

## “Emerging Spores” – Bestimmung von Prävalenz und thermischen Inaktivierungsdaten von hitzeresistenten Sporenbildnern in Milchprodukten für eine erhöhte Prozesssicherheit

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle I:</b>	Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Lebensmittel tierischer Herkunft Prof. Dr. Dr. J. Hinrichs
<b>Forschungsstelle II:</b>	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung Abt. Mikrobiologie Prof. Dr. S. Scherer/Prof. Dr. M. Ehling-Schulz
<b>Industriegruppe:</b>	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin
	Projektkoordinator: Dipl.-Ing. R. Beduhn J. Bauer GmbH & Co.KG, Wasserburg
<b>Laufzeit:</b>	2009 - 2011
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 469.650,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Sporenbildner in sterilisierten Lebensmitteln stellen, auch wenn sie nur vereinzelt nachgewiesen werden, eine reale Gefahr mit beträchtlichen wirtschaftlichen Konsequenzen für die produzierenden Unternehmen dar. Rückrufaktionen, die mit erheblichen finanziellen Einbußen verbunden sind und zu einem Imageschaden für das Unternehmen und z. T. auch für die Branche führen können, sind häufig die Folge. Um geeignete Gegenmaßnahmen für die Steigerung der Produktsicherheit einleiten zu können, müssen die Ursachen der Kontamination erkannt werden. Die Vorgehensweise hierbei ist heute weitgehend systematisiert: Aus der sicheren Identifizierung und den thermischen Inaktivierungsdaten der gefundenen Keime können Rückschlüsse auf Rekontaminationen oder Probleme bei der Hitzebehandlung gezogen werden. Das ist nicht möglich, wenn Identität oder thermische Inaktivierungseigenschaften des gefundenen Sporenbildners nicht, oder nicht ausreichend bekannt sind; die Fehlerursache bleibt dann unklar.

Der zunehmende weltweite Handel mit haltbaren Lebensmitteln und der Einsatz importierter Lebensmittelzutaten in neuen Produkten erzeugen neue Quellen von Sporenbildnern und potenziellen Nischen für deren Persistenz. Weil die Vielfalt an Produkten zunimmt, über die unbekannt thermoresistente Sporen in das zu konservierende Produkt eingetragen werden, war es Ziel des Forschungsvorhabens, hitzeresistente Sporenbildner zu identifizieren und ihre thermischen Inaktivierungsdaten zu erfassen. Dabei sollten aus Rohstoffen und Schadensfällen, die im Zusammenhang mit Sterilprozessen stehen, Sporenbildner isoliert werden und Stämme mit ungenügender Datenlage bezüglich ihrer Identität, der taxonomischen Stellung, des verderbniserregenden Potentials und der thermischen Stabilität ihrer Sporen charakterisiert werden. Bei besonders hitzeresistenten Isolaten wurden die kinetischen Parameter der Hitzeinaktivierung genauer bestimmt. Zudem sollte untersucht werden, welche Lebensmittelinhaltsstoffe die Hitzeresistenz steigern können und ob die Inaktivierung systemabhängig ist (Batch *versus* kontinuierliches System).

### Forschungsergebnis:

Im Rahmen des Projektes wurden 360 sporenbildende Isolate aus der Lebensmittelindustrie identifiziert und anschließend mit den Sporen dieser Stämme ein Hitze-Vorscreening bei 100 °C für 20 min durchgeführt, welches ca. 17 % der Isolate (v.a. *Bacillus subtilis*) überlebten. Darüber hinaus wurden 108 Lebensmittelproben auf die Anwesenheit von Sporenbildnern hin überprüft. Aus 57 dieser Lebensmittelproben wurden nach Erhitzung (100 °C, 20 min) und Anreicherung insgesamt 104 sporenbildende Isolate gewonnen. Bei erneuter Erhitzung der hergestellten Sporensuspensionen erwiesen sich allerdings nur ca. 60 % dieser Stämme als hitzeresistent, was auf einen großen Einfluss der Umweltfaktoren bzw. Lebensmittelmatrix auf die Hitzeresistenz hindeutet. Unter den hitzeresistenten Arten waren am stärksten *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus* und *Bacillus licheniformis* vertreten. Dabei war die Lebensmittelherkunft dieser resistenten Stämme sehr vielfältig (z. B. Milchproben, unerhitzte Produktvorstufen, Pudding, Gewürze etc.). Die Charakterisierung des verderbniserregenden Potentials der hitzeresistenten Isolate ergab, dass 51 % der Stämme proteolytische Aktivität, 30 % lipolytische, 20 % hämolytische und 16 %  $\beta$ -Galactosidase Aktivität aufwiesen. Lecithinase Aktivität sowie Zytotoxizität konnte nur bei *Bacillus-cereus*-Isolaten nachgewiesen werden.

Es wurden unterschiedliche Sporulationsmedien untersucht und daraus ein Standardprotokoll zur Gewinnung der Sporensuspensionen erstellt. Anhand dieses Protokolls wurden Sporensuspensionen 38 ausgewählter Stämme gewonnen. Diese wurden auf ihre Hitzeresistenz bei 110, 120 und 125 °C mit 30 min Heißhaltezeit gescreent. Ca. 25 % der untersuchten Stämme wurden durch eine Erhitzung bei 125 °C für 30 min nicht vollständig inaktiviert. Stämme - insbesondere isoliert aus Gewürzen - können Sterilisationsverfahren überleben. Aus diesen Stämmen wurden drei der besonders hitzeresistenten Stämme für die Bestimmung der Inaktivierungskinetiken ausgewählt.

Die Inaktivierungskinetiken wurden für zwei *Bacillus-amyloliquefaciens*-Stämme sowohl in einer Batch- als auch in einer kontinuierlichen Technikanlage bestimmt. Zusätzlich wurde ein *Bacillus-smithii*-Stamm in der Batch-Anlage untersucht. Die kinetischen Parameter wurden berechnet und Linien gleichen Effekts für die Inaktivierung um 9 log bestimmt. Die Stämme

wurden als hochhitzeresistent bestimmt und sie können UHT-Erhitzungsverfahren überstehen. Von einem *B.-licheniformis*-Stamm wurden Inaktivierungskurven in Milch und Schmelzkäse bestimmt, um den Einfluss des Erhitzungsmediums auf die Hitzeresistenz der Sporen zu ermitteln. Die Sporen waren in Schmelzkäse resistenter als in Milch.

Der Einfluss des Erhitzungssystems auf die Inaktivierung der Sporen wurde am Beispiel zweier *B.-amyloliquefaciens*-Stämme experimentell untersucht. Linien gleichen Inaktivierungseffekts wurden erstellt und die vereinten Konfidenzbereiche der kinetischen Parameter berechnet. Mit einer neuen Berechnungsmethode können aus Temperatur-Zeit-Profilen von Batchversuchen und kontinuierlichen Experimenten zur Inaktivierung die kinetischen Parameter bestimmt werden. Wesentlich ist dafür die genaue Erfassung und Messung der Temperaturprofile einschließlich der Aufheizung und Abkühlung in beiden Erhitzungssystemen. Bei Anwendung dieser neuen Methode wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den berechneten kinetischen Parameter für die Batcherhitzung und der kontinuierlichen Erhitzung ermittelt.

Am Beispiel von 18 hitzeresistenten und 13 nicht hitzeresistenten *B.-subtilis*-Stämmen wurden verschiedene „Sporeneigenschaften“ bezüglich einer möglichen Korrelation zur Thermoresistenz hin untersucht. Dabei zeigte sich kein direkter Zusammenhang zwischen der stammspezifischen Hitzeresistenz und dem Dipicolinsäuregehalt der Sporen, der Hydrophobizität der Sporen sowie dem Potenzial zur Biofilmbildung. Allerdings war es möglich, mittels verschiedener Methoden (z.B. FTIR-Spektroskopie von hergestellten Sporensuspensionen und genetische Methoden, wie REP-PCR bzw. Gensequenzierung) eine relativ genaue Grobeinteilung der *B.-subtilis*-Stämme in die Kategorien „hitzeresistent“ und „nicht hitzeresistent“ durchzuführen. Die geringste Fehlerquote wies dabei die Multilocus-Sequenzierung auf, bei der der Stammtypisierung bzw. Differenzierung auf der Sequenzierung von sieben ausgewählten Haushaltsgenen beruht.

### Wirtschaftliche Bedeutung:

Die deutsche Milchindustrie ist eine der leistungsstärksten Branchen der Lebensmittelindustrie (21 Mrd. € Umsatz). Über den durch Sporenbildner in UHT-Produkten verursachten

gesamtwirtschaftlichen Schaden existieren zwar keine bundesweiten Zahlen, doch dürfte sich dieser pro Jahr im zweistelligen Millionen-Euro-Bereich bewegen.

Im Rahmen des Forschungsvorhabens konnten „Kontaminationsquellen“ für Sporenbildner ermittelt werden und Hinweise auf besonders gefährdete Lebensmittelprodukte bzw. Zutaten gewonnen werden. Durch die Ermittlung des Zusammenhangs zwischen Kontaminationsquellen und sensiblen Lebensmittelgruppen wurden der Milchindustrie Daten zur Verfügung gestellt, die im Bereich der Vermeidung von Schadensfällen sowie der Ursachenforschung bei Schadensfällen von Nutzen sein können. Zudem wurden Methoden etabliert, die eine schnelle Speziesidentifizierung von Sporenbildnern sowie eine grobe Einteilung hinsichtlich ihrer Hitzeresistenz ermöglichen. Diese Methoden können von den Unternehmen genutzt werden, um nach einer erfolgreichen Artidentifikation besser beurteilen zu können, ob die Kontaminante eine Gefahr für den Prozess und das Produkt darstellen. Ebenso können Forschungsstellen nun nach Identifikation eines Sporenbildners durch die zusätzlichen im Projekt herausgearbeiteten Informationen bezüglich der thermischen Resistenz und des verderbniserregenden Potenzials gezielter Unternehmen beraten.

Das Projekt liefert Daten zur Hitzeresistenz unterschiedlicher Spezies. In Verbindung mit den Informationen über die Herkunft der resistenten Sporenbildner können die Unternehmen selbst eine Einschätzung vornehmen, ob durch ihre Zutaten potenziell hitzeresistente Sporen in das Produkt eintragen werden. Zusätzlich wurden die detaillierten Inaktivierungskinetiken verschiedener hitzeresistenter Sporenbildner mit dem Potenzial, Produktverderb hervorzurufen, in unterschiedlichen Systemen bestimmt. Es wurde gezeigt, dass in bestimmten Erhitzungsmedien die Inaktivierung der Sporen langsamer verläuft als in anderen. Die Unternehmen können anhand dieser Daten die Prozessparameter der Erhitzungsverfahren anpassen, um die Prozesssicherheit zu erhöhen oder auch inhaltsstoffschonender thermisch zu behandeln.

Die experimentellen Arbeiten zeigen Ursachen auf, die zu Unterschieden und widersprüchlichen Aussagen in der Literatur bzgl. Inaktivierungskinetiken und -parametern führen können. Zukünftig sollte demnach das reale experimentelle

Temperaturprofil in der Berechnung kinetischer Inaktivierungsparameter für Sporen einfließen, wobei dieses mit der neu entwickelten dynamisch-integralen Methode möglich ist. Die Methode kann ggf. zukünftig auch genutzt werden, um in der Industrie auf Pilotanlagen direkt im komplexen Lebensmittelsystem Inaktivierungsparameter zu bestimmen, um damit industrielle Prozesse auszulegen.

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI- Schlussbericht 2011.
2. Lücking, G., Stoeckel, M., Atamer, Z., Hinrichs, J. und Ehling-Schulz, M.: Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and products spillage. Intern. J. Food Microbiol. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.004 (2013).
3. Witthuhn, M., Triebel, I., Hinrichs, J. und Atamer, Z.: Bacillus spores as a risk for the safety of processed cheese. EDM Eur. Dair. Mag. 3, 9-13 (2011).
4. Witthuhn, M., Triebel, I., Hinrichs, J. und Atamer, Z.: Bacillus-Sporen als Risiko für die Sicherheit von Schmelzkäse. DMW 17, 570-574 (2011).
5. Witthuhn, M., Lücking, G., Atamer, Z., Ehling-Schulz, M. und Hinrichs, J.: Thermal resistance of aerobic spore formers isolated from food products. Intern. J. Dair. Technol. 64, 486-493 (2011).

#### Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hohenheim  
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie  
FG Lebensmittel tierischer Herkunft  
Garbenstraße 21, 70599 Stuttgart  
Tel.: +49 711 459-23792  
Fax: +49 711 459-23617  
E-Mail: jh-lth@uni-hohenheim.de

Technische Universität München  
Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittel-  
forschung, Abt. Mikrobiologie  
Weihenstephaner Berg 3, 85354 Freising  
Tel.: +49 8161 71-3516  
Fax: +49 8161 71-4512  
E-Mail: siegfried.scherer@wzw.tum.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn  
Tel.: +49 228 3079699-0  
Fax: +49 228 3079699-9  
E-Mail: [fei@fei-bonn.de](mailto:fei@fei-bonn.de)

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

gefördert durch/via:



Bundesministerium  
für Wirtschaft  
und Technologie

**AiF** ALLIANZ  
INDUSTRIE  
FORSCHUNG

