

H. M. Ulmer, M. G. Gänzle und R. F. Vogel

# Abtötung bierschädlicher Mikroorganismen durch Hochdruckbehandlung

In dieser Arbeit wurde die Inaktivierung von bierschädlichen Laktobazillen durch hohen hydrostatischen Druck untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die druckinduzierte Abtötung bierversäuernder Laktobazillen bei Drücken von 200 bis 600 MPa möglich ist. Diese Druckinaktivierung wurde bei tiefen pH-Werten sowie in Anwesenheit von Hopfenbitterstoffen und Alkohol wesentlich beschleunigt. Gelöstes CO<sub>2</sub> hat nur eine geringe Wirkung auf *L. plantarum*, jedoch konnte mit flüssigem CO<sub>2</sub> bereits bei 12 MPa eine Sterilisierung von Modellbier erreicht werden. Bereits vor dem Zelltod durch die Hochdruckbehandlung war eine Inaktivierung der Hopfenresistenz von *L. plantarum* erkennbar. Dieser druckinduzierte Verlust der Hopfenresistenz führte zu dem Verlust der Fähigkeit von *L. plantarum*, bei Lagerung in Bier zu überleben. Zur Verhinderung des Bierversäuerens ist daher keine Abtötung der Organismen notwendig, es reicht aus, die Zellen subletal zu schädigen. Durch eine Druckbehandlung und anschließender Lagerung in Gegenwart von Hopfen konnten aus einem Gemisch von *S. cerevisiae* und *L. plantarum* die Milchsäurebakterien selektiv abgetötet werden.

BC 45 Vermeidung und Unterdrückung von Infektionen

(Deskriptoren: Hochdruck, Bierversäuerung, Laktobazillen, Hopfenresistenz, CO<sub>2</sub>).

Descriptors: High pressure, beer spoilage, lactobacilli, hop resistance, CO<sub>2</sub>).

## 1 Einleitung

Die Haltbarkeit von Lebensmitteln kann durch eine Hochdruckbehandlung verlängert werden, da vegetative Zellen durch hohe hydrostatische Drücke (200 – 700 MPa) abgetötet werden. Eine Hochdruckkonservierung von Bier vermindert bei gleichem Abtötungseffekt im Vergleich zur thermischen Pasteurisierung negative Auswirkungen auf die Produktqualität (1). Eine Hochdruckbehandlung kann zudem bei vergleichbarem Abtötungseffekt mit wesentlich geringerem Energieaufwand als eine Pasteurisierung durchgeführt werden. Der Stand der Technik erlaubt bei flüssigen Lebensmitteln den kontinuierlichen Einsatz von Hochdruck bis zu 350 MPa.

Das Zusammenwirken der Hochdruckanwendung mit der Lebensmittelmatrix ist besonders in Lebensmitteln von Bedeutung, in welchen Stressfaktoren das Wachstum von Verderbsorganismen erschweren. Zu diesen Lebensmitteln zählt Bier, da in hohem Maße Stressfaktoren (tiefer pH-Wert, Ethanol, CO<sub>2</sub> und antimikrobiell wirksame Hopfeninhaltsstoffe) wirksam sind. Ziel dieser Arbeit war, die Hochdruckinaktivierung von bierschädlichen Mikroorganismen zu beschreiben und die Auswirkungen von Druck auf die Toleranz gegenüber bierspezifischen Stressfaktoren zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Mikroorganismen und Medien

Der bierschädliche Stamm *Lactobacillus plantarum* TMW1.460 wurde bei 30 °C in Modellbier kultiviert. Modellbier wurde durch Fermentation eines 12%igen Malzextraktes mit *Saccharomyces uvarum* var. *carlsbergensis* TMW3.001 bei 10 °C für 140 h und nachfolgender Entfernung von Ethanol und CO<sub>2</sub> hergestellt. Soweit nicht anders angegeben, wurde der pH-Wert auf 4.0 eingestellt.

