

*Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe
Institut für Biologie (Direktor: Prof. Dr. H. K. Frank)*

Mikrobiologische Aspekte gelagerter, hartgekochter Eier

M. T. Bomar

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 26. April 1979)

1. Einleitung

1.1. Aufbau des Eies

Der mikrobielle Verderb von gekochten Eiern unterscheidet sich in manchen Punkten von dem der rohen Eier. Letztere besitzen aufgrund ihres morphologischen Aufbaues und ihrer biochemischen Eigenschaften einen gewissen Schutz gegen mikrobielle Kontamination (6). Diese antimikrobielle Aktivität ist als ein natürlicher Schutz des sich entwickelnden Embryos zu verstehen. Im folgenden wurden einzelne schützende Eibestandteile aufgelistet:

1.1.1. Eischale

Der mechanische Schutz des Eies ist durch die Eischale gewährleistet. Sie ist 0,2–0,4 mm dick und verbindet durch 7000 bis 17 000 Poren mit einem Durchmesser von 9 bis 35 μ (10, 12) das Ei mit der Außenwelt. Allerdings sind diese Poren mit „Cuticula“ abgedichtet. Der Schalenaufbau ist von Hennenrasse und -alter sowie von Umweltbedingungen abhängig. Das Durchdringen von Mikroorganismen durch diese Poren erfolgt bei rohen Eiern nur selten (3, 9).

1.1.2. Eimembran

Die Eimembran bietet einen zeitlich begrenzten mechanischen und chemischen Schutz gegen die Infektion des Eiklars. *Board* und *Ayres* (2) stellten fest, daß die Bakterien diese Membran, je nach Versuchsbedingungen, in 6 Stunden bis 6 Tagen durchwachsen hatten.

1.1.3. Eiklar

Die antimikrobiellen Eigenschaften des Eiklars beruhen auf der bakteriziden Wirkung des Lysozyms und auf den bakteriostatischen Eigenschaften bestimmter Eiklarproteine. Das Lysozym bewirkt die Hydrolyse der aus Mukopeptiden aufgebauten Gerüstsubstanzen der Bakterien. Die bakteriostatischen Eigenschaften der Eiklarproteine stützen sich auf eine Enzymhemmung der Bakterien oder auf die Bindung der zur Bakterienvermehrung nötigen Stoffe.

1.1.4. Eigelb

Das Eigelb besitzt keine Hemmstoffe, es enthält alle für die Keimvermehrung notwendigen Nähr- und Mineralstoffe.

1.2. Hitzebehandlung des Eies

1.2.1. Änderung der biochemischen Eigenschaften

Durch die Hitzebehandlung der Eier vermindert sich deren Widerstandsfähigkeit gegen mikrobielle Kontamination. Die hitzebehandelten Eier verlieren wesentliche biochemische Abwehrmechanismen der Eimembran und des Eiklars. Nach der thermischen Behandlung (30 min bei 65–70 °C) wirkte das Eiklar keine weitere Lyse der Zellen von *Bacillus subtilis* (4).

1.2.2. Mechanische Barrieren

Die mikrobielle Kontamination der hitzebehandelten Eier muß zwei Hindernisse überwinden:

- Hohlräume (Poren). Es ist anzunehmen, daß die Hitzeeinwirkung ein leichteres Durchwachsen der Mikroorganismen durch die Poren ermöglicht (vgl. 1.1.1). Das Durchdringen der Mikroorganismen durch die Hohlräume der Eischale wird durch hohe Luftfeuchtigkeit, aber auch durch die Wasserbenetzung und eine hohe Mikroorganismendichte auf der Oberfläche begünstigt.
- Membran. Die Besiedlung der Membran durch Mikroorganismen wird durch die Inaktivierung biochemisch wirksamer Stoffe (wie Lysozym) ermöglicht. Das leichte Eindringen von Bakterien oder Schimmelpilzen in das hitzedenaturierte Eiklar ist eine Folgeerscheinung.

