 4157) in diluted apple cider by dense-phase carbon dioxide. *Journal of Food Protection* 69 (2006), Nr. 1, S. 12-16

Hong, S.-I.; Park, W. S.; Pyun, Y. R.: Non-thermal inactivation of *Lactobacillus plantarum* as influenced by pressure and temperature of pressurized carbon dioxide. *International Journal of Food Science and Technology* 34 (1999), Nr. 2, S. 125-130

Liao, H; Hu, X.; Liao, X.; Chen, F.; Wu, J.: Inactivation of *Escherichia coli* inoculated into cloudy apple juice exposed to dense phase carbon dioxide. *International Journal of Food Microbiology* 118 (2007), Nr. 2, S.126-131

Spilimbergo, S.; Elvassore, N.; Bertucco, A.: Microbial inactivation by high-pressure. *Journal of Supercritical Fluids* 22 (2002), Nr. 1, S. 55-63

Yuk, H.-G.; Geveke, D. J.: Nonthermal inactivation and sublethal injury of *Lactobacillus plantarum* in apple cider by a pilot plant scale continuous supercritical carbon dioxide system. *Food Microbiology* 28 (2011), Nr. 3, S. 377-383

Yuk, H.-G.; Geveke, D. J.; Zhang, H.Q.: Efficacy of supercritical carbon dioxide for nonthermal inactivation of *Escherichia coli* K12 in apple cider. *International Journal of Food Microbiology* 138 (2010), Nr. 1, S. 91-99

Yuk, H.-G.; Geveke, D. J.; Zhang, H. Q.: Non-thermal inactivation of *Escherichia coli* K12 in buffered peptone water using a pilot-plant scale supercritical carbon dioxide system with a gas-liquid porous metal contactor. *Food Control* 20 (2009), Nr. 9, S. 847-851

Zhong, Q. Research Notes - Nonthermal Inactivation of *Escherichia coli* K-12 on spinach leaves, using dense phase carbon dioxide. *Journal of Food Protection* 71 (2008), Nr. 5, S. 1015-1017

8 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: <i>E. coli</i> vor (links) und nach (rechts) der Behandlung mit CO ₂ (5 MPa, 35 °C, 15 min) (Ballestra et al., 1996).....	7
Abbildung 2: <i>L. plantarum</i> vor (a) und nach (b, c) der Behandlung mit CO ₂ (70 kg/cm ² , 30 °C, 1 h) (Hong et al., 1999)	7
Abbildung 3: Schema des Batch-Verfahrens nach Zhong et al. (2008).....	8
Abbildung 4: Schema des kontinuierlichen Verfahrens nach Yuk et al. (2009).....	9
Abbildung 5: Abhängigkeit der Keimreduzierung von CO ₂ -Konzentrationen und Temperatur bei konstantem Druck (Yuk et al., 2009)	9
Abbildung 6: Abhängigkeit der Keimreduzierung von CO ₂ -Konzentrationen und Temperatur bei konstantem Druck; oben <i>E. coli</i> K12, unten <i>L. plantarum</i> (Yuk et al., 2010, 2011)	10
Abbildung 7: Schema der SFT-100XW	11
Abbildung 8: Zeitverläufe bei der Behandlung mit überkritischen Kohlenstoffdioxid	13
Abbildung 9: Überlebensraten (GKZ) in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer mit scCO ₂ ..	17
Abbildung 10: Überlebensraten (Hefen & Schimmelpilze) in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer mit scCO ₂	17
Abbildung 11: Überlebensraten (Enterobacter) in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer mit scCO ₂	18
Abbildung 12: Überlebensraten (Bakteriosporen) in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer mit scCO ₂	18
Abbildung 13: Darstellung der Ausgangskeimbelastung mit Hefen & Schimmelpilzen.....	19

