

Inaktivierung getrockneter, hitzetoleranter Salmonellen in der Schokoladenproduktion



Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Bonn
Forschungseinrichtung(en):	Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e.V. (DIL), Quakenbrück Dr. Volker Heinz/PD Dr. Christian Hertel/Panagiotis Chanos
	Universität Osnabrück FB 5 Biologie/Chemie Abt. Mikrobiologie Prof. Dr. Michael Hensel
Industriegruppe(n):	Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie e. V. (BDSI), Bonn
Projektkoordinatorin:	Barbara Romano Chocoladefabriken Lindt & Sprüngli GmbH, Aachen
Laufzeit:	2021 – 2025
Zuwendungssumme:	€ 498.852,--

Ausgangssituation

Die Mehrzahl der lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüche im Zusammenhang mit Produkten mit niedrigem Feuchtigkeitsgehalt sind auf eine Salmonellenkontamination zurückzuführen. Zwar ist das Überleben von Salmonellen auf getrockneten Lebensmitteln begrenzt, allerdings wurden für Salmonellen auch sehr niedrige Infektionsdosen beschrieben. Schokolade ist im Prinzip aufgrund der niedrigen Wasseraktivität (aW-Wert) ein mikrobiologisch stabiles und sicheres Lebensmittel. In den vergangenen Jahren kam es je-doch immer wieder zu Ausbrüchen durch Salmonellen in Schokoladenprodukten, die z. T. zu Produktrückrufen und finanziellen Verlusten für die Hersteller in Millionenhöhe führten. Im Zeitraum 2010 bis 2017 machten laut Zoonosebericht der EU die Ausbrüche durch Salmonellen in Süßigkeiten und Schokolade über 3 % aller nachweisbaren lebensmittelbedingten Ausbrüche aus.

Die Kontamination von Schokoladenprodukten mit Salmonellen kann durch verunreinigte, trockene Inhaltsstoffe, wie Kakaomasse, Milchpulver oder Nüsse erfolgen, die bei der Herstellung von Schokolade verwendet werden. Die Kontamination der Kakaobohnen mit Salmonellen erfolgt oft in der Trocknungs-phase, vor allem durch tierische Fäkalien in den Erzeugerländern. Die Trocknung von Lebensmitteln wird außerdem mit einer Förderung der Hitzen-toleranz von Salmonellen und anderen Bakterien in Verbindung gebracht. In diesem Zusammenhang hat sich gezeigt, dass Salmonellen unter bestimmten Umständen die hitzeintensiven Prozesse in der Kakaomasse- und Schokoladenherstellung (z. B. Rösten und Conchieren) überleben und auch auf Schokolade mehrere Wochen bis Monate persistieren können. Es wird angenommen, dass dies mitunter mit der Austrocknung der Salmonellen auf den feuchtigkeitsarmen Kakaobohnen und mit der Entwicklung eines Kreuzschutzes gegen Hitze zusammenhängt.

Die Fähigkeit von Salmonellen, durch Austrocknung einen Kreuzschutz gegen Hitze zu entwickeln, ist mit spezifischen genetisch determinierten Stressantworten verbunden. Interessanterweise erwies sich der Stamm *Salmonella Oranienburg*, der an einem Ausbruch in Schokolade 2001 in Deutschland beteiligt war, als hitzeresistenter als sieben andere *Salmonellen*-stämme auf gemahlenen Kakaobohnen. Über den Zusammenhang zwischen der Trocknung von Salmonellen und der Entwicklung der erhöhten Hitzetoleranz in Abhängigkeit der Lebensmittelmatrices liegen allerdings bisher nur wenige Daten vor.

In der industriellen Praxis findet eine Dekontaminierung der Kakaobohnen derzeit beim Röstprozess statt, zum Teil wird auch ein Dekontaminationsprozess mit überhitztem Dampf angewendet. Die Wirksamkeit beider Verfahren hängt dabei von den Prozessparametern ab. Ein Faktor, der hierbei bisher noch nicht berücksichtigt wurde, ist die Hitzebeständigkeit der Salmonellen, die sich aufgrund der Anpassung an die Umgebung mit niedrigem aW-Wert bei der Trocknung der Kakaobohne ändern kann.

Ziel des Forschungsvorhaben war es, das Überleben von Salmonellen beim Trocknungsprozess der Kakaobohnen und die dabei erworbene Toleranz gegen Röstung oder Dampfsterilisation der Kakaobohnen zu untersuchen und genetische Determinanten in Salmonellen zu identifizieren, die das austrocknungsinduzierte Überleben auf der Kakaobohnenmatrix mit der erworbenen Hitzetoleranz in den Dekontaminationsprozessen der Industrie in Verbindung bringen. Dem Vorhaben lag die Arbeitshypothese zugrunde, dass die Expression Stressspezifischer Gene in Salmonellen deren Überleben während der Trocknung der Kakaobohnen fördert und eine Kreuztoleranz gegenüber nachfolgenden Hitzebehandlungen induzieren kann, was zu einer erhöhten Persistenz von Salmonellen auf hitzebehandelten Kakaobohnen führt.