1.3. Darstellung des Untersuchungsvorhabens

Die hitzebehandelten Eier sind durch das Fehlen oder durch die Minderung der chemischen und physikalischen Schutzfunktion von Eischale, Eimembran und Eiklar einer verstärkten Gefährdung durch die Mikroorganismen ausgesetzt.

In der Arbeit von *Partmann* und *Wedler* (8) wurde auf Widersprüche in den Untersuchungsergebnissen über die Haltbarkeit von hartgekochten Eiern hingewiesen (1, 7, 11). Um die Situation zu klären, wurde die Haltbarkeit von hartgekochten Eiern bei 4 und 20 °C geprüft. Bei diesen Temperaturen wurde ein Vergleich mit praxisüblich lackierten (gefärbten) Eiern bzw. mit unlackierten Eiern in einer 100%igen Kohlendioxid-Atmosphäre durchgeführt. Dieser Beitrag sollte die erzielten chemischen und sensorischen Befunde der erstgenannten Autoren durch mikrobiologische ergänzen.

2. Material und Methoden

2.1. Eier

Die für die Untersuchungen verwendeten Eier stammten von Legehennen einer genetisch einheitlichen Herde (HNL-Lohmann), deren Alter während des Versuchszeitraums 14–20 Monate erreichte. Alle Angaben über die Qualität der Eier, ihre Behandlung und die Gestaltung der Lagerungsversuche sind der Arbeit von *Partmann* und *Wedler* (8) zu entnehmen. Parallel wurden gekochte Eier und rohe

Eier der gleichen Lieferung untersucht. Für die mikrobiologischen Untersuchungen wurden immer neun Eier von jeder Auslagerung (drei Homogenisate bestehend aus jeweils drei Eiern) analysiert. Jedes Ei wurde unter sterilen Bedingungen halbiert und der Inhalt mit einem sterilen Löffel in einen sterilen Waring-Blendor-Behälter übertragen. Zur Homogenisierung wurden gleiche Gewichtsanteile von Eiern und physiologischer Kochsalzlösung verwendet.

2.2. Nährböden

- Standard I-Nähragar (Merck) – zum Nachweis der Gesamtkeimzahl.
- Cereus-Selektivagar nach Mossel (Merck) – zum Nachweis der Keimzahl vegetativer Formen sowie Sporen von *Bacillus cereus*.
- GSP-Agar (Pseudomonaden-Aeromonaden-Selektivagar nach Kielwein, Merck) – zum Nachweis von *Pseudomonas* und *Aeromonas*.
- Thioglycolat-Nährboden (Merck) – zum Nachweis obligat und fakultativ anaerober und mikroanaerophiler Keime.

2.3. Bebrütungsbedingungen

Temperatur: 10 °C für die kältetoleranten und

30 °C für die mesophilen Bakterien (bzw. Schimmelpilze).

Die Bebrütung unter anaeroben Bedingungen erfolgte in N₂-Atmosphäre. Die Anzahl der Kolonien wurde nach 5 Tagen bei 10 °C und nach 3 Tagen bei 30 °C der Bebrütung ermittelt.

2.4. Keimzahlbestimmung

Von jedem Homogenisat aus drei Eiern wurden die üblichen Verdünnungsreihen (1:9) hergestellt.

Aus den Keimzahlen der drei Homogenisate wurden die Mittelwerte errechnet.

3. Ergebnisse

Die Befunde der mikrobiologischen Untersuchungen der gekochten, gelagerten Eier lassen erkennen, daß die Lagerungsbedingungen entscheidend für die Haltbarkeit der Eier sind. In der Abbildung 1 ist die bakterielle Beschaffenheit der Eier unter allen Versuchsbedingungen wiedergegeben. Man kann davon ausgehen, daß die Keimbelaistung der frisch gekochten Eier in allen Versuchen unter 10²/g lag.

3.1. Lagerung bei 20 °C in Luft

Die Anzahl der Keime nach einer Woche Lagerung lag über 10⁶/g. Der stark proteolytische *Bacillus cereus* war mit 7,0 · 10⁵/g, *B. cereus* var. *mycoides* mit 6,0 · 10⁵/g vertreten. Die Gruppe *Pseudomonas-Aeromonas* bildete nur einen untergeordneten Anteil der Verderbsmikroflora mit 5,25 · 10⁴/g. Die Zahl der Anaeroben erreichte 9,5 · 10⁶/g. Gleichzeitig mit den mikrobiologischen Befunden verschlechterten sich auch die chemischen und sensorischen Merkmale der untersuchten Eier. In der dritten Woche der Lagerung wurde die Zahl der Sporenbildner von 10⁸/g weit überschritten.

Die Vermehrung der Mikroorganismen bei der Lagerungstemperatur von 20 °C verlief nahezu gleich wie es in Untersuchungen von *Oblinger* und *Angalet* (7) bei 25 °C der Fall war.

3.2. Lagerung bei 20 °C unter Kohlendioxid

Eine Kohlendioxidatmosphäre hat aus mikrobiologischer Sicht eine Verlangsamung der Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien und eine Verschiebung in der Zusammensetzung der Bakterienpopulation zur Folge. Nach einer Woche Lagerung bei 20 °C waren die anaeroben Formen deutlich im Übergewicht ($9,12 \cdot 10^5$ /g), die aeroben mesophilen Bakterien waren dagegen unterrepräsentiert. In der zweiten Woche der Lagerung waren die Eier schon vollständig verdorben. Die Anzahl der Aeroben stieg auf $7,6 \cdot 10^6$ /g, wobei *B. cereus* mit $6,4 \cdot 10^6$ /g beteiligt war. Die *Pseudomonas-Aeromonas*-Keime lagen unter 10^5 /g. Die Keimzahl der Anaeroben betrug $3,7 \cdot 10^6$ /g. Obwohl die mikrobielle Belastung nach 2 Wochen Lagerung in CO₂-Atmosphäre mit der nach einer Woche Lagerung in Luft vergleichbar war, waren die chemischen und sensorischen Eigenschaften der in Kohlendioxid gelagerten Eier bereits nach einer Woche schlechter als die der in Luft gelagerten (8).

3.3. Lagerung bei 20 °C – lackierte Eier

In der Abbildung 1 ist zu sehen, daß die mesophilen Bakterien noch in der 5. Woche der Lagerung bei 20 °C in Luft die Grenze von 10^2 /g nicht wesentlich überschritten haben. Die Gesamtkeimzahl der Aeroben betrug nach dieser Zeit $3 \cdot 10^2$ /g, wobei einen wesentlichen Anteil dieser Mikroflora Bacillaceen bildeten. Etwas höher lagen die Keimzahlen der anaeroben Bakterien, die mit $9 \cdot 10^2$ /g zu der numerisch stärksten Gruppe gehörten.

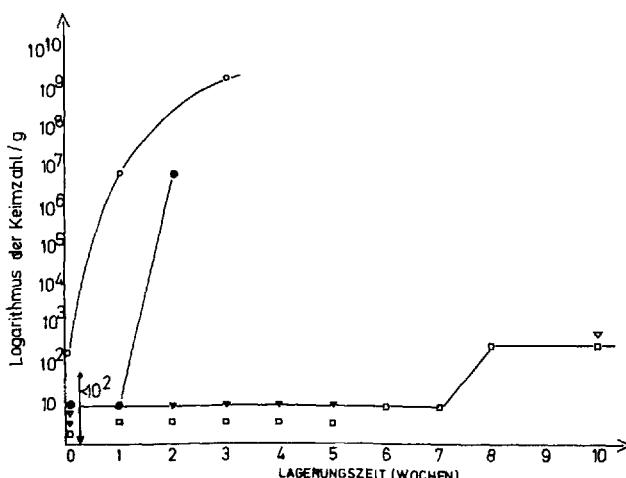


Abb. 1. Lagerung hartgekochter Eier.