Tabelle 1: Parameter der Behandlung mit scCO ₂	13
Tabelle 2: Ausgangskeimzahl (GKZ) in 10 g Tee	26
Tabelle 3: Ausgangskeimzahl (Hefen) in 10 g Tee.....	26
Tabelle 4: Ausgangskeimzahl (Enterobacter) in 10 g Tee	26
Tabelle 5: Ausgangskeimzahl (Bakteriosporen) in 10 g Tee	27
Tabelle 6: Keimzahl (GKZ) in 10 g Tee; 2 h	27
Tabelle 7: Keimzahl (Hefen) in 10 g Tee; 2 h.....	27
Tabelle 8: Keimzahl (Enterobacter) in 10 g Tee; 2 h.....	28
Tabelle 9: Keimzahl (Bakteriosporen) in 10 g Tee; 2 h.....	28
Tabelle 10: Keimzahl (GKZ) in 10 g Tee; 1 h	28
Tabelle 11: Keimzahl (Hefen) in 10 g Tee; 1 h.....	29
Tabelle 12: Keimzahl (Enterobacter) in 10 g Tee; 1 h.....	29
Tabelle 13: Keimzahl (Bakteriosporen) in 10 g Tee; 1 h.....	29
Tabelle 14: Ausgangskeimzahl (GKZ) in 5 g Tee; 1. Ansatz	30
Tabelle 15: Ausgangskeimzahl (Hefen) in 5 g Tee; 1. Ansatz.....	30
Tabelle 16: Ausgangskeimzahl (Enterobacter) in 5 g Tee; 1. Ansatz.....	30
Tabelle 17: Ausgangskeimzahl (Bakteriosporen) in 5 g Tee; 1. Ansatz.....	31
Tabelle 18: Ausgangskeimzahl (GKZ) in 5 g Tee; 2. Ansatz	31
Tabelle 19: Ausgangskeimzahl (Hefen) in 5 g Tee; 2. Ansatz.....	31
Tabelle 20: Ausgangskeimzahl (Enterobacter) in 5 g Tee; 2. Ansatz.....	32
Tabelle 21: Ausgangskeimzahl (Bakteriosporen) in 5 g Tee; 2. Ansatz.....	32
Tabelle 22: Keimzahl (GKZ) in 5 g Tee; 2x 1 h, 30 min Pause.....	32
Tabelle 23: Keimzahl (Hefen) in 5 g Tee; 2x 1 h, 30 min Pause	33
Tabelle 24: Keimzahl (Enterobacter) in 5 g Tee; 2x 1 h, 30 min Pause	33
Tabelle 25: Keimzahl (Bakteriosporen) in 5 g Tee; 2x 1 h, 30 min Pause	33
Tabelle 26: Keimzahl (GKZ) in 5 g Tee; 2x 1 h, 1 h Pause, 1. Ansatz.....	34
Tabelle 27: Keimzahl (Hefen) in 5 g Tee; 2x 1 h, 1 h Pause, 1. Ansatz	34
Tabelle 28: Keimzahl (Enterobacter) in 5 g Tee; 2x 1 h, 1 h Pause, 1. Ansatz	34
Tabelle 29: Keimzahl (Bakteriosporen) in 5 g Tee; 2x 1 h, 1 h Pause, 1. Ansatz.....	35
Tabelle 30: Keimzahl (GKZ) in 5 g Tee; 2x 1 h, 1 h Pause, 2. Ansatz.....	35
Tabelle 31: Keimzahl (Hefen) in 5 g Tee; 2x 1 h, 1 h Pause, 2. Ansatz	35
Tabelle 32: Keimzahl (Enterobacter) in 5 g Tee; 2x 1 h, 1 h Pause, 2. Ansatz	36
Tabelle 33: Keimzahl (Bakteriosporen) in 5 g Tee; 2x 1 h, 1 h Pause, 2. Ansatz.....	36
Tabelle 34: Überlebensraten in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer.....	37

Anhang I: Verzeichnis der verwendeten Agenzien

Caso-Agar

Art.Nr. X937.2; Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

Endo-Agar

Art.Nr. TN 1131; SIFIN Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH, Berlin

Folia Menthae piperitae conc. extra MITCHAM, PFEFFERMINZBLÄTTER

Art.Nr. 293, 2500 g; Caesar & Loretz GmbH, Hilden

Kohlenstoffdioxid

Aligal 2; 20 kg; AIR LIQUIDE, France

Natriumchlorid, reinst, rieselfähig

Art.Nr. 4857,5000 ; AppliChem GmbH, Darmstadt

Sabouraud Dextrose (4%) –Agar

Art.Nr. A5854,0500; AppliChem GmbH, Darmstadt

Anhang II: Rohdaten

Tabelle 2: Ausgangskeimzahl (GKZ) in 10 g Tee

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	2940	367	40	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	2304	n.a.	41	1	n.d.	1	n.d.	n.d.
III	2260	329	38	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,23301							
\bar{x}_{gew}	2575							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	25747							

Tabelle 3: Ausgangskeimzahl (Hefen) in 10 g Tee

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	253	466	56	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	n.a.	369	182	n.d.	1	n.d.	n.d.	n.d.
III	n.a.	128	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	1,3201							
\bar{x}_{gew}	1102							
V (ml)	0,1							
kbE/g Tee	110219							

Tabelle 4: Ausgangskeimzahl (Enterobacter) in 10 g Tee

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	n.a.	145	30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	1340	158	28	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	1016	142	27	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	2,332							
\bar{x}_{gew}	1239							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	12389							

Tabelle 5: Ausgangskeimzahl (Bakteriosporen) in 10 g Tee

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	33	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	27	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1
III	25	1	n.d.	n.d.	n.d.	1	n.d.	n.d.
GF	3,3000101							
\bar{x}_{gew}	28							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	279							

Tabelle 6: Keimzahl (GKZ) in 10 g Tee; 2 h

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	2528	289	46	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	2908	304	67	2	1	n.d.	n.d.	n.d.
III	2340	306	37	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,3331							
\bar{x}_{gew}	2650							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	26498							

Tabelle 7: Keimzahl (Hefen) in 10 g Tee; 2 h

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	n.a.	239	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	n.a.	489	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	n.a.	672	6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,2							
\bar{x}_{gew}	440							
V (ml)	0,1							
kbE/g Tee	439688							

Tabelle 8: Keimzahl (Enterobacter) in 10 g Tee; 2 h

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	1572	131	19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	1652	145	22	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	1464	186	9	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,332							
\bar{x}_{gew}	1562							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	15621							

Tabelle 9: Keimzahl (Bakteriosporen) in 10 g Tee; 2 h

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	8	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	6	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	5	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,3							
\bar{x}_{gew}	8							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	76							

Tabelle 10: Keimzahl (GKZ) in 10 g Tee; 1 h

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	2296	348	47	228	29	1	n.d.	n.d.
II	2620	287	34	284	31	1	n.d.	n.d.
III	2528	295	25	252	42	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,33332							
\bar{x}_{gew}	2804							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	28044							

Tabelle 11: Keimzahl (Hefen) in 10 g Tee; 1 h

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	n.a.	n.a.	171	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	n.a.	n.a.	61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	870	373	95	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	1,13							
\bar{x}_{gew}	1389							
V (ml)	0,1							
kbE/g Tee	138938							

Tabelle 12: Keimzahl (Enterobacter) in 10 g Tee; 1 h

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	n.a.	190	20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	n.a.	127	15	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	n.a.	144	17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,31							
\bar{x}_{gew}	155							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	15529							

Tabelle 13: Keimzahl (Bakteriosporen) in 10 g Tee; 1 h

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	105	4	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	141	4	2	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	105	3	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,331							
\bar{x}_{gew}	111							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	1108							

Tabelle 14: Ausgangskeimzahl (GKZ) in 5 g Tee; 1. Ansatz

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	242	24	2	n.d.	n.d.	n.d.	643	1892
II	225	22	1	n.d.	n.d.	3	685	1974
III	252	25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	596	2016
GF	3,32001							
\bar{x}_{gew}	2591							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	25910							

Tabelle 15: Ausgangskeimzahl (Hefen) in 5 g Tee; 1. Ansatz

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	n.a.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	n.a.	12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	n.a.	229	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	2,00							
\bar{x}_{gew}	121							
V (ml)	0,1							
kbE/g Tee	120500							

Tabelle 16: Ausgangskeimzahl (Enterobacter) in 5 g Tee; 1. Ansatz

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	918	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	1633	2	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	966	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,21							
\bar{x}_{gew}	1097							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	10969							

Tabelle 17: Ausgangskeimzahl (Bakteriosporen) in 5 g Tee; 1. Ansatz

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	42	n.d.	n.d.	n.d.	1	2	n.d.	n.d.
II	33	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,10011							
\bar{x}_{gew}	35							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	348							

Tabelle 18: Ausgangskeimzahl (GKZ) in 5 g Tee; 2. Ansatz

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	n.a.	1163	134	10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	n.a.	968	126	12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	n.a.	993	143	18	1	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,331							
\bar{x}_{gew}	1071							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	107115							

Tabelle 19: Ausgangskeimzahl (Hefen) in 5 g Tee; 2. Ansatz

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	n.a.	148	341	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	n.a.	235	386	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	n.a.	n.a.	380	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	2,31							
\bar{x}_{gew}	645							
V (ml)	0,1							
kbE/g Tee	645455							

Tabelle 20: Ausgangskeimzahl (Enterobacter) in 5 g Tee; 2. Ansatz

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	1775	20	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	1113	28	8	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	1747	107	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,321							
\bar{x}_{gew}	1446							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	14456							

Tabelle 21: Ausgangskeimzahl (Bakteriosporen) in 5 g Tee; 2. Ansatz

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	175	7	5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	206	10	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	221	13	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,33							
\bar{x}_{gew}	192							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	1925							

Tabelle 22: Keimzahl (GKZ) in 5 g Tee; 2x 1 h, 30 min Pause

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	2000	309	18	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	1796	205	16	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	1536	835	11	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,333							
\bar{x}_{gew}	2020							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	20201							

Tabelle 23: Keimzahl (Hefen) in 5 g Tee; 2x 1 h, 30 min Pause

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	540	23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	1428	21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	762	67	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,31							
\bar{x}_{gew}	859							
V (ml)	0,1							
kbE/g Tee	85891							

Tabelle 24: Keimzahl (Enterobacter) in 5 g Tee; 2x 1 h, 30 min Pause

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	350	1	n.d.	n.d.	1	n.d.	n.d.	n.d.
II	134	8	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	377	11	5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,3201							
\bar{x}_{gew}	268							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	2678							

Tabelle 25: Keimzahl (Bakteriosporen) in 5 g Tee; 2x 1 h, 30 min Pause

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	18	1	1	n.d.	n.d.	11	1724	n.d.
II	9	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2504	n.d.
III	24	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2388	n.d.
GF	3,31001							
\bar{x}_{gew}	2019							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	20190							

Tabelle 26: Keimzahl (GKZ) in 5 g Tee; 2x 1 h, 1 h Pause, 1. Ansatz

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	1007	77	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	967	72	6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	960	64	6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,33							
\bar{x}_{gew}	949							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	9489							

Tabelle 27: Keimzahl (Hefen) in 5 g Tee; 2x 1 h, 1 h Pause, 1. Ansatz

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	125	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	631	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	1032	8	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,21							
\bar{x}_{gew}	560							
V (ml)	0,1							
kbE/g Tee	56012							

Tabelle 28: Keimzahl (Enterobacter) in 5 g Tee; 2x 1 h, 1 h Pause, 1. Ansatz

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	27	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	53	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	47	n.d.	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,21							
\bar{x}_{gew}	41							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	408							

Tabelle 29: Keimzahl (Bakteriosporen) in 5 g Tee; 2x 1 h, 1 h Pause, 1. Ansatz

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	10	1	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	16	2	n.d.	n.d.	n.d.	1	n.d.	n.d.
III	19	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,31001							
\bar{x}_{gew}	16							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	157							

Tabelle 30: Keimzahl (GKZ) in 5 g Tee; 2x 1 h, 1 h Pause, 2. Ansatz

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	2696	340	38	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	2636	305	38	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	3128	383	28	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,333							
\bar{x}_{gew}	2880							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	28800							

Tabelle 31: Keimzahl (Hefen) in 5 g Tee; 2x 1 h, 1 h Pause, 2. Ansatz

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	n.a.	54	240	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	n.a.	326	370	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	n.a.	472	51	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	3,31							
\bar{x}_{gew}	457							
V (ml)	0,1							
kbE/g Tee	457402							

Tabelle 32: Keimzahl (Enterobacter) in 5 g Tee; 2x 1 h, 1 h Pause, 2. Ansatz

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	343	76	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	523	57	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	n.a.	75	4	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GF	2,321							
\bar{x}_{gew}	466							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	4657							

Tabelle 33: Keimzahl (Bakteriosporen) in 5 g Tee; 2x 1 h, 1 h Pause, 2. Ansatz

Reihe \ Verd.St	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
I	12	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3	1
II	7	4	n.d.	n.d.	n.d.	1	5	n.d.
III	13	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9	7
GF	3,30001							
\bar{x}_{gew}	20							
V (ml)	1							
kbE/g Tee	197							

Anhang III: Überlebensraten

Tabelle 34: Überlebensraten in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer

	10 g; 2 h	10 g; 1 h	5 g; 2x 1 h; 0,5 h Pause	5 g; 2x 1 h; 1 h Pause; MW
GKZ	0,012	0,037	-0,518	-0,541
Hefen & Schimmelpilze	0,601	0,101	-0,649	-0,174
Enterobacter	0,101	0,098	-0,676	-0,701
Bakteriosporen	-0,566	0,599	1,250	-0,808

Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Neubrandenburg, 14.03.2012

Martin Kison