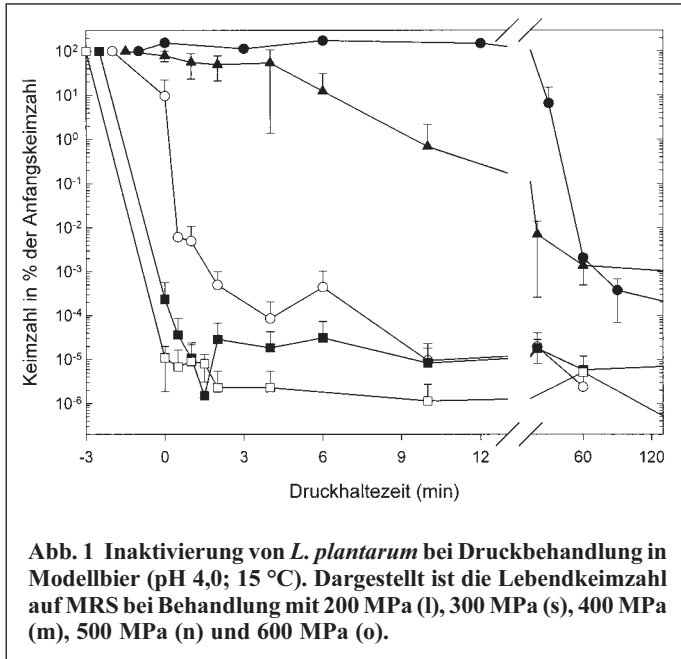
### 2.2 Hochdruckbehandlung von *L. plantarum*

*L. plantarum* TMW1.460 wurde in Modellbier kultiviert, geerntet und in gleichem Volumen frischen Modellbiers resuspendiert. Die Hochdruckbehandlung wurde in Druckautoklaven durchgeführt, die auf 15 °C vortemperiert waren. Die Kinetik der Inaktivierung von *L. plantarum* wurde in Modellbier ohne Zusätze bei Drücken von 200, 300, 400, 500 und 600 MPa bestimmt. Die Kinetik der Inaktivierung von *L. plantarum* bei 300 MPa wurde zudem in Modellbier bei folgenden Konzentrationen von Iso- $\alpha$ -Hopfenextrakt (HE) bzw. Ethanol ermittelt: 0,50 und 100 mg l<sup>-1</sup> HE, 0%, 5% und 10% (w/w) Ethanol.

Der Einfluss von Gasen auf die Hochdruckinaktivierung von *L. plantarum* wurde mit N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, oder CO<sub>2</sub> bestimmt. Modellbier wurde mit Luft, N<sub>2</sub>, oder CO<sub>2</sub> bei 4 bar Überdruck und 5°C vorgespannt, so dass sich die Gase in der Flüssigkeit zur Konzentration von 43 mg l<sup>-1</sup> Sauerstoff, 103 mg l<sup>-1</sup> N<sub>2</sub>, bzw. 13,5 g l<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> lösten. Anschließend wurde zu den vorgespannten Medien *L. plantarum* zugesetzt und bei 200 MPa, 15°C zwischen 0 und 120 min behandelt.

### 2.3 Überleben von *L. plantarum* in Modellbier nach sublethaler Hochdruckbehandlung

Das Verhalten von Zellen ohne Druckbehandlung bzw. nach Behandlung bei 300 MPa für 5 min während der Lagerung bei 10°C in Modellbier wurde bei folgenden Konzentrationen von Ethanol und HE ermittelt:



**Abb. 1** Inaktivierung von *L. plantarum* bei Druckbehandlung in Modellbier (pH 4,0; 15 °C). Dargestellt ist die Lebendkeimzahl auf MRS bei Behandlung mit 200 MPa (l), 300 MPa (s), 400 MPa (m), 500 MPa (n) und 600 MPa (o).

- 0% Ethanol, 0 mg l<sup>-1</sup> HE,
- 0% Ethanol, 50 mg l<sup>-1</sup> HE,
- 5% Ethanol, 0 mg l<sup>-1</sup> HE,
- 5% Ethanol, 50 mg l<sup>-1</sup> HE.

#### 2.4 Überleben von *S. uvarum* und *L. plantarum* in Modellbier nach subletaler Hochdruckbehandlung

*S. uvarum* und *L. plantarum* wurden in Malzextrakt (pH = 5,6) bei 15 °C für 180 h inkubiert. Nach der Zellernte durch Zentrifugation wurden die Zellen der Organismen in Modellbier (pH = 4) wiederaufgenommen und gemeinsam bei 100 und 200 MPa (15 °C) für 5 oder 10 min behandelt. Die druckbehandelten Zellen wurden mit 50 mg l<sup>-1</sup> HE versetzt und für 68 Stunden bei 15 °C gelagert.

#### 2.5 Keimzahlbestimmung

Die Bestimmung der Keimzahl erfolgte durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungen auf MRS-Agar (Merck, Darmstadt). Zur Bestimmung subletal geschädigter Zellen wurde MRS-Agar mit 4% NaCl verwendet. Bei Druckinaktivierungskinetiken von gemeinsamen Kulturen von *L. plantarum* und *S. uvarum* wurde Chloramphenicol (20 ppm) oder Actidion (75 ppm) zugesetzt, um die Organismen selektiv auszuzählen.

#### 2.6 Physiologische Charakterisierung von hochdruckbehandeltem *L. plantarum*

Inaktivierungskinetiken wurden neben der Bestimmung der Keimzahlen durch folgende Methoden charakterisiert:

- 1) Irreversible Schädigung der Zytoplasmamembran,
- 2) Hemmung der Stoffwechselaktivität und
- 3) HorA-Aktivität.

Die Versuchsdurchführung erfolgte nach Ulmer et al. (2).

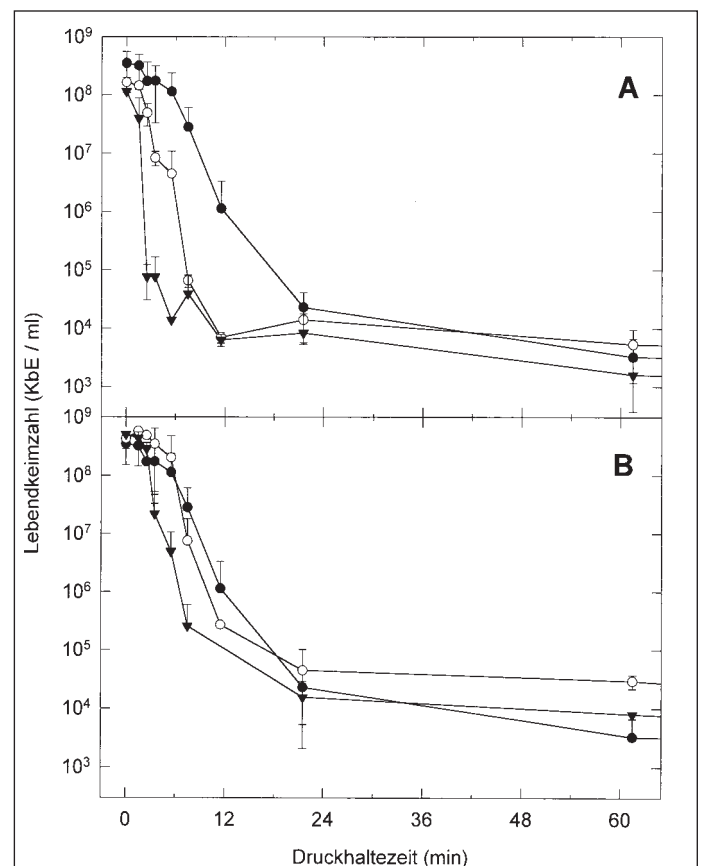
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Druckinaktivierung von *L. plantarum*. Vitalität und subletale Schädigung