- – Lagerung bei 20 °C, in Luft
- – Lagerung bei 20 °C, in 100% CO₂
- – Lagerung bei 4 °C, in Luft
- ▼ – Lagerung bei 20 °C, in Luft,
Eier mit Lack versiegelt
- ▽ – rohe Eier, Lagerung bei 4 und 20 °C, in Luft

ten. Die gramnegativen Stäbchen lagen unter 10^2 /g. Diese mikrobiologischen Ergebnisse sind mit den chemischen und sensorischen Aussagen nahezu identisch (8).

3.4. Die Lagerung bei 4 °C

Bei 4 °C war die Entwicklung von Mikroorganismen am stärksten gehemmt. Nach einer Lagerung von 10 Wochen lag die Keimzahl nur wenig über 10^2 /g. Auch der chemische und sensorische Zustand der kalt in Luft gelagerten Eier war nach 15 Tagen noch hervorragend (8).

4. Diskussion der Ergebnisse

Generell gilt, daß die kongenitale Infektion des Hühnereies in gesunden Legehennenbeständen keine Rolle spielt und daß selbst in der Kloake nur ein geringer Teil der Eier (deren Schale) kontaminiert wird (6). Die entscheidende Kontamination erfolgt nach dem Legen in schmutzigen Nestern bzw. nach der Inaktivierung des Lysozyms durch die Hitzebehandlung. Dadurch läßt sich teilweise erklären, daß die normalerweise durch Lysozym inaktivierten grampositiven Bakterien die vorherrschende Mikroflora in gekochten Eiern bilden. Nach dem Kochen erkaltet der Eiinhalt und vermindert sein Volumen, so daß ein Unterdruck im Eiinnern entsteht. Das Kühlwasser durchdringt dann die Poren der Schale und stellt eine Wasserbrücke für die Rekontamination her. Eine ähnliche Situation entsteht, wenn die bereits abgekühlten Eier in höhere Umgebungstemperaturen gelangen: Es kommt zum Kondensieren des Wassers auf der Schalenoberfläche (Betauen), zum Vermehren der auf der Oberfläche haftenden Mikroflora und zum Durchwachsen dieser in das Eiinnere.

Die Zusammensetzung der Mikroflora deutet auf eine starke Entwicklung der fakultativ anaeroben Mikroflora, wozu das „Abdichten“ des Eies durch die Eischale mit der Membran und der gebildete Schleim mit hoher Mikroorganismendichte im wesentlichen beiträgt.

Die nichtlackierten Eier erliegen bei 20 °C schnell den Fäulnisserregern, dagegen weisen die Eier mit der lackierten Schale eine erstaunlich verlängerte Lagerungsfähigkeit auf. Das Versiegeln der Eischaleporen hat einen entscheidend positiven Einfluß auf die Lagerfähigkeit der Eier dadurch, daß die mikrobielle Rekontamination weitgehend ausgeschaltet wird.

Die Kühl Lagerung der gekochten Eier hat viel zur Verlängerung der Lagerungsfähigkeit beigetragen. Es hat sich gezeigt, daß die kältetoleranten Bakterien durch den Kochprozeß abgetötet wurden.

Um eine Verbesserung der Haltbarkeit bei 20 °C zu erzielen, wurden die Eier in CO₂-Atmosphäre gelagert. Da Kaess (5) auf die negative Wirkung des CO₂-Gehaltes unter 20% in der Atmosphäre hingewiesen hat (unter diesen Bedingungen kam es zwar zur Hemmung von *Pseudomonas* und *Achromobacter*, das Pilzwachstum war aber stimuliert), wurde der CO₂-Gehalt auf 100% angehoben. Hierdurch kam es zwar im Endeffekt zu einer Verlangsamung der Mikroorganismenvermehrung im Vergleich mit der Luftatmosphäre – der geringe Zeitgewinn war jedoch ohne Bedeutung. In allen Fällen wurde ein großer Unterschied in der bakteriellen Beschaffenheit von gekochten und rohen Eiern festgestellt: Die Keimzah-

len der rohen Eier überschritten nach 10 Wochen nicht die Grenze von 10^3 /g. Ein Einfluß unterschiedlicher Lagerungsbedingungen war nicht feststellbar.

Zusammenfassung

Hartgekochte Eier in der Schale, ohne Vorbehandlung, wurden in Luft bei 20 °C und 4 °C gelagert. Bei der Temperatur von 20 °C wurde noch zusätzlich die Haltbarkeit von lackierten Eiern bei Lagerung in Luft und unbehandelter Eier in 100%iger Kohlendioxid-Atmosphäre untersucht. Die Lagerung bei 4 °C sowie die Aufbewahrung lackierter Eier bei 20 °C hatte eine ausgezeichnete bakteriologische Qualität der Eier bis 5 Wochen zur Folge. Die Lagerung unbehandelter Eier bei 20 °C in Luft zeigte schon nach einer Woche eine hohe Keimbelaustung (über 10^6 /g). Eine CO₂-Atmosphäre hemmte zwar in der ersten Lagerungswoche die Vermehrung der Mikroorganismen, in den folgenden Tagen stieg jedoch die Keimzahl auch über 10^6 /g.

Für die technische Mitarbeit bei der Durchführung der Untersuchungen danke ich Frau *Irmhilde Lubecki*.

Summary

Hard-boiled eggs in the shell were without any pretreatment stored in air at 20 °C and 4 °C. Furthermore the keeping quality of varnish-coated eggs stored in air at 20 °C and of untreated eggs stored in 100% carbon dioxide at the same temperature was studied. Hard-boiled eggs stored at 4 °C and varnish-coated eggs stored at 20 °C were of excellent bacteriological quality up to 5 weeks. Untreated eggs stored in air at 20 °C showed high microbiological contamination (more than 10^6 /g) already after one week. The CO₂ storage atmosphere inhibited the growth of microorganisms during the first week of storage, but in the days to follow counts increased to more than 10^6 /g as well.

Literatur

1. Anonym: Eiqualität. AID (Land- und Hauswirtschaftlicher Auswertungs- und Informationsdienst e. V.), Bonn-Bad Godesberg, 415 (1976). - 2. Board, R. G., T. C. Ayres: The influence of temperature on bacterial infection of the hen's egg. *Appl. Microbiol.* **13**, 358-364 (1965). - 3. Board, P. A., R. G. Board: A method of studying bacterial penetration of the shell of the hen's egg. *Lab. Pract.* **16**, 471-482 (1967). - 4. Board, R. G.: The Microbiology of the hen's egg. In: *Advances in Appl. Microbiol.* Ed.: D. Perlmanns, S. 253 (New York and London 1969). - 5. Kaess, G.: Eier. In: *Handbuch der Kältetechnik*. Ed. R. Plank S. 264-308 (Berlin, Göttingen, Heidelberg 1960). - 6. Kiefer, H.: Mikrobiologie der Eier und Eiprodukte. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **27**, 218-223 (1976). - 7. Öblinger, T. L., S. A. Angalet: Storage stability of hard-cooked eggs. *Poultry* **53**, 1415-1420 (1974). - 8. Partmann, W., Annemarie Wedler: Untersuchungen zur Haltbarkeit von hartgekochten Eiern. *Z. Ernährungswiss.* (Im Druck). - 9. Paton, A. M., T. C. Ayres: Use of fluorescent brightener for tracing the passage of salmonella in eggs. *Nature Lond.* **204**, 803-804 (1964). - 10. Romanoff, A. L., A. T. Romanoff: The avian egg (New York 1949). - 11. Spencer, T. W., L. T. Tryhnew: Effect of storage in peeling quality and flavor of hard-cooked shell eggs. *Poultry Sci.* **52**, 654-657 (1973). - 12. Tyler, C.: Studies on egg shells. II. A method for working and counting pores. *J. Sci. Fd. Agric.* **4**, 266-272 (1953). - 13. Tyler, C.: Studies on egg shells. VII. Some aspects of structure as shown by plastic models. *J. Sci. Fd. Agric.* **7**, 483-493 (1956).

Anschrift des Verfassers:

Dr.-Ing. M. T. Bomar, Engesserstraße 20, 7500 Karlsruhe 1