Forschungsergebnis

Im Rahmen dieses Projekts wurde das Überleben von Salmonellen während des Trocknungsprozesses von Kakaobohnen und die mögliche Toleranz gegenüber der Röstung oder Dampfdekontamination der Kakao-bohnen untersucht. Die Wirksamkeit dieser Dekontaminationsverfahren wurde im Zusammenhang mit Kreuzschutzreaktionen der Salmonellenzellen untersucht, da diese durch die Intensität der Kakaobohnenverarbeitung beeinflusst wurden. Ein Teil der Fokussierung dieser Arbeit lag auf der Identifizierung von Genen der Salmonellen, die mit Trockenstress in Verbindung stehen und einen Überlebensvorteil bei der Kakaobohnenverarbeitung verleihen, durch Anwendung modernster Mutagenese-Studien.

Nach Bestätigung des normalen Wachstumsverhaltens und der charakteristischen Antibiotikaprofilen der ausgewählten *Salmonellen*-stämme wurden mithilfe der Tn5-Transposon-Mutagenese umfangreiche Mu-tanten-Bibliotheken mit mehreren hunderttausend Mutanten verschiedener *Salmonellen*-Serovare erstellt, die genetische Vielfalt für die Identifizierung überlebenswichtiger Gene bieten.

Durch systematische Variation von Temperatur und Luftfeuchtigkeit wurden optimale Trocknungsbedingungen für Kakaobohnen ermittelt, mit dem Ziel, das Überleben von Salmonellen zu maximieren und gleichzeitig die erforderliche Reduzierung der Feuchtigkeit in den Kakaobohnen zu erreichen. Interessanterweise zeigte sich, dass säureangepasste Salmonellen während der Trocknung von Kakaobohnen eine erhöhte Überlebensrate aufweisen, was darauf hindeutet, dass eine Kontamination der Kakaobohnen mit Salmonellen in den frühen Stadien der Fermentation einen Vorteil für das Überleben der Salmonellen darstellen könnte, da sie sich so allmählich an den sinkenden pH-Wert während der Fermentation anpassen können.

Analysen der Säurezusammensetzung verschiedener Kakaobohnensorten ergaben Unterschiede im Verhältnis von Essigsäure und Milchsäure, während das natürliche Kakaomikrobiom unabhängig von der Herkunft der Bohnen von Milchsäurebakterien dominiert wurde.

Umfassende genetische Analysen der *Salmonella*-Mutanten, die die milde Trocknung der Kakaobohnen überlebten, ermöglichen die Identifizierung von Genen, die das Überleben von Salmonellen während der Trocknungsstressphase fördern oder beeinträchtigen. Dies wurde durch den Vergleich der relativen Prävalenz von Hunderttausenden von Mutanten vor und nach der Trocknung der Kakaobohnen erreicht. Eine erhöhte

Prävalenz von Mutanten im Endprodukt (nach der Trocknung) bedeutete, dass ihre spezifische Genmutation ihnen einen Vorteil beim Überleben der Trocknung verschaffte.

Die Analyse der Wirkung der Dampfbehandlung auf die Wildtypstämme von *Salmonella Typhimurium* und *Oranienburg* zeigte, dass Salmonellen durch hochintensive Behandlungen wirksam eliminiert werden, während unter milder Bedingungen ($< 130^{\circ}\text{C}$) Zeit als einziger signifikanter Faktor für die Reduzierung von Salmonellen identifiziert wurde. Statistische Analysen bestätigten einen stressinduzierten Kreuzschutzeffekt, wobei ausgetrocknete Salmonellen eine erhöhte Resistenz gegen nachfolgende Hitzebehandlungen entwickelten. Darüber hinaus zeigten nicht ausgetrocknete *S. Oranienburg*-Zellen unabhängig von der Kombination aus Behandlungsdauer und -temperatur eine höhere Hitzeempfindlichkeit.

In Röstversuchen zeigten ausgetrocknete Zellen von *S. Oranienburg* unter allen getesteten Röstbedingungen einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber denen von *S. Typhimurium*. Die Reduzierung der Keimzahl stieg proportional zur Röstdauer, wobei beide Stämme nach 45 Minuten bei 110°C oder 15 Minuten bei 130°C eine Reduzierung um etwa 6 log erreichten. Ein direkter Vergleich ergab, dass nicht getrocknete Salmonellen durch Rösten wirksamer reduziert wurden als trocknungstolerante Salmonellen, die den Trocknungsprozess der Kakaobohnen durchlaufen hatten. Diese Schutzwirkung wurde bei beiden Stämmen bei 110°C für 45 Minuten und bei 130°C für 15 Minuten beobachtet, was einen Nachweis für eine durch Austrocknungsstress erworbene Kreuzschutzwirkung gegen Hitze liefert.

Aufgrund unvorhergesehener Schwierigkeiten bei der Konstruktion spezifischer Mutanten mit einem Überlebensvorteil bei Austrocknung konnte die Untersuchung der Wirkung von Röstung und Dampfbehandlung auf Mutanten nicht abgeschlossen werden.

Diese Forschungsarbeit zeigt, dass Salmonellen, die während der Trocknung von Kakaobohnen Trockenstress ausgesetzt sind, eine erhöhte Resistenz gegenüber nachfolgenden Hitzebehandlungen entwickeln. Die Identifizierung überlebenswichtiger Gene und serovarspezifischer Unterschiede in der Hitzetoleranz ermöglicht die Entwicklung gezielter Dekontaminationsprotokolle, die die ungünstigsten genetischen Szenarien berücksichtigen und letztlich die Lebensmittelsicherheitsstandards in der Kakaoverarbeitung verbessern.

Wirtschaftliche Bedeutung

Die deutsche Süßwarenindustrie erwirtschaftete 2024 im Segment Schokolade einen Umsatz von 7,3 Mrd. €. In Deutschland werden im Durchschnitt pro Jahr und Person 9,6 kg Schokoladenprodukte konsumiert. Daher ist es von großer Bedeutung, dass diese Produkte von hoher Qualität und Sicherheit für die Verbraucher sind. Der Nachweis von Salmonellen und der Rückruf kontaminiierter Produkte kann finanzielle Schäden in Millionenhöhe verursachen und kann insbesondere für kleine und mittelständische Unternehmen (KMU) existenzgefährdend sein.

Die Projektergebnisse zeigten, dass eine geringe Trocknungsrate der Kakaobohnen während des Trocknungsprozesses die Überlebensfähigkeit der Salmonellen erhöht. Die Schokoladenindustrie könnte von diesen Erkenntnissen profitieren, indem die Trocknungsverfahren so angepasst werden, dass eine reduzierte Überlebensfähigkeit der Salmonellen erhalten wird. Außerdem können strengere Kontrollmaßnahmen für Kakaobohnenchargen, die unter überlebensbegünstigenden Bedingungen getrocknet werden, eingeführt werden.

Ein wichtiges Ergebnis ist die Beschreibung von Mindestparametern für das Rösten als Zeit-Temperatur-Kombinationen, die für die Eliminierung von Salmonellen erforderlich sind. Im Vergleich zu früheren Studien berücksichtigte der Ansatz in diesem Vorhaben die durch Trocknung induzierte Hitzeresistenz. Da das Rösten oft die einzige Hitzebehandlung bei KMU in der Schokoladenherstellung ist, können diese Parameter helfen, die Intensität ihres Röstprozesses so zu definieren, dass ein Überleben von Salmonellen ausgeschlossen ist. Die Etablierung eines robusten Prozesses ist für KMU von großer wirtschaftlicher Bedeutung, da sie das Risiko von Produktrückrufen verringt.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass pH-anpassierte Salmonellen eine erhöhte Überlebensrate im Trocknungsprozess aufweisen. Dies könnte bedeuten, dass eine Kontamination in frühen Fermentationsstadien mit höherem Überlebensrisiko verbunden ist. Diese Erkenntnis könnte den Fermentationsbeginn als wichtigen Zeitpunkt für die mikrobiologische Bewertung definieren.

Die Identifizierung von Salmonellen-Genen, welche Überlebensvorteile verleihen, kann die Entwicklung spezifischer, hoch trocknungsresistenter Mutanten erleichtern, die als Goldstandard in Challenge Test dienen können. Solche Mutanten könnten zum Standard für apathogene Ersatzmikroorganismen werden und die Prüfung von Dekontaminationsverfahren unter industriellen Bedingungen erleichtern. Da diese Mutanten spezifisch für Trockenheitsresistenz sind, könnten sie als Grundlage für Studien zu anderen trockenen Zutaten wie Nüssen und Trockenmilchpulver dienen.

Publikationen (Auswahl)

1. FEI-Schlussbericht 2025
2. Panagiotis, C. Hertel, C.: Salmonellen-Inaktivierung in Schokolade: Inaktivierung getrockneter, hitzetoleranter Salmonellen in der Schokoladenproduktion. Jahresbericht des DIL e.V. 2022, 95 (2022)

Weiteres Informationsmaterial

Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e.V. (DIL)

Prof.-von-Klitzing-Straße 7, 49610 Quakenbrück

Tel.: +49 5431 183-142

Fax: +49 5431 183-114

E-Mail: c.hertel@dil-ev.de

Universität Osnabrück

FB 5 Biologie/Chemie

Abt. Mikrobiologie

Barbarastraße 11, 49076 Osnabrück

Tel.: +49 541 969-3940

Fax: +49 541 969-3942

E-Mail: michael.hensel@uni-osnabrueck.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)

Godesberger Allee 125, 53175 Bonn

Tel.: +49 228 3079699-0

Fax: +49 228 3079699-9

E-Mail: fei@fei-bonn.de

Förderhinweis

... ein Projekt der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Energie

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages



FORSCHUNGSKREIS
DER ERNÄHRUNGSGINDUSTRIE E.V.



INDUSTRIELLE
GEMEINSCHAFTSFORSCHUNG

Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn,
wird/wurde im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom
Bundesministerium für Wirtschaft und Energie (BMWE) aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Bildnachweis - Seite 1: © alejomiranda - stock.adobe.com #168538972

Stand: 6. November 2025