

**Bewertung der an das Suspensionsmedium adaptierten
Thermostabilität von *Leuconostoc*-Phagen als Grundlage
für eine verbesserte Prozesssicherheit**

- Anschluss zu AiF 14339 N -

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Lebensmittel tierischer Herkunft Prof. Dr. Dr. J. Hinrichs/M.Sc. Z. Atamer
Forschungsstelle II:	Max-Rubner-Institut (MRI) Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Kiel Prof. Dr. K. J. Heller /Dr. H. Neve
Industriegruppe:	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin
	Projektkoordinator: R. Endt, Hochland Deutschland GmbH, Heimenkirch
Laufzeit:	2008 – 2010
Zuwendungssumme:	€ 155.100,-- (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 Zellen verbreiten. Phageninfektionen sind eine der häufigsten Ursachen für Fermentationsstörungen in Molkereien, aber auch ein bekanntes Problem bei anderen Fermentationen in der Lebensmittelindustrie und haben erhebliche finanzielle Einbußen zur Folge. Die Störung kann unterschiedliche Ausmaße annehmen und sowohl die Aktivität der Säuerungs- als auch der Aromakulturen betreffen.

Wichtige Aromakulturen sind *Leuconostoc*-Starterbakterien. Sie sind stets mit Laktokokken in mesophilen komplexen Starterkulturen assoziiert, stellen aber die Minorkomponente dar (1-10 %). Das ökologische Habitat der *Leuconostoc*-Stämme ist z.B. Futtergras. Daher kann über die Rohmilch aus den milcherzeugenden Betrieben ein Eintrag von *Leuconostoc*-Bakteriophagen erfolgen, die dann die Hürde der Milch-

pasteurisierung überspringen. Die Folge kann eine Minderung der Produktqualität sein. *Leuconostoc*-Stämme übernehmen unverzichtbare Funktionen in der Milchfermentation, die im Falle einer Phageninfektion teilweise entfallen, wie z.B. die Bildung von Aromastoffen, wie Diacetyl, Abbau von Acetaldehyd bei hoher Konzentration, Ausbilden kleiner Rundlöcher in Schnittkäse und Schaffung einer offenen Textur in Edelschimmelkäse. Zur thermischen Resistenz der *Leuconostoc*-Phagen und zur Kinetik ihrer Inaktivierung liegen keine vergleichbaren Daten vor wie sie in einem Vorläuferprojekt für Laktokokken-Phagen erarbeitet wurden.

Im Rahmen eines IGF-Vorläuferprojekts des FEI (AiF 14339 N) wurden bereits die phagenbedingten Säuerungsstörungen bei Starterkulturen untersucht. Dabei blieb unberücksichtigt, dass aus Phageninfektionen der aromabildenden *Leuconostoc*-Starterkulturen insbesondere in Käseprodukten unerwünschte Schwankungen im organoleptischen Profil und in der Textur und Lochung resultieren können.

Allerdings bleiben *Leuconostoc*-Phageninfektionen im Prozessablauf meist unbemerkt und werden erst im Endprodukt festgestellt.

Ziel des Forschungsvorhabens war es daher, aufbauend auf den Ergebnissen dieses Vorhabens für die Wirtsspecies *Leuconostoc*-Phagenisolate mit hoher Hitzeresistenz zu identifizieren, für zwei herausragende Phagen die thermische Inaktivierungskinetik zu bestimmen und den Einfluss des Mediums auf die Stabilität und Infektiosität der Phagen zu analysieren.

Forschungsergebnis:

Für das *Leuconostoc*-Phagenmonitoring wurden 127 Proben (Milch-, Produkt-, und Salzbadproben) aus 26 deutschen Molkereien (15 Großbetriebe und 11 kleinere Betriebe) bezogen. Es wurden 54 *Leuconostoc*-Phagen aus Proben von 4 Groß- und 7 kleineren Betrieben isoliert. Die *Leuconostoc*-Phagentiter schwankten in den Milchproben zwischen 1×10^2 und 7×10^6 Plaquebildende-Einheiten (PbE) pro ml, in den Produktproben zwischen 6×10^1 und 6×10^6 PbE/ml und in den Salzbadproben zwischen 2×10^2 und 5×10^6 PbE/ml. Damit liegen die maximalen Titer der *Leuconostoc*-Phagen deutlich unter den Höchstwerten für Phagen der *Lactococcus-lactis*-Säuerungskulturen (mit bis zu 10^9 PbE/ml). Die unterschiedlichen maximalen Phagentiter korrelieren somit gut mit den unterschiedlichen Keimzahlen der Säuerungs- und der Aromabakterien in den komplexen D- und DL-Kulturen. Dieses *Leuconostoc*-Phagenmonitoring dokumentiert zum ersten Mal, dass auch mit phagenbedingten Störungen der Aktivität der Aromakulturen in Molkereien zu rechnen ist.

Insgesamt wurden aus den Betriebskulturen 150 *Leuconostoc*-Stämme isoliert, weitere 101 Stämme wurden Stammsammlungen entnommen. Die Stämme waren *Ln.-mesenteroides*- und *Ln.-pseudomesenteroides*-Kulturen. Für 177 *Leuconostoc*-Kulturen wurde eine Lysogenierate von ca. 23 % ermittelt. Für die temperenten Phagen wurden keine Wirte gefunden.

Die 54 Betriebsphagen und weitere 35 Phagen wurden in 2 Genotypen (*Ln.-mesenteroides*- und *Ln.-pseudomesenteroides*-Phagen) typisiert, für die ein universelles PCR-Nachweissystem entwickelt wurde. Dieses PCR-„Tool“ zur Detektion der *Leuconostoc*-Phagen wurde auch hinsichtlich seiner Praxistauglichkeit überprüft.

In einem Temperaturbereich von 65 bis 85 °C wurden insgesamt 77 *Leuconostoc*-Phagen auf ihre Thermostabilität überprüft. Eine lytische Aktivität der 32 Phagen (42 %) konnte noch nach der Hitzebehandlung bei 85 °C nachgewiesen werden. Aus diesen stabilen Phagen wurde der Phage P793, der aus Milch eines kleineren Betriebes isoliert worden war, für weitere Untersuchungen als „Testphage“ ausgewählt. Für diesen thermostabilsten Phagen P793 wurde die Inaktivierungskinetik mit den Parametern Reaktionsordnung (n), Geschwindigkeitskonstante (k_{Tref}) und Aktivierungsenergie (E_A) bestimmt. Die Temperatur-Zeit-Kombination einer Kurzzeiterhitzung oder Dauererhitzung ist nicht ausreichend für die Inaktivierung des Phagen P793 in Milch um 9 log-Stufen und in Milch um 3 log-Stufen. Nur eine Hocherhitzung liefert bei entsprechender Auslegung die notwendige Sicherheit.

Im Vergleich zu den Inaktivierungsversuchen in Wasser wiesen die Phagen in Milch eine höhere Thermostabilität auf. Die Erhitzungsversuche wurden mit verschiedenen Suspensionsmedien für den Modellphagen P793 durchgeführt, um den Einfluss der Milchkomponenten auf die thermische Inaktivierung zu untersuchen. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche verdeutlichen, dass die thermische Inaktivierung des Modellphagen P793 vom Suspensionsmedium abhängt. Die höchste thermische Resistenz zeigte der Phage P793 in UHT-Milch (< 0,3 % Fett), in Mikrofiltration-Retentat und in Casein (2,8 % Protein). Die Inaktivierungsversuche der Phagen in Molkenproteinsuspension und in Molkenrahm zeigten, dass ein höherer Molkenproteingehalt und Molkenrahm keine wesentliche Auswirkung auf die Hitzebeständigkeit des Phagen hatten.

Die Vermehrungsparameter der beiden ausgewählten Modellphagen P793 und P832 wurden mit Hilfe von Einstufen-Wachstumsexperimenten und Phagenadsorptions-Experimenten bestimmt.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Forschungsergebnisse können in diversen Fachgebieten und Wirtschaftszweigen zur Verbesserung der Prozesssicherheit in der Produktion genutzt werden, denn bakterielle (potentiell phagensensible) Fermentationen finden sich sowohl in der Lebensmittel-, Bio- und Gentechnik als auch in der Mikrobiologie und Hygiene.

Die Milchwirtschaft nimmt in der deutschen Lebensmittelindustrie mit 37.000 Beschäftigten in 101 Unternehmen eine Spitzenstellung ein. Der Käsemarkt, auf dem Deutschland EU-weit an erster Stelle liegt, ist ein dem internationalen Wettbewerb stark ausgesetzter Markt. 2006 betrug die Käseproduktion in Deutschland ca. 2 Mio Tonnen. Deutschland liegt EU-weit an erster Stelle bei der Käseproduktion. Der Käseexport konnte bei guter Marktlage von 2005 auf 2006 in EU-Länder um 15 % und in andere Drittländer um 20 % ausgeweitet werden.

Phagenbedingte Säuerungsstörungen treten unvorhergesehen auf (bei bis zu 5 % der Produktchargen). Wenn *Leuconostoc*-Phagen nur 1 % der Produktion beeinträchtigen, dann wären bereits 3.000 t (Wert ca. 9 Mio €) Gouda und Edamerkäse (Schätzwert) betroffen. Bei einer Reduktion des Werts um lediglich 10 % würde dieses einen Verlust von 900.000 € p.a. bedeuten. Kleinere Betriebe sind besonders betroffen, da sie kaum in der Lage sind, Chargen minderer Qualität in anderen Produktionslinien weiter zu verarbeiten oder unter anderer Bezeichnung zu vermarkten. Marktanalysen zeigen, dass bereits geringe sensorische Abweichungen vom Verbraucher wahrgenommen werden und sich negativ auf den potentiellen Wiederkauf des Produktes auswirken. Da *Leuconostoc*-Stämme kaum zur Säuerung beitragen, wird ein Phagenbefall zunächst häufig nicht bemerkt. Allerdings führt dieser häufig zu Qualitätsschwankungen im Endprodukt, z.B. zu Texturfehlern und/oder einem Aromafizit. Die Ergebnisse des Vorhabens und eine bessere Kenntnis der problemverursachenden Phagen und ihrer Inaktivierungskinetischen Daten werden dazu beitragen, schwankende Produktqualitäten künftig zu reduzieren.

Das im Projekt erarbeitete universelle PCR-Detektionssystem für alle virulenten *Leuconostoc-mesenteroides*- und *Leuconostoc-pseudomesenteroides*-Phagen ist ein wichtiges Werkzeug die Phagensicherheit insbesondere in kleineren Betrieben zu verbessern.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2010.

2. Neve, H.: Biologische und funktionelle Vielfalt bei Bakteriophagen der Milchsäurebakterien. Tagungsband Österr. Milchwirt. Tagung, 63-66 (2012).
3. Atamer, Z., Neve, H., Heller, K.J. und Hinrichs, J.: *Leuconostoc*-Bakteriophagen in Molkereien – Teil II: Thermische Inaktivierung. Milchwirt. 11, 371-375 (2011).
4. Atamer, Z., Ali, Y., Neve, H., Heller, K.J. und Hinrichs, J.: Thermal resistance of bacteriophages attacking flavor-producing dairy *Leuconostoc* starter cultures. Intern. Dair. J. 21, 327-334 (2011).
5. Neve, H., Ali, Y., Niehus, C., Atamer, Z., Hinrichs, J. und Heller, K.J.: *Leuconostoc*-Bakteriophagen in Molkereien - Teil I: Phagenstatus, Charakterisierung und Detektion. Milchwirt. 6, 208-213 (2010).
6. Heller, K.: Überlebenshilfe für Milchsäurebakterien. I-SH – Lebensmittel und Ernährungsforschung in Schleswig-Holstein, 12 (2010).

Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hohenheim
 Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie
 FG Lebensmittel tierischer Herkunft
 Garbenstraße 21, 70599 Stuttgart
 Tel.: 0711/459-3792, Fax: 0711/459-3617
 E-Mail: jh-lth@uni-hohenheim.de

Max-Rubner-Institut (MRI)
 Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel
 Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie
 Hermann-Weigmann-Str. 1, 24103 Kiel
 Tel.: 0431/959-2340, 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

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

gefördert durch/via:

