

Hitzestabile mikrobielle Enzyme in Rohstoffen zur Milchverarbeitung – Qualitätssicherung, Entwicklung eines Testsystems und technologische Optionen

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährung und Lebensmittelforschung (ZIEL) Abt. Mikrobiologie Prof. Dr. Siegfried Scherer/Dr. Mareike Wenning
Forschungsstelle II:	Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Lebensmittel tierischer Herkunft Prof. Dr. Dr. Jörg Hinrichs
Forschungsstelle III:	Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Biotechnologie Prof. Dr. Lutz Fischer/Dr. Bertolt Kranz/Dr. Timo Stressler
Industriegruppe:	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin Projektkoordinator: Angelika Schlösser Käserei Champignon Hofmeister GmbH & Co. KG, Lauben
Laufzeit:	2011 – 2014
Zuwendungssumme:	€ 674.200,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Enzyme in den Basiskomponenten Rohmilch und konzentrierte Milchhalbfabrikate der Milchverarbeitung sind entweder endogener Herkunft, werden durch bakterielle Kontaminanten produziert oder kommen im Fall des Halbfabrikats Molkenkonzentrat aus der Käseproduktion (Ursprung: Starterkulturen, Labpräparat). Während milcheigene Enzyme zu einem großen Teil durch Pasteurisierungsverfahren inaktiviert werden, besitzen die von Mikroorganismen gebildeten Enzyme eine unterschiedliche Hitzestabilität. Einige überstehen sogar die UHT-Behandlung (Ultra-High-Temperature > 135°C für wenige Sekunden). Damit sind bakterielle Enzyme, vor allem Peptidasen und Lipasen, in Endprodukten, wie Konsummilch oder fermentierten Milchprodukten, zu finden, aber auch in

Halbfabrikaten, wie Magermilch- oder Molkenkonzentrat, die von den Molkereien entweder selbst produziert, zugekauft und bei der Verarbeitung als Rezepturbestandteil eingesetzt werden. Auch wenn die bakteriellen Kontaminanten oder Starterkulturorganismen mit den üblicherweise eingesetzten Erhitzungsverfahren ausreichend inaktiviert wurden, können die von diesen gebildeten extra- und intrazellulären Enzyme die Hitzebehandlungen überstehen. Diese Enzyme können im Laufe einer langen Lagerung auch bei geringer Aktivität die Milchproteine und das Milchlipoide so verändern, dass die texturale bzw. sensorische Qualität der Endprodukte beeinträchtigt wird. Die Forderung des Handels nach immer längeren Haltbarkeiten für die verarbeiteten Milchprodukte und steigende Exportanteile

stellen an die eingesetzten Milchkomponenten erweiterte Qualitätsanforderungen hinsichtlich der mikrobiellen Ausgangsbelastung. Nicht erfasst werden in den mikrobiologischen Analysen die durch die jeweilige bakterielle Flora gebildeten Enzyme. Werden zudem konzentrierte Halbfabrikate, die üblicherweise thermisch behandelt sind, in der Produktion eingesetzt, so werden zwar die mikrobiellen Vorgaben erfüllt, doch kann die begleitende mikrobiell generierte enzymatische Aktivität die physikalisch-chemische und sensorische Haltbarkeit einschränken. Bei Reklamationen können Milchunternehmen die deklarierte Haltbarkeit verkürzen, allerdings kann dies die Auslastung bei Handelsunternehmen oder den Verlust an Exporten nach sich ziehen.

Es ist deshalb wirtschaftlich von großem Interesse, die Zusammenhänge zwischen Keimflora und Enzymaktivität in Rohmilch bzw. in Halbfabrikaten sowie der damit erzielbaren Produktqualität zu erforschen. Neben der Bestimmung der Enzymaktivität ist eine Unterscheidung hinsichtlich ihrer thermischen Stabilität von großer Bedeutung. Bisher fehlt dazu ein einfacher und valider Test. Mit einem solchen Enzymtest wäre einerseits die Klassifizierung und Auswahl (Ablehnung) von eingesetzten Milchkomponenten möglich (Qualitätssicherung), andererseits kann in Hinblick auf die texturale und sensorische Haltbarkeit die geeignete Verarbeitungsschiene ausgewählt werden (Produktionssteuerung, technologische Optionen).

Ziel des Forschungsvorhabens war es, eine Lücke im Qualitätssicherungssystem der Milchindustrie zu schließen, die für die Beurteilung der mikrobiell generierten enzymatischen Aktivitäten in Rohmilch und konzentrierten Halbfabrikaten notwendig ist. Milchwirtschaftliche Unternehmen sollen in die Lage versetzt werden, anhand entwickelter Qualitätskriterien und eines Nachweissystems die Qualität von Rohmilch und Halbfabrikaten zu kontrollieren und nach ihrer Eignung für bestimmte Verarbeitungsprozesse auszuwählen bzw. adäquat technologisch (vor)zubehandeln.

Forschungsergebnis:

An Forschungsstelle 1 wurden Rohmilchproben von Einzelhöfen und Molkereistapeltanks sowie Milchhalbfabrikatproben aus vier

unterschiedlichen Produktgruppen auf die Zusammensetzung ihrer Mikrobiota untersucht. Insgesamt wurden 4.812 Isolate identifiziert und auf 1.345 repräsentative Vertreter reduziert. Diese wurden mit Agardiffusionsassays auf ihr Potential zur Bildung von Peptidasen und Lipasen gescreent. Die am stärksten vertretene Gattung in Rohmilch war *Pseudomonas*, gefolgt von *Lactococcus* und *Acinetobacter*; gemeinsam stellen sie etwa 63 % aller Isolate. In den Halbfabrikaten war die häufigste Gattung ebenfalls *Pseudomonas*, gefolgt von *Microbacterium* und *Acinetobacter*; diese drei stellen gemeinsam 49 % aller Isolate. Die Analyse auf Enzymbildung ergab für bestimmte Organismengruppen oder Gattungen klare Tendenzen in der Art der enzymatischen Aktivität. *Pseudomonas* betreibt überwiegend Lipolyse und Proteolyse in Kombination und weist im Vergleich zu den meisten anderen Organismen eine der stärksten Aktivitäten auf; die Gattung *Acinetobacter* ist fast ausschließlich lipolytisch aktiv, wohingegen die Milchsäurebakterien in der Regel überwiegend rein proteolytisch sind. Die Hitzeresistenz der Peptidasen einzelner Organismen wurde von den Forschungsstellen 2 und 3 weitergehend charakterisiert und einige Stämme wurden von Forschungsstelle 2 in den Modellproduktionen eingesetzt. Im Zuge der Arbeiten konnten viele Isolate vor allem aus der Gattung *Pseudomonas* keiner bislang bekannten Art zugeordnet werden. Vier besonders interessante und häufige Arten wurden daher charakterisiert und beschrieben und werden als neue Spezies in die Systematik eingegliedert.

An Forschungsstelle 2 wurde ein Set von Analysemethoden zur Untersuchung von Produktveränderungen durch Enzyme aufgebaut und weiterentwickelt. Mittels Modellproduktionen im Technikumsmaßstab mit enzymatisch belasteter Milch oder Halbfabrikaten wurden enzymatisch induzierte Schadensbilder erzeugt und physikalisch, chemisch sowie sensorisch evaluiert. Daraus abgeleitet wurden Tabellen, in denen Produktveränderungen in ESL- und UHT-Milch, Joghurt und Käse, die durch eine erhöhte Belastung durch Lipasen und Peptidasen induziert werden können, qualitativ zusammengestellt. Unternehmen können anhand der Zusammenstellung Ursachenforschung bei auftretenden Problemen betreiben und Gegenmaßnahmen einleiten. Ergänzend wurden die thermische

Inaktivierung mikrobieller Peptidasen und Lipasen untersucht und kinetische Daten bestimmt. Diese können genutzt werden, um technologische Prozesse für lange haltbare Milchprodukte zu optimieren.

An Forschungsstelle 3 wurde eine Methode zur Probenaufarbeitung entwickelt, um Enzyme (Peptidasen bzw. Lipasen) aus Rohmilch und Halbfabrikaten zu gewinnen. Es zeigten sich Wiederfindungsraten von 64 % - 68 % für Peptidasen und 55 % - 90 % für Lipasen.

In weiteren Arbeiten wurden ca. 1.000 durch Forschungsstelle 1 isolierte Stämme aus Rohmilchproben auf Peptidase- bzw. Lipase-sekretion untersucht. Abhängig von den Kultivierungsbedingungen (Milchmedium, 30°C, 2 Tage) zeigten 12 % und 18 % der Stämme extrazelluläre Peptidase- bzw. Lipaseaktivität. Bei einer Kultivierung von 10 Tagen bei 6°C wiesen 34 % bzw. 26 % der Stämme Peptidase- bzw. Lipaseaktivität auf. Durch weitere Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Enzyme, die bei 6°C gebildet wurden, eine höhere Hitze-stabilität aufweisen. Die Messung von Enzymaktivitäten wurde mit verschiedenen direkten Assaymethoden und Assays nach Probenaufarbeitung durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass nach erfolgter Probenaufarbeitung, Peptidase- bzw. Lipaseaktivitäten von 0,49 pkat/mL Milch bzw. 0,1 pkat/mL Milch quantifiziert werden können. Eine Beurteilung der Hitzestabilität von durch Milchkontaminanten gebildeten Peptidasen wurde mit gereinigten Peptidasen durchgeführt. Die Inaktivierungskinetiken wurden in Magermilch sowie synthetischem Milchultrafiltrat ohne Lactose bestimmt. Die ermittelten Halbwertszeiten bei den Inkubationstemperaturen 70°C und 90°C lagen in Magermilch höher (18- und 8-fach) als im synthetischen Milchultrafiltrat.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Produkte der deutschen Milchindustrie (ca. 160 Betriebe) zeichnen sich durch ein hohes Qualitätsniveau aus und tragen zur Wettbewerbsfähigkeit der deutschen Produzenten bei. Auf der Basis der im Projekt erarbeiteten Ergebnisse zum Einfluss mikrobieller Enzyme auf Rohmilch und Konzentrate können Empfehlungen zur Minimierung des Risikos von Qualitätsdefiziten zum Ende der Mindesthaltbarkeitszeit gemacht werden. Die

wirtschaftlichen Vorteile liegen in der Vermeidung von Schadensfällen, z.B. durch die Auswahl von Basiskomponenten, wie Rohmilch bzw. Milchkonzentrate für bestimmte Milchprodukte, eine an den enzymatischen Status angepasste technologische Behandlung von zugekauften Halbfabriken oder deren Zurückweisung bei der Eingangskontrolle aufgrund zu hoher enzymatischer Belastung. Gerade bei kleinen und mittelständischen Unternehmen können Qualitätsmängel in Bezug auf rufschädigende Rückrufaktionen oder Schadensersatzforderungen eine wirtschaftliche Tragweite haben, die existenzgefährdende Formen annehmen kann.

Die Milchindustrie ist eine der leistungsstärksten Branchen innerhalb der deutschen Lebensmittelindustrie (Umsatz ca. 27 Mrd. €, 36.000 Beschäftigte). 2012 verarbeitete sie rund 30,2 Mio. t Rohmilch von 85.000 Milcherzeugerbetrieben.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2014.
2. Gotthardt, S., Ganssaue, J., Stoeckel, M., Atamer, Z. und Hinrichs, J.: Das Plasminsystem der Milch – Teil 1: Eigenschaften, Produktfehler in UHT-Milch. *Molkerei-Ind.* 4, 46-49 (2016).
3. Gotthardt, S., Ganssaue, J., Stoeckel, M., Atamer, Z. und Hinrichs, J.: Das Plasminsystem der Milch – Teil 2: Modellierung der thermischen Inaktivierung. *Molkerei-Ind.* 5, 22-26 (2016).
4. Glück, C., Rentschler, E., Krewinkel, M., Merz, M., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S., Stoeckel, M., Hinrichs, J., Stressler, T. und Fischer, L.: Thermostability of peptidases secreted by microorganisms associated with raw milk. *Int. Dairy J.* 56, 186-197 (2016).
5. Stoeckel, M., Lidolt, M., Achberger, V., Glück, C., Krewinkel, M., Stressler, T., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S., Fischer, L. und Hinrichs, J.: Growth of *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas sp.* in raw milk: Impact of residual heat-stable enzyme activity on stability of UHT milk during shelf-life. *Int. Dairy J.* 59, 20-28 (2016).
6. Stoeckel, M., Lidolt, M., Stressler, T., Fischer, L., Wenning, M. und Hinrichs, J.: Heat stability of endogenous milk plasmin and peptidases from *Pseudomonas*: a

- challenge in the production of UHT milk products. *Int. Dairy J.*, doi:10.1016/j.idairyj.2016.06.009 (2016).
7. von Neubeck, M., Huptas, C., Glück, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J., Scherer, S. und Wenning, M.: *Pseudomonas helleri* sp. nov. and *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov., isolated from raw cow's milk. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1163-1173 (2016).
 8. Baur, C., Krewinkel, M., Kutzli, I., Kranz, B., von Neubeck, M., Huptas, C., Wenning, M., Scherer, S., Stoeckel, M., Hinrichs, J., Stressler, T. und Fischer, L.: Isolation and characterisation of a heat-resistant peptidase from *Pseudomonas panacis* withstanding general UHT processes. *Int. Dairy J.* 49, 46-55 (2015).
 9. von Neubeck M., Baur C., Krewinkel M., Stoeckel M., Kranz B., Stressler T., Fischer L., Hinrichs J., Scherer S. und Wenning M.: Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *Int. J. Food Microbiol.* 211, 57-65 (2015).
 10. Baur, C., Krewinkel, M., Kranz, B., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S., Stoeckel, M., Hinrichs, J., Stressler, T. und Fischer, L.: Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* 49, 23-29 (2015).
 11. Krewinkel, M., Baur, C., Kranz, B., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S., Stoeckel, M., Hinrichs, J., und Fischer, L.: A Sensitive and Robust Method for Direct Determination of Lipolytic Activity in Natural Milk Environment. *Food Anal. Meth.* 646-655 (2015).
 12. Stoeckel, M., von Neubeck, M., Baur, C., Krewinkel, M., Lidolt, M., Atamer, Z., Kranz, B., Stressler, T., Wenning, M., Fischer, L., Scherer, S. und Hinrichs, J.: Hitzestabile mikrobielle Enzyme in Rohstoffen zur Milchverarbeitung. *DMW* 23, 822-823 (2014).
 13. von Neubeck, M., Scherer, S. und Wenning, M.: Lipolytische und proteolytische Aktivität der Mikrobiota von Rohmilch und Milchhalbfabrikaten. *Jahresb. Milchwiss. Forsch. ZIEL*, ISBN 978-3939182634, 41-43 (2013).

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
Zentralinstitut für Ernährung und
Lebensmittelforschung (ZIEL)
Abt. Mikrobiologie
Weihenstephaner Berg 3, 85345 Freising
Tel.: +49 8161 71-3516
Fax: +49 8161 71-4512
E-Mail: siegfried.scherer@wzw.tum.de

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

Universität Hohenheim
Institut für Lebensmittelwissenschaft und
Biotechnologie
FG Biotechnologie
Garbenstraße 25, 70599 Stuttgart
Tel.: +49 711 459-22311
Fax: +49 711 459-24267
E-Mail: lfischer@uni-hohenheim.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

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

gefördert durch/via:

