

Erhöhte Prozesssicherheit durch eine an das Suspensionsmedium adaptierte thermische Inaktivierung von Bakteriophagen

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Lebensmittel tierischer Herkunft Prof. Dr. J. Hinrichs
Forschungsstelle II:	Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BFEL) Institut für Mikrobiologie, Kiel Prof. Dr. K. J. Heller/Dr. H. Neve
Industriegruppe:	Milchindustrie-Verband e.V., Berlin
	Projektkoordinator: R. Endt, Feinkäserei Hochland GmbH, Schongau
Laufzeit:	2005 – 2007
Zuwendungssumme:	€ 324.200,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Bakteriophagen (Phagen) sind Viren, die Bakterien infizieren, sich in ihren Wirtszellen vermehren und sich nach der Lyse der Bakterienzellen verbreiten. Phageninfektionen sind die häufigste Ursache für Fermentationsstörungen in milchverarbeitenden Betrieben, aber auch ein bekanntes Problem bei anderen bakteriellen Fermentationen in der Lebensmittelindustrie. Die Fermentationsstörung kann unterschiedliche Ausmaße annehmen; in jedem Fall sind jedoch finanzielle Einbußen für die Firmen die Konsequenz.

Phagen gelangen auch über die Rohmilch in die Betriebe, und mit der üblichen Kurzzeit-Pasteurisierung gelingt es nicht, sämtliche Phagen zu inaktivieren. Während der Milchfermentation können sie sich anreichern, so dass z. T. in Molke eine Phagenkonzentration $> 1 \times 10^9$ Phagen/ml nachweisbar ist. Damit besteht bei Rückführung phagenhaltiger Molken das Risiko einer Rekontamination. In der modernen Molkereitechnologie kommen neben Milch vermehrt Milchkonzentrate zum Einsatz, die durch Membrantrennverfahren gewonnen werden. Diese Milchkonzentrate enthalten eine veränderte Inhaltsstoffzusammensetzung, was sich be-

günstig auf die Hitzestabilität von Phagen auswirken kann. Neben der Thermostabilität zeichnen sich Phagen durch eine hohe Vermehrungsrate aus, so dass schon eine anfänglich relativ geringe Anzahl an Phagen zu Säuerungsstörungen führen kann.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, für *L. lactis* oder *S. thermophilus* einen „Testphagen“ zu identifizieren, der eine hohe Thermoresistenz aufweist und somit als Marker für die Erhitzung von Milch und Molke dienen kann. Überdies wurde der Einfluss des Suspensionsmediums auf die Stabilität untersucht. Die Phagenisolate wurden weiterhin elektronenmikroskopisch und genetisch charakterisiert. Ergänzt wurden die Arbeiten durch einige Phagenisolate anderer Starterkulturen (*Lactobacillus delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides*).

Forschungsergebnis:

Im Rahmen einer Probenerhebung wurden aus Molkereien in Deutschland und von Kulturenhstellern insgesamt 130 Proben (Milch, Molke, Frischkäse, Käse, Joghurt, Salzbad, Reinigungslösungen) und Phagenisolate aus Schadensfällen

eingeschickt. Im Phagenmonitoring erwiesen sich bei 50 % der Großunternehmen die Proben als phagenfrei, während bei allen KMU-Betrieben Phagen nachgewiesen wurden. Drei Phagengruppen (c2-, 936- und P335[r1t]-ähnliche *L.-lactis*-Phagen) waren die vorherrschende Phagenpopulation. In allen untersuchten Salzbadproben wurden Phagen nachgewiesen, jedoch fanden sich keine Phagen in säure- und laugenhaltigen Reinigungslösungen.

Die Phagen des Monitorings wurden nach Thermoresistenz gescreent. Repräsentative Phagen aus Sammlungen wurden auch einbezogen, um ein breites Spektrum unterschiedlicher Phagenspecies abzudecken. Es zeigte sich, dass BK5-T- und 949-Laktokokken-Phagen bereits bei 60 - 65 °C (1 min) vollständig und die meisten Laktokokken-Phagenspecies mit 75 - 80 °C zu inaktivieren sind. Jedoch wurden auch zwei besonders thermoresistente *Lactococcus-lactis*-Phagen, P680 (isoliert aus Quark) und P1532 (isoliert aus Sauerrahm) gefunden, die der 936-Hauptphagengruppe zuzuordnen sind. Die untersuchten *S.-thermophilus*- und *Lactobacillus-delbrueckii*-Phagen erwiesen sich als weniger hitzestabil, und die Inaktivierung wurde durch 80 °C (1 min) erreicht.

Im Folgenden wurde die Inaktivierungskinetik (Reaktionsordnung n , Aktivierungsenergie E_A , Geschwindigkeitskonstante $k_{T,ref}$) sowohl für die zwei thermoresistenten Phagen (P680 und P1532) als auch für den Referenzphagen P008 experimentell ermittelt. Die Inaktivierung in verschiedenen Suspensionsmedien zeigte, dass Milch einen schützenden Effekt besitzt. Weitere Experimente mit einzelnen Milchbestandteilen lassen vermuten, dass das Casein aufgrund seiner hohen Pufferwirkung diesen Effekt indirekt hervorruft. In weiteren Experimenten wurde der Frage nachgegangen, ob Phagen in Reinigungslösungen aktiv bleiben. Auch bei einer simulierten Schutzlast von 10 % Magermilch waren nach 10 min bei Raumtemperatur bei pH 2 (Salpetersäure) oder pH 12 (Natronlauge) keine aktiven Phagen nachweisbar.

