

Einflussfaktoren auf die Inaktivierung von Mikroorganismen auf Packstoffoberflächen mittels gasförmigem H₂O₂

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle:	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung Abt. Technologie, Freising-Weihenstephan Prof. Dr. Ulrich Kulozik/Elisabeth Eschbeck
Industriegruppen:	VDMA - Fachverband Nahrungsmittel- und Verpackungsmaschinen e.V., Frankfurt a.M. Vereinigung zur Förderung der Milchwissenschaftlichen Forschung an der Technischen Universität München e.V., Freising
	Projektkoordinator: Dr. Patrick Engelhard Krones AG, Neutraubling
Laufzeit:	2013 – 2015
Zuwendungssumme:	€ 249.150,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Gasförmiges H₂O₂ ist ein vielseitig einsetzbares Oberflächenentkeimungsmittel, welches beispielsweise zur Desinfektion von Isolatoren, Räumen und Abfüllmaschinen verwendet wird. In zunehmendem Maße werden auch Lebensmittel- und Getränkeverpackungen mit gasförmigem H₂O₂ entkeimt. Dennoch sind chemische Packstoffentkeimungsmethoden allgemein in der Diskussion, da gegenwärtig über eine Absenkung der MAK-Werte im regulatorischen Umfeld von Abfüllmaschinen europaweit nachgedacht wird. Dies erscheint nach heutigem Stand nicht leistbar ohne Einschränkung der Effektivität der Verfahren. Ein Ersatz für chemische Entkeimungsmethoden ist derzeit nicht sichtbar.

Das Entkeimungsgas ist eine Mischung aus H₂O₂-Gas, Wasserdampf und Luft als Trägergas und wird auch als H₂O₂-Dampf bezeichnet. Der Oberflächenentkeimungsprozess wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst, welche die Behandlungsbedingungen, aber auch die Eigenschaften der abzutötenden Mikroorganismen und der behandelten Oberfläche betreffen. Nicht alle Einflussfaktoren wurden bisher ausreichend untersucht, so dass lediglich Vermutungen bzw. kontroverse Meinungen über ihre Wirkung existieren. Die Folge ist, dass nach einem Oberflä-

chenentkeimungsprozess mit H₂O₂-Dampf eine unerwartete Restkontamination verbleiben kann, die aufgrund altbekannter Prozesseinflussfaktoren, wie der Gastemperatur oder der H₂O₂-Konzentration, nicht vorhersehbar oder erklärbar ist. Durch die Rekontamination des Füllguts kann dabei ein enormer wirtschaftlicher Schaden entstehen.

Einer der kontrovers diskutierten Einflussfaktoren auf die mikrobizide Wirkung des H₂O₂-Dampfes ist die Bildung eines aus H₂O₂ und Wasser bestehenden Kondensats auf der zu entkeimenden Oberfläche. Dieses Kondensat kann gewollt oder ungewollt während des Entkeimungsprozesses auftreten, sobald die Oberflächentemperatur die Taupunkttemperatur des Entkeimungsgases unterschreitet. Die Wirkung des Kondensats wurde sowohl als abtötungsunterstützend als auch als abtötungshemmend beschrieben und muss aufgrund dieses Widerspruchs im direkten Vergleich untersucht werden. Die Kondensatbildung wird von einer Vielzahl von Faktoren, wie der Benetzbarkeit der betroffenen Oberfläche und der H₂O₂- und Wasserkonzentration des Entkeimungsgases, beeinflusst.

Der Einfluss der Benetzbarkeit der abzutötenden Mikroorganismen auf die mikrobizide Wirkung

des H₂O₂-Dampfes wird vermutet und wurde von der Forschungsstelle für eine kleine Auswahl nahe verwandter *Bacillus*-Sporen bereits gezeigt. Die Untersuchung legte nahe, dass hydrophobe, schlecht benetzbare Bakteriensporen mit kondensierendem H₂O₂-Dampf langsamer abgetötet werden als hydrophilere, leichter benetzbare Sporen, während bei einer reinen Gasphasensterilisation kein Einfluss zu erkennen war. Systematische Untersuchungen über die Auswirkung der Benetzbarkeit anderer bakterieller Sporenbildner fehlen aber bisher.

Ziel des Forschungsvorhabens war es deshalb, das Verständnis der Einflussfaktoren, die das Inaktivierungsergebnis eines Oberflächenentkeimungsprozesses mit H₂O₂-Dampf bestimmen, zu vertiefen, um auf diese Weise eine unzureichende oder mitunter variable Keimreduktion zu vermeiden. Zu diesem Zweck wurden Einflussfaktoren, die bisher noch nicht systematisch wissenschaftlich untersucht worden sind oder deren Wirkung kontrovers diskutiert wird, betrachtet. Dabei wurde im Speziellen auf die Auswirkung der Kondensatbildung aus dem Entkeimungsgas im Vergleich zu einer reinen Gasbehandlung eingegangen. Es sollten Daten erzielt werden, die der Industrie ermöglichen, besser zu analysieren, warum in einem individuellen Anwendungsfall eine unzureichende Keimreduktion auftritt und wie durch eine Anpassung oder engere Spezifizierung der Prozess- und Materialparameter die Prozesssicherheit und die erzielbare Entkeimungsleistung erhöht werden kann.

Forschungsergebnis:

Besonderes Augenmerk wurde im Rahmen des Projekts der Oberflächenhydrophobizität beigemessen. Um den Einfluss der Hydrophobizität untersuchen zu können, ohne den Einfluss anderer Schutzmechanismen zu sehen, wurden *Bacillus-subtilis*-Sporen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen erzeugt. Diese bakteriellen Sporen wurden hinsichtlich ihrer Hydrophobizität, ihrer Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid und ihrer Katalaseaktivität charakterisiert. Keine der getesteten Sporensuspensionen verfügte über die Fähigkeit, H₂O₂ über einen Zeitraum von 15 min abzubauen. Die Bandbreite der erzeugten Hydrophobizitätsbibliothek erstreckt sich von 41 ° bis 95 ° Wasserkontaktwinkel.

Bei vergleichender Betrachtung der Inaktivierungsversuche mit kondensierendem H₂O₂ konnte kein Schutzeffekt durch die hydrophobe Oberfläche festgestellt werden, weder bei Auftra-

gung der hydrophoben Kultur allein noch bei Auftragung als Mischkultur zusammen mit einem hydrophileren Keim. Hierfür wurde *Bacillus atrophaeus* verwendet, um die Testorganismen nachfolgend unterscheiden zu können. Demzufolge sind teils auftretende, unerklärliche Variabilitäten nicht auf die Oberflächenhydrophobizität der vorliegenden Keimflora zurückzuführen.

Die Beschaffenheit der Oberfläche hat hingegen einen großen Einfluss auf die Entkeimungsleistung. Glatte, hydrophile sowie raue Oberflächen bewirken eine langsame Inaktivierung. Mikroorganismen sind hier einerseits durch die flächige Kondensatbildung (hydrophile Oberflächen) und andererseits auch durch die Vertiefungen, in die das Kondensat nur schwer gelangen kann (raue Oberflächen), geschützt. Die beste Entkeimungswirkung konnte mit handelsüblichem PE-beschichtetem Kartonverbundmaterial erzielt werden. Bei der Auswahl eines passenden Verpackungsmaterials ist eine eingehende Betrachtung der Oberfläche unter dem Aspekt der Entkeimung unabdingbar.

Ein Vergleich der Inaktivierung mit rein gasförmigem und kondensierendem H₂O₂ hat gezeigt, dass bei Verwendung des reinen Gases die Inaktivierungsrate kontinuierlich ansteigt. Bei Behandlung mit Kondensatbildung findet ab einer gewissen Menge H₂O₂ im Gas (5.200 ppm) keine weitere Verbesserung mehr statt. Je nach Konzentration im Entkeimungsgas herrschen unterschiedliche Taupunkttemperaturen, bei deren Überschreitung es zur Aufkonzentrierung kommen kann. Eine weitere Erhöhung der verdampften Menge an H₂O₂ führt folglich bei Kondensatbildung zu keiner Verbesserung des Entkeimungseffektes. Diese Tatsache ist auch abhängig von der Wasserdampfkonzentration im Entkeimungsgas, hierfür muss die Ausgangskonzentration des verdampften H₂O₂ berücksichtigt werden.

Um den Effekt der Aufkonzentrierung im Anschluss zu untersuchen, wurden Challengetest durchgeföhrt. Dabei zeigte sich, dass innerhalb der ersten 20 Sekunden, in denen der Packstoff die Anlage verlässt, eine Inaktivierungswirkung auftritt. Nach dieser Zeit ist das an der Oberfläche vorliegende Kondensat jedoch verdunstet, die Anzahl lebensfähiger Testkeime bleibt konstant. Entsprechend kann nach einer sterilen „Trocknungszeit“ bei einer Inaktivierung mit Kondensatbildung das Produkt in die Verpackung gefüllt werden.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Der Abfüll- und Verpackungsprozess leistet bei den meisten industriell hergestellten Lebensmitteln einen entscheidenden Beitrag zur Sicherheit und Qualität der Produkte, so dass er in nahezu jedem Lebensmittelunternehmen ein entscheidender Schritt des Herstellungsprozesses ist. Firmen aus der Lebensmittel- und Getränkeindustrie können durch Anwendung der Entkeimungstechnik mit H₂O₂-Dampf Ausschuss durch einen frühzeitigen Verderb aufgrund von Rekontaminationen durch die Verpackung vermindern. Auf diese Weise können die Kosten für Fehlproduktionen reduziert und der wirtschaftliche Schaden durch einen Imageverlust bei den Verbrauchern aufgrund einer inkonsistenten Produktqualität vermieden werden. Gleichzeitig können steigende Anforderungen des Handