

## Hochdruckinaktivierung von Mikroorganismen in fetthaltigen Lebensmitteln

|                          |  |
|--------------------------|--|
| <b>Koordinierung:</b>    | Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn   |
| <b>Forschungsstelle:</b> | Technische Universität München<br>Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW<br>Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie<br>Prof. Dr. Rudi F. Vogel/Christian Lenz                       |
| <b>Industriegruppe:</b>  | Bundesverband der Deutschen Fleischwarenindustrie e.V. (BVDF), Bonn<br><br>Projektkoordinator: Dr. Tobias Richter<br>Multivac Sepp Haggenmüller GmbH & Co. KG,<br>Wolfertschwenden |
| <b>Laufzeit:</b>         | 2013 – 2016  |
| <b>Zuwendungssumme:</b>  | € 249.950,--<br>(Förderung durch BMWi via AiF/FEI)   |

### Ausgangssituation:

Die Anwendung von hydrostatischem Hochdruck ermöglicht eine Reduktion des mikrobiologischen Risikos bei Lebensmitteln bei gleichzeitigem Erhalt wertgebender Inhaltsstoffe, wie Farben, Aromen und Vitamine. Der Druck wirkt direkt und instantan als physikalische Größe, aber auch indirekt über die adiabatische Erwärmung. Die Wirkung von Hochdruck (HD) wird insbesondere über strukturelle Veränderungen an Makromolekülen, wie Proteinen, Lipiden oder Polysacchariden, vermittelt. Da die Inaktivierungskinetiken von vegetativen Mikroorganismen und bakteriellen Endosporen jedoch nicht immer linear verlaufen, können Subpopulationen die Hochdruckbehandlung überleben. Deren Wachstum bzw. Auskeimung und damit Verderb und ggf. eine Toxinbildung können durch weitere Hürden in der Prozessgestaltung (hohe Temperatur) oder Lagerung (Kälte, niedriger pH- oder  $a_w$ -Wert, bestimmte Lebensmittelinhaltsstoffe) verhindert werden. Die Inaktivierung von Mikroorganismen kann durch deren Einbettung in eine Lebensmittelmatrix bzw. die Anwesenheit von Makromolekülen, wie Nahrungsfetten, oder auch osmotisch aktiver Moleküle (Saccharose, NaCl) stark beeinträchtigt werden.

Während es zahlreiche Untersuchungen zur HD-Inaktivierung vegetativer Mikroorganismen und

bakterieller Endosporen in wässrigen Umgebungen (vor allem in Modellsuspensionen) gibt, existieren bislang nur spärliche Daten zu ölhaltigen Lebensmitteln oder Emulsionen. Zu diesen gehören jedoch viele, hinsichtlich Sensorik, Verbraucherefreundlichkeit und Wertschöpfung interessante Produkte mit eingeschränkter Haltbarkeit, wie Fleischwaren, Mayonnaisen, Salat- und Cocktailsaucen oder Convenience-Produkte. Systematische Untersuchungen zur Auswirkung von Hochdruck auf die Inaktivierung vegetativer Bakterien und Endosporen in ölhaltigen Lebensmitteln und Emulsionen fehlten bislang.

Ziel des Forschungsvorhabens war es daher, den Einfluss des Fettgehalts von Lebensmitteln auf die Hochdruckinaktivierung von Mikroorganismen zu ermitteln. Als Modellsystem dienten Öl-in-Wasser (O/W)-Emulsionen, in denen der Fettgehalt, die Öl-Wasser-Grenzfläche und die Emulgator- und Ölart systematisch variiert werden konnten. Aufgrund der vorrangigen wirtschaftlichen Bedeutung standen hierbei Milchsäurebakterien im Fokus, die auch im Kalten und bei niedrigem pH-Wert wachsen und damit Lebensmittelverderb begründen können. Als Voraussetzung für eine effektive Implementierung der Hochdruckbehandlung in den Prozessablauf und für eine Abschätzung einer möglichen Toleranzentstehung sollte der Beitrag einer molekularen Anpassung von Mikroorganismen an die Umge-

bungsbedingungen einem Schutzeffekt durch Lipide oder die Anlagerung an Grenzflächen gegenübergestellt werden. Des Weiteren sollte gezeigt werden, in welchem Maße sich Zusammenhänge, die für vegetative Zellen gefunden wurden, auf Sporen übertragen lassen.

#### Forschungsergebnis:

Die Hochdruckinaktivierungsstudien wurden mit zwei Stämmen der Spezies *Lactobacillus (L.) plantarum* mit experimentell einem ermittelten, hohen Verderbspotential und einem unterschiedlichen Adhäsionsverhalten an lipophile Oberflächen durchgeführt. Mit Hilfe von etablierten (O/W)-Emulsionen wurde der Einfluss des stabilisierenden Emulgators, der Ölart sowie des Fettgehalts und der Fettoberfläche auf die Hochdruckinaktivierung (300/400 MPa, 25/40 °C, 5 min) der Bakterien untersucht. Hierbei wurde kein signifikanter Einfluss des Emulgatorstyps (Natriumcaseinat, Tween® 80) in verschiedenen Konzentrationen oder der Fettoberfläche (1,3; 3,4; 10,3 m<sup>2</sup>/g) beobachtet. Für das aus kurzkettigen, gesättigten Fettsäuren bestehende Miglyol 812 wurde eine vergleichbare und für Rapsöl (hauptsächlich langkettige, ungesättigten Fettsäuren) eine tendenziell geringfügig erhöhte Inaktivierung im Vergleich zu reinem Puffer beobachtet. Eine Erhöhung des Fettgehalts (30 %, 50 %, 70 % Rapsöl) bei konstanter Oberfläche führte sowohl in emulgatorstabilisierten als auch -freien Emulsionen zu einer geringfügig erhöhten HD-Inaktivierung. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit von Fett per se nicht für eine verringerte Effizienz der HD-Inaktivierung in emulsionsbasierten Lebensmitteln verantwortlich ist. Neben der Lipidphase wurde der Einfluss verschiedener Parameter der wässrigen Phase auf die HD-Inaktivierung untersucht. Erhöhte NaCl-Konzentrationen ab 12,5 % (w/v) und Saccharosekonzentrationen ab 25 % (w/v) bezogen auf die wässrige Phase führten zu einer signifikanten Verringerung der HD-Inaktivierungseffizienz. Das wasserlösliche Molkenprotein hatte in Konzentrationen bis 10 % (w/v) keinen Einfluss auf die HD-Inaktivierung, während 2,5 % Casein (wasserunlöslich) zu einer verstärkten Inaktivierung führten und 2,5 % Pepton die Abtötungseffizienz verminderten. Eine Verringerung des pH-Werts von pH 7 bis auf pH 3 ging mit einer Verstärkung der HD-Inaktivierung einher. Die Anwesenheit von Fett führte generell zu einer leicht erhöhten Inaktivierung, wobei die Wirkung des jeweiligen Parameters der wässrigen Phase in keinem der Fälle durch

Fett verändert wurde. Zur Untersuchung des Effekts von Fett auf die HD-Inaktivierbarkeit bakterieller Endosporen wurden zwei *Clostridium (C.) botulinum*-Stämme in O/W-Emulsionen mit 30, 50 und 70 % Fett hochdruckbehandelt. Der hydrophobere Stamm war geringfügig resistenter gegen die angewandten Hochdruckbehandlungen (600-750 MPa bei 60-75 °C) und zeigte eine erhöhte HD-Resistenz mit zunehmendem Fettgehalt. Dieser Effekt ist beim hydrophileren Stamm weniger stark ausgeprägt. Dies legt nahe, dass sich die für vegetative Zellen erlangten Erkenntnisse nicht ohne Weiteres auf Sporen übertragen lassen.

Zur Untersuchung einer möglichen Reaktion der Bakterien auf den Kontakt zu Fett und einer damit einhergehenden Veränderung der HD-Sensitivität wurden die Stämme für verschiedene Zeiträume in O/W-Emulsionen inkubiert oder in Anwesenheit von Öl oder einzelner Fettsäuren kultiviert und anschließend HD-behandelt. Eine der HD-Behandlung vorgelagerte fünfstündige Inkubation in O/W-Emulsion führte generell zu einer erhöhten HD-Sensitivität. Die Anwesenheit von 5 % Saccharose bzw. 5 % NaCl in der wässrigen Phase milderte den Effekt der Vorinkubation stark ab. Zur Untersuchung des Effekts von Fett auf metabolisch aktive Zellen wurden die Stämme vor der HD-Behandlung in Anwesenheit von Rapsöl, freien Fettsäuren und unterschiedlichen Tween®-Arten, deren Fettsäuren für Bakterien leichter verwertbar sind, kultiviert. Rapsöl führte beim hydrophilen Stamm zu einer erhöhten HD-Resistenz, während der hydrophobe Stamm keine Reaktion zeigte. Tween® 80 (Ölsäure) und Tween® 20 (Laurinsäure) führten bei beiden Stämmen zu einer erhöhten HD-Resistenz wobei der Effekt beim hydrophilen Stamm stärker war. Tween® 40 (Palmitinsäure) und Tween® 60 (Stearinsäure) hatten keinen Einfluss. Die Analyse der zellulären Fettsäurekomposition zeigte, dass die erhöhte HD-Resistenz nach Kultivierung mit Tween® 20 und Tween® 80 mit einer bestimmten Membranzusammensetzung der Zellen korrelierte. HD-Experimente nach Kultivierung mit freier Ölsäure bestätigten deren protektive Wirkung. Außerdem wurde untersucht, ob Bakterien durch eine verlängerte Inkubation in O/W-Emulsion bzw. in Tween® 80-haltigem wässrigem Puffer erhöhte HD-Resistenz erwerben können und ob Zellen eine zuvor durch Kultivierung mit Tween® 80 erworbene HD-Resistenz nach einer bestimmten Zeit wieder verlieren. Außerdem wurde der Einfluss der Lagerungstemperatur untersucht. Die Stämme wurden dafür in Medium mit oder ohne Tween®

80 kultiviert und anschließend in Puffer mit verschiedenen Tween® 80-Konzentrationen oder in O/W-Emulsion bei 4 °C bzw. 25 °C inkubiert und nach 0, 24 oder 48 h HD-behandelt. Tendenziell führte die Anwesenheit von Tween® 80 bei der HD-Behandlung zu einer geringfügig schwächeren Inaktivierung im Vergleich zur Kontrolle ohne Tween® 80, während in O/W-Emulsion eine vergleichsweise starke Inaktivierung zu beobachten war. Die auf Tween® 80 beruhende, bei der Kultivierung erworbene HD-Resistenz ging durch eine längere Inkubation in nährstofffreier Pufferlösung nicht verloren. Allerdings konnte in dieser Umgebung auch keine HD-Resistenz neu erworben werden und die HD-Sensitivität stieg mit der Dauer der Inkubation in nährstofffreiem Milieu an. Die Zunahme der Inaktivierung war nach Lagerung bei 4 °C schwächer als bei 25 °C.

**Wirtschaftliche Bedeutung:**

Die Ergebnisse belegen, dass in O/W-Emulsionen während einer HD-Behandlung kein protektiver Effekt von Fett auf die Zelle ausgeht. Im Gegenteil, war das Öfteren die Tendenz zu beobachten, dass die Anwesenheit von Fett bzw. ein erhöhter Fettgehalt zu einer verstärkten Inaktivierung führt. Der Fettgehalt an sich ist also nicht für eine verringerte Effizienz der Hochdruckinaktivierung in Lebensmittelmatrices im Vergleich zu wässrigen Modellsystemen verantwortlich. Auch die Wirkung anderer Lebensmittelkomponenten, wie Salz, Zucker oder Proteinen, wird nicht durch den Fettgehalt beeinflusst. Folglich ist, in Hinblick auf die Inaktivierung von verderbsbegründenden Laktobazillen, prinzipiell nicht von einem Einsatz der Hochdrucktechnologie bei der Konservierung von Lebensmitteln, inkl. Emulsionen, mit einem erhöhten Fettgehalt abzuraten. Vorsicht ist dagegen hinsichtlich einer Vorkonditionierung der zu inaktivierenden Mikroorganismen durch Fett geboten. Um eine Resistenzentwicklung durch Aufnahme von Substanzen, wie Fettsäuren, aus dem Fett zu verhindern, sollte eine Hochdruckbehandlung rasch nach Zubereitung des Produktes erfolgen.

Die Ergebnisse geben Unternehmen der Fleischwarenindustrie und Herstellern von Feinkosterezeugnissen, Suppen, Fertiggerichten, Desserts und anderen Produkten eine wissenschaftliche Grundlage für den Einsatz der Hochdrucktechnologie bei fetthaltigen Lebensmitteln. Sie können den industriellen Anwendern und Behörden als Basis dienen, um hieraus die für eine Zulassung erforderlichen Tests abzuleiten und damit die Markteinführung neuer hochdruckbehandelter Lebensmittelgruppen mit hoher Wertschöpfung zu ermöglichen.

Der Einsatz der Hochdrucktechnologie eröffnet Möglichkeiten zur Verbesserung der Sicherheit und Qualität fetthaltiger Lebensmittelprodukte, zur Erhöhung der Absatzchancen sowie zur Gestaltung innovativer Produktkonzepte. Durch die proaktive Entwicklung dieser Technologie können Unternehmen stringenter Hygienevorgaben erfüllen, ohne Abstriche bei der Produktqualität in Kauf nehmen zu müssen. Durch eine Verlängerung der Haltbarkeit können eine höhere Planungssicherheit der Produktion erreicht und neue Absatzmärkte erschlossen werden.

**Publikationen (Auswahl):**

- 1. FEI-Schlussbericht 2016

**Weiteres Informationsmaterial:**

Technische Universität München  
 Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW  
 Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie  
 Gregor-Mendel-Str. 4, 85354 Freising  
 Tel.: +49 8161 71-3663  
 Fax: +49 8161 71-3327  
 E-Mail: Rudi.Vogel@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

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

gefördert durch/via



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.