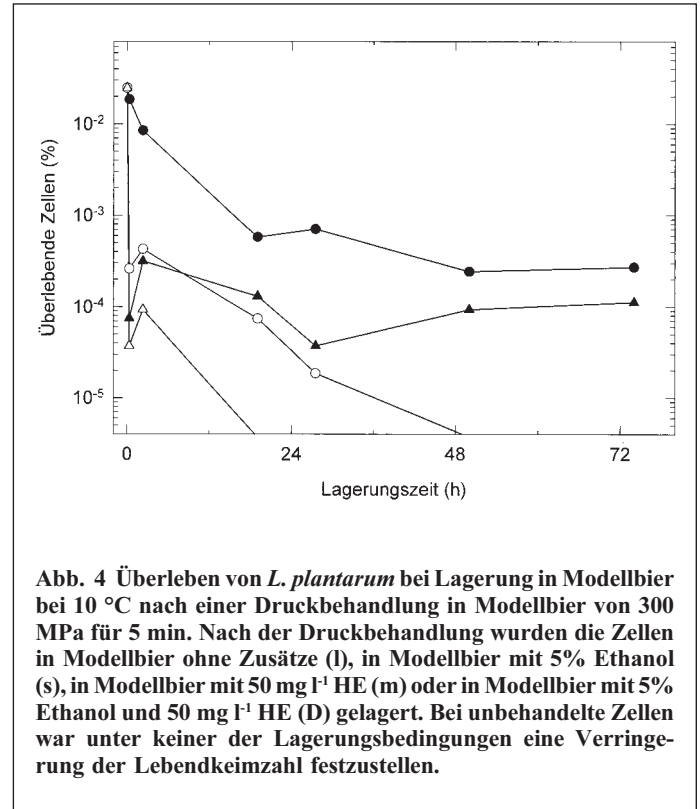
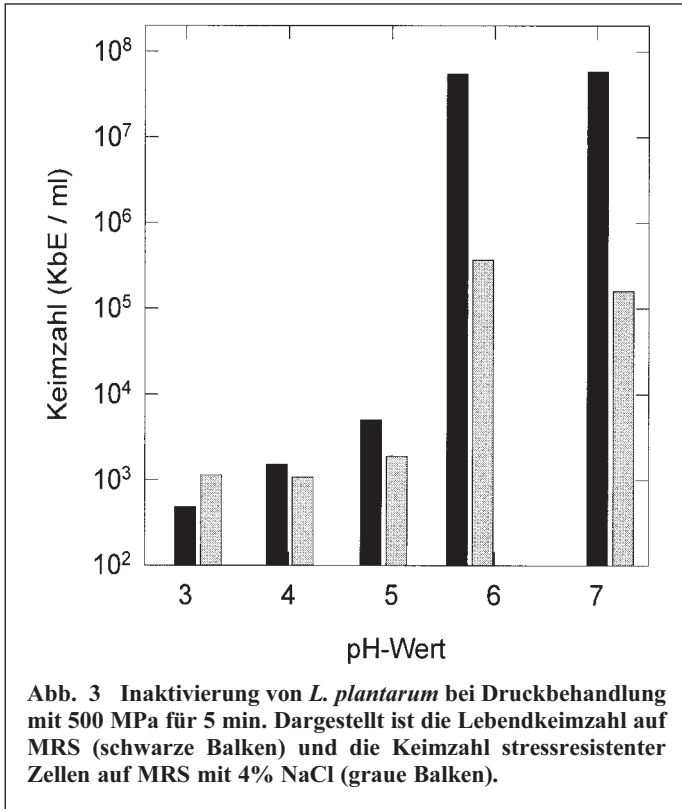
Die Druckinaktivierungskinetiken von *L. plantarum* bei 200 bis 600 MPa sind in Abbildung 1 gezeigt. Bereits in Modellbier ohne Zusatz weiterer Stressfaktoren kann bei Drücken von 200 MPa bis 600 MPa eine Keimzahlreduktion um 6 Zehnerpotenzen nach 60 bzw. 5 min Druckhaltezeit erreicht werden. Ein kleiner Bruchteil der Gesamtpopulation (ca.  $10^{-4}$  %) wies jedoch bei allen Druckstufen eine wesentlich langsamere Inaktivierungskinetik auf.

#### 3.2 Einfluss von Hopfen und Alkohol auf die Druckinaktivierung von *L. plantarum*

Der spezifische Einfluss der bierrelevanten Stressfaktoren Hopfenbitterstoffe und Alkohol auf die Hochdruckinaktivierung wurde in Modellbier mit definierten Konzentrationen von Ethanol (5 oder 10%) oder Hopfenextrakt (50 oder 100 mg l<sup>-1</sup>) ermittelt. 10% Ethanol oder 20 mg l<sup>-1</sup> HE hemmen das Wachstum von *L. plantarum* in Modellbier vollständig (Daten nicht gezeigt). Der Einfluss von Hopfen und Alkohol auf die Druckinaktivierung von *L. plantarum* ist in Abbildung 2 gezeigt. Durch Zusatz von 100 mg l<sup>-1</sup> HE bzw. 10% Ethanol wurde die Druckinaktivierung von *L. plantarum* erheblich beschleunigt. Im Vergleich zu den Konzentrationen von Hopfenextrakt bzw. Ethanol, die zur Hemmung des



**Abb. 2** Inaktivierung von *L. plantarum* bei Druckbehandlung mit 300 MPa in Modellbier (pH4,0). A: Lebendkeimzahl auf MRS bei Behandlung in Gegenwart von 0% Ethanol (l), 5% Ethanol (m) und 10% Ethanol (t). B: Lebendkeimzahl auf MRS bei Behandlung in Gegenwart von 0 mg l<sup>-1</sup> HE (l), 50 mg l<sup>-1</sup> HE (m) und 100 mg l<sup>-1</sup> HE (t).



Wachstums von *L. plantarum* notwendig sind, 20 mg l<sup>-1</sup> bzw. 10%, übt Ethanol während der Hochdruckbehandlung einen größeren Einfluss auf die Abtötung aus als Hopfenextrakt. Weder der Prozentsatz drucktoleranter Zellen in der Gesamtpopulation noch deren Inaktivierungsgeschwindigkeit wurde durch Zusatz von Hopfen oder Ethanol beeinflusst.

**3.3 Einfluss des pH-Wertes auf die Druckinaktivierung von *L. plantarum***

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Druckinaktivierung von *L. plantarum* wurde durch Druckbehandlungen bei 500 MPa für 5 min bei 15 °C ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 gezeigt. Bei einem pH Wert zwischen 6 und 7 wurde praktisch keine Inaktivierung des Organismus festgestellt, jedoch wurden die Keimzahlen stresstoleranter Zellen (Keimzahl auf MRS-NaCl) reduziert. Subletal geschädigte Zellen wurden also bei diesen hohen pH-Werten nicht abgetötet. Bei pH-Werten unter 5, wie sie für Bier typisch sind, waren sowohl die Lebendkeimzahl als auch die Keimzahl stresstoleranter Zellen um mehr als 5 Zehnerpotenzen reduziert. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass druckinduzierte subletale Schädigung bei hohem pH-Wert toleriert wird, während diese bei tiefem pH zum Zelltod führt. Eine subletale Hochdruckbehandlung von *L. plantarum* beeinträchtigt dessen Fähigkeit zur Aufrechterhaltung eines transmembranen pH-Gradienten (3).

**3.4 Wirkung von gelösten Gasen auf die Hochdruckinaktivierung von *L. plantarum***

Bier enthält ca. 5 g l<sup>-1</sup> gelöstes CO<sub>2</sub>. Aufgrund von Literaturdaten (7, 8) konnte ein synergistischer Effekt hydrostatischer Hochdruckbehandlung mit gelöstem CO<sub>2</sub> erwartet werden. Daher wurde der Einfluss von CO<sub>2</sub> auf die Hochdruckinaktivierung von

*L. plantarum* untersucht, zusätzlich wurde die Wirkung von Stickstoff und Sauerstoff ermittelt. Die Anwendung von O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> oder CO<sub>2</sub> in Kombination mit der Hochdruckanwendung zeigte keinen zusätzlichen Effekt auf die Inaktivierung von *L. plantarum* in Modellbier (Daten nicht gezeigt). Jedoch führte bereits bei sehr niedrigen hydrostatischen Drücken flüssiges CO<sub>2</sub> aufgrund der Extraktion von Zellbestandteilen an der Phasengrenze CO<sub>2</sub> (flüssig) – Wasser zur Inaktivierung von *L. plantarum* in Modellbier (6).

**3.5 Lagerung von hochdruckbehandeltem *L. plantarum* in Modellbier**

Aus den vorhergehenden Experimenten konnte durch Verwendung des Selektivmediums eine subletale Schädigung von *L. plantarum* nach subletaler Druckbehandlung abgeleitet werden. Um zu überprüfen, ob diese subletal geschädigten Zellen in Bier überleben können, wurde *L. plantarum* bei 300 MPa hochdruckbehandelt und anschließend in Modellbier mit Zusatz von Ethanol und Hopfenextrakt bei 15 °C gelagert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 gezeigt. Die Hochdruckbehandlung, die nur einen Teil der Mikroorganismen direkt abtötete, führte zum Verlust der Hopfenresistenz der überlebenden Zellen von *L. plantarum*. Bei Lagerung in Modellbier mit 50 mg l<sup>-1</sup> HE mit oder ohne Zusatz von Ethanol starben hochdruckbehandelte Zellen innerhalb von 24 h vollständig ab, während nicht druckbehandelte Zellen die Lagerung praktisch ohne Reduktion der Keimzahl tolerierten. Nach Zusatz subletal druckbehandelter Zellen zu handelsüblichem Bier waren bereits nach 30 Minuten keine überlebenden Keime mehr nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

**3.6 Druckinaktivierung von *L. plantarum*: Verlust der Hopfenresistenz**

Die Resistenz gegen Hopfenbitterstoffe ist notwendige Voraussetzung für das Überleben von Milchsäurebakterien in Bier (7, 8).

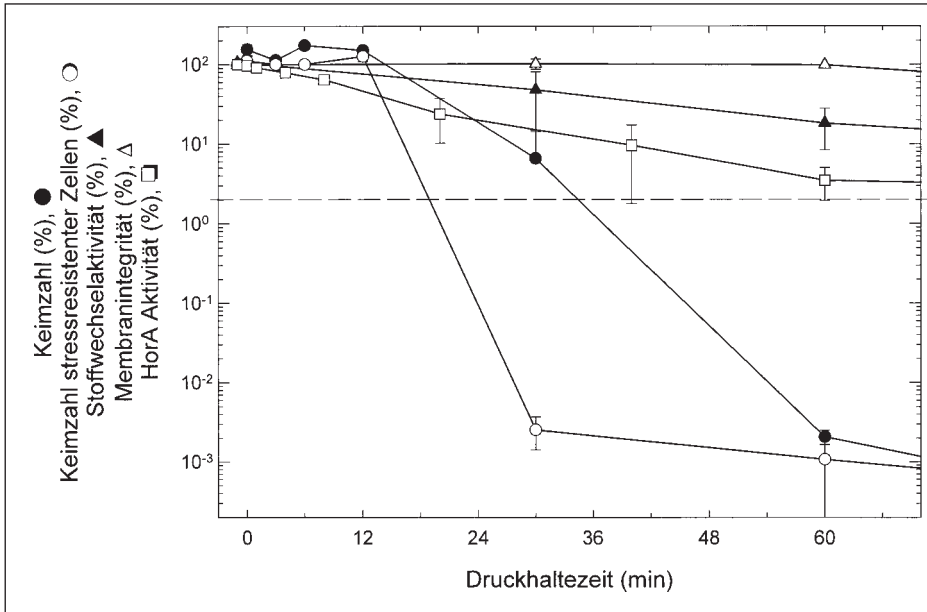


Abb. 5 Inaktivierung von *L. plantarum* bei einer Druckbehandlung von 300 MPa bei 15 °C. Dargestellt ist die Lebendkeimzahl auf MRS, die Keimzahl stressresistenter Zellen auf MRS mit 4% NaCl, die Stoffwechselaktivität, die Membranintegrität, und die Aktivität von HorA, eines Transportenzym, welches Hopfenresistenz vermittelt.

Das membrangebundene Transportprotein HorA trägt zur Hopfenresistenz bierschädlicher Stämme von *L. brevis* und *L. plantarum* bei (8, 9). Dieses Enzym katalysiert unter ATP-Verbrauch den Transport von Hopfenbitterstoffen aus der Zytoplasmamembran nach außen und wirkt damit der toxischen Wirkung der Humulone und Lupulone entgegen. Um die Mechanismen des Verlustes der Hopfenresistenz aufzuklären, wurden druckbehandelte Zellen in Bezug auf Stoffwechselaktivität, Membranintegrität und HorA Aktivität charakterisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt. Eine Schädigung der Zytoplasmamembran durch Druck konnte erst bei Reduktion der Lebendkeimzahl von 4 Zehnerpotenzen oder mehr nachgewiesen werden, irreversible Änderungen der Membran können also nicht für den Verlust der Hopfenresistenz verantwortlich gemacht werden. Der Verlust der Stoffwechselaktivität korrelierte mit der Abnahme der Lebendkeimzahl. Bereits in den ersten 12 Minuten der Druckbehandlung, also bevor signifikante Änderungen der Lebendkeimzahl ermittelt wurden, war jedoch bereits eine Abnahme der HorA-Aktivität festzustellen. Der Verlust der Hopfenresistenz bierschädlicher Laktobazillen nach subletaler Hochdruckbehandlung ist demnach auf die Inaktivierung von HorA zurückzuführen.

### 3.7 Druckresistenz von *S. uvarum* im Vergleich zu *L. plantarum*

Eine Hochdruckinaktivierung bierschädlicher Mikroorganismen während der Hefeführung könnte den Kontaminationsdruck im Brauprozess erheblich reduzieren. In Modellbier wurde die Drucktoleranz von *S. uvarum* mit der von *L. plantarum* verglichen. *L. plantarum* TMW 1.460 erwies sich drucktoleranter als *S. uvarum* (Daten nicht gezeigt). In einem weiteren Experiment wurde daher eine gemeinsame Kultur von *S. uvarum* und *L. plantarum* bei 100 und 200 MPa hochdruckbehandelt und bei 15 °C in Modellbier in Gegenwart von 50 mg l<sup>-1</sup> HE gelagert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 gezeigt. Durch die Hochdruckbehandlung wurden die Keimzahlen der Organismen nur unwesentlich reduziert. Während jedoch die Keimzahlen von *S. uvarum* im Verlauf der anschließenden Lagerung stabil blieben, wurden hochdruckbehandelte *L. plantarum* in Gegenwart von Hopfen abgetötet.

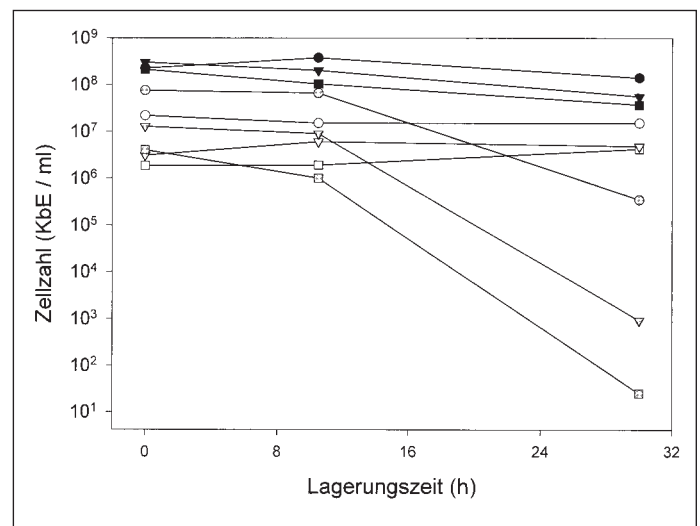


Abb. 6 Überleben von *L. plantarum* und *S. uvarum* in Modellbier bei 15 °C in Gegenwart von 50 mg l<sup>-1</sup> HE. Weisse Symbole: *S. uvarum*, schwarze Symbole: Lebendkeimzahl *L. plantarum*, graue Symbole: Keimzahl stressresistenter Zellen von *L. plantarum*. Vor der Lagerung wurden die Zellen folgenden Druckbehandlungen unterworfen: keine Druckbehandlung (l), 200 MPa, 10 Minuten (n) und 200 MPa, 5 Minuten (t).

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Hochdrucktechnologie ist grundsätzlich als energiesparende und produktschonende Alternative zur thermischen Pasteurisierung geeignet. Die druckinduzierte Abtötung von *L. plantarum* als Modellkeim für bierversäuernde Mikroorganismen ist bei Drücken von 200 bis 600 MPa möglich. Diese Druckinaktivierung wird in Anwesenheit von Hopfenbitterstoffen und Alkohol in Konzentrationen, die typischerweise in Bier vorliegen, wesentlich beschleunigt. Tiefe pH-Werte führen ebenfalls zur beschleunigten Druckinaktivierung. Gelöstes CO<sub>2</sub> hat nur eine geringe Wirkung auf die Hochdruckinaktivierung von *L. plantarum*.

Die physiologische Charakterisierung von druckbehandelten *L. plantarum* ergab, dass bereits vor dem Zelltod eine subletale Schädigung und eine Inaktivierung spezifischer Hopfenresistenzmechanismen erkennbar war. Im Lagerversuch konnte bestätigt werden, dass druckinduzierter Verlust der Hopfenresistenz mit dem Verlust der Fähigkeit von *L. plantarum* zum Überleben in Bier übereinstimmt. Aus dem Ergebnis des Lagerungsversuches ist ersichtlich, dass zur Verhinderung des Bierverderbs keine vollständige Abtötung der Organismen notwendig ist, es reicht aus, die Zellen subletal zu schädigen. Dies bedeutet, dass die Kapital- und Energiekosten für eine Hochdruckbehandlung von Bier erheblich reduziert werden. Die Kosten für eine Druckbehandlung von Lebensmitteln sind linear mit der Druckhöhe und der Druckhaltezeit korreliert (10). Die Kosten zur Verhinderung von Bierverderb durch Milchsäurebakterien (200 MPa, 20 min) betragen demnach weniger als die Hälfte der Kosten zur vollständigen Abtötung bierschädlicher Mikroorganismen (400 – 600 MPa, 20 min). In weiteren Versuchen sollte sichergestellt werden, dass ähnliche Abhängigkeiten auch für andere bierschädliche Mikroorganismen gelten.

Die Drucktoleranz von *L. plantarum* wurde mit der von *S. uvarum* verglichen, um zu überprüfen, ob durch eine Druckbehandlung während der Hefeführung der Kontaminationsdruck vermindert werden kann. *S. uvarum* ist druckempfindlicher als der bierschädliche Organismus. Jedoch führt eine Druckbehandlung mit anschließender Lagerung in Gegenwart selektiv wirkender Zusätze, wie z.B. Hopfen, zur selektiven Abtötung der Verderbskeime.

#### Danksagung

**Diese Arbeit wurde durch die Wissenschaftsförderung des deutschen Brauerbundes, Projekt No. B51, gefördert. Wir danken unseren Studenten Klaus Kilimann, Markus Tiekling, Philip Rastl, Luciano Horn und Carsten Hinrichs für die engagierte Mitarbeit.**

#### 5 Summary

**Ulmer, H.M., Gänzle, M.G., and Vogel, R.F.: Destruction of microorganisms harmful to beer by high pressure treatment** — Monatschrift für Brauwissenschaft 55, No. 1/2, 4 – 9, 2002

#### BC 45 Infection avoidance and suppression

Studied in this paper are the inactivation of lactobacilli harmful to beer by high hydrostatic pressure. It could be shown that the pressure-induced destruction of lactobacilli causing beer to perish is possible at pressures from 200 to 600 MPa. This pressure inactivation was considerably accelerated with low pH-values and in the presence of bitter hop substances and alcohol. Dissolved CO<sub>2</sub> only had a slight effect on *L. plantarum*, but sterilisation of model beer could be achieved with liquid CO<sub>2</sub> at a pressure of 12 MPa. Inactivation of the hop resistant of *L. plantarum*, could be seen before the death of the cell caused by the high pressure treatment. The pressure-induced loss of hop resistance leads to the loss of the ability of *L. plantarum* to survive during the storage of beer. Sublethal damage to the beer cells is sufficient because, as a result, no destruction of the organisms is necessary. The lactic acid bacteria could be destroyed selectively in a mixture of *S. cerevisiae* and *L. plantarum* by pressure treatment and storage in the presence of hops.

**Ulmer, H.M., Gänzle, M.G., et Vogel, R.F.: Destruction de microorganismes nuisibles en brasserie par le traitement à haute pression** — Monatschrift für Brauwissenschaft 55, No. 1/2, 4 – 9, 2002

#### BC 45 Empêchement et suppression de contaminations

Dans ce travail on a examiné l'inactivation de lactobacilles nuisibles en brasserie par une pression hydrostatique élevée. Il a pu être démontré qu'il était possible de détruire des lactobacilles nuisibles en brasserie par des pressions de 200 à 600 MPa. Cette inactivation par la pression est sensiblement accélérée par un pH bas, en présence de matières amères de houblon et de l'alcool. Le CO<sub>2</sub> soluble a peu d'action sur *L. plantarum*, toutefois on a pu obtenir une stérilisation avec du CO<sub>2</sub> liquide vers 12 Mpa sur de la bière « modèle ». Une inactivation par les matières amères de *L. plantarum* a été observée bien avant la mort de la cellule par traitement à haute pression. Cette perte induite par la pression et des matières amères conduit à la destruction de *L. plantarum* pendant le stockage de la bière. Afin d'éviter l'altération de la bière, il n'est pas nécessaire de détruire les organismes, il suffit d'endommager les cellules sublétales. Par le traitement à la pression, suivi d'une garde en présence de houblon, on pu détruire sélectivement les bactéries lactiques par un mélange de *S. cerevisiae* et *L. plantarum*.

#### 6 Literatur

1. Castellari, M., Arfelli, G., Riponi, C., Carpi, G., Amati, A.: "High hydrostatic pressure treatments for beer stabilization", *J. Food Sci.* **65**, 974 – 77, 2000.
2. Ulmer, H.M., Gänzle, M.G., Vogel, R.F.: "Effects of high pressure on survival and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum*", *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3966 – 3973, 2000.
3. Wouters, P., Glaasker, E., Smelt, J.P.P.M.: "Effects of high pressure on inactivation kinetics and events related to proton efflux in *Lactobacillus plantarum*", *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 509 – 514, 1998.
4. Erkmen, O.: "Inactivation of *Salmonella typhimurium* by high pressure carbon dioxide", *Food Microbiol.* **17**, 225 – 232, 2000.
5. Hong, S.-I., Pyun, Y.-R.: "Inactivation kinetics of *Lactobacillus plantarum* by high pressure carbon dioxide", *J. Food Sci.* **64**, 728 – 733, 1999.
6. Ulmer, H.M., Gänzle, M.G., Vogel, R.F.: "Effect of compressed gases on the high pressure inactivation of *Lactobacillus plantarum* TMW1.460", in: S. R. Hayashi, (Hrsg.) *Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2002, pp. 317 – 324.
7. Simpson, W. J., Fernandez, Jaqueline L.: "Mechanism of resistance of lactic acid bacteria to trans-isohumulone", *J. Americ. Soc. Brewing Chem.* **52**, 9 – 11, 1994.
8. Sami, M., Yamashita, H., Hirono, T., Kadokura, H., Kitamoto, K., Yoda, K., Yamasaki, M.: "Hop-Resistant *Lactobacillus brevis* contains a novel plasmid harboring a multidrug resistance-like gene", *J. Ferm. Bioeng.* **84**, 1 – 6, 1997.
9. Sami, M., Yamashita, H., Kadokura, H., Kitamoto, K., Yoda, K., Yamasaki, M.: "A new and rapid method for determination of beer-spoilage ability of lactobacilli", *J. Americ. Soc. Brewing Chem.* **55**, S. 137-140, 1997.
10. Palou, E., Lopez-Malo, A., Barbosa-Canovas, G.V., Swanson, B.G.: "High pressure treatment in food preservation", in: Rahman, M.S. (Hrsg.) *Handbook of food preservation*. Marcel Dekker Inc. New York, 1999, S. 533-576.

(Manuskripteingang: 30. 7. 2001)