Aus den experimentellen Daten der Inaktivierungskinetik für die thermoresistenten Phagen (P680 und P1532) wurden Linien gleichen Effekts für Milch (Basis: Reduktion 3-log und 9-log) berechnet. Aus Infektionsexperimenten mit Phagen während einer Fermentation kann abgeschätzt werden, dass Säuerungsstörungen bereits auftreten, wenn aktive Phagen in einer Konzentration von 10^2 Phagen/ml zu Beginn

vorhanden sind. In Rohmilch können 10^2 Phagen/ml enthalten sein. Erhitzungsbedingungen sind damit für Milch und Kulturenmedium (auf Basis Magermilch) oberhalb der 3-log-Linien zu wählen. Für die Rückführung von Molkenrahm oder Molkenkonzentrat in der Käseherstellung sollte man sich, sofern besonders hitzeresistente Phagen vorhanden sind und da die Molke wesentlich höher mit Phagen belastet sein kann, bezüglich der Erhitzungsbedingungen an der 9-log-Phageninaktivierungslinie orientieren.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Milchwirtschaft nimmt innerhalb der deutschen Ernährungsindustrie eine Spitzenstellung ein. Besonders die Produktion von Käse und Joghurt wächst stetig an. Mit einer jährlichen Käseproduktion von 1.941.000 t ist Deutschland EU-weit an erster Stelle. Auch im Export von Milchprodukten steht Deutschland an der Spitze Europas. Der Käsemarkt ist allerdings dem internationalen Wettbewerb sehr stark ausgesetzt, so dass erhebliche Anstrengungen für seine Verteidigung notwendig sind.

Säuerungsstörungen durch Bakteriophagen kommen meist überraschend, und viele KMU haben ein- bis zweimal im Monat mit phagenbedingten Problemen zu kämpfen. Qualitätsverlust, Verzögerungen des Prozesses bis hin zum Verlust einer kompletten Charge mit entsprechenden zeitlichen und finanziellen Einbußen sind die Folge. Unter der Annahme, dass 0,5 % der Chargen störungsbehaftet sind, lässt sich die Größenordnung des finanziellen Verlusts grob abschätzen: Bei einer jährlichen Käseproduktion in Deutschland von 2 Mio. t wären 10.000 t betroffen. Bei einem Mindererlös (bzw. zusätzlichen Kosten) von 1 € je kg Käse beträgt der Verlust für die deutsche Milchwirtschaft 10 Mio. € pro Jahr.

Durch die im Forschungsprojekt erarbeiteten Erkenntnisse bezüglich Verbreitung und Identität problematischer Phagen und ihres thermischen Inaktivierungsverhaltens liegen nunmehr Daten vor, aus denen Erhitzungsbedingungen für Rohmilch sowie zurückgeführter Molkenrahm und zurückgeführte Molkenkonzentrate abgeleitet werden können. Damit kann die Produktionssicherheit in KMU erhöht sowie Qualitätsprobleme minimiert und schließlich Kosten eingespart werden.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2007.
2. Atamer, Z., Dietrich, J., Neve, H., Heller, K.J. und Hinrichs, J.: Influence of the suspension media on the thermal treatment of mesophilic lactococcal bacteriophages. Intern. Dairy J. 20, 408-414 (2010).
3. Atamer, Z. und Hinrichs, J.: Thermal inactivation of the heat-resistant *Lactococcus lactis* bacteriophage P680 in modern cheese processing. Intern. Dairy J. 20, 169-168 (2010).
4. Hinrichs, J.: Hitzeresistente Phagen – ein Problem für die moderne Käsertechnologie. Tagungsband 66. FEI-Jahrestagung 2008, 73-88 (2009).
5. Neve, H., Dietrich, J., Ali, Y., Atamer, Z., Hinrichs, J. und Heller, K. J.: Phagenkontrolle in Molkereien – Neue Erkenntnisse zur Phageninaktivierung. Deutsche Milchwirt. 22, 828-834 (2008).
6. Müller-Merbach, M., Kohler, K. und Hinrichs, J.: Environmental factors for phage induced fermentation problems: Replication and adsorption of the lactococcal phage P008 as influenced by temperature and pH. Food Microbiol. 24 (7/8), 695-702 (2007).
7. Müller-Merbach, M., Peter, K., Weidenfelder, K. und Hinrichs, J.: Diffusion of bacteriophages in an agar gel and in a fermented milk matrix. Milchwiss. – Milk Science Intern. 62 (1), 24-27 (2007).

Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BFEL)
Institut für Mikrobiologie
Hermann-Weigmann-Str. 1, 24103 Kiel
Tel.: 0431/609-2302, Fax: 0431/609-2306
E-Mail: knut.heller@bfel.de

neue Bezeichnung der BFEL ab 1.01.2008

Max Rubner-Institut
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel
Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie
Hermann-Weigmann-Str. 1, 24103 Kiel
Tel.: 0431/609-2302, Fax: 0431/609-2306
E-Mail: knut.heller@mri.bund.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: 0228/372031, Fax: 0228/376150
E-Mail: fei@fei-bonn.de

Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hohenheim
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie
FG Lebensmittel tierischer Herkunft
Garbenstraße 21, 70599 Stuttgart
Tel.: 0711/459-23792, Fax: 0711/459-23617
E-Mail: jh-lth@uni-hohenheim.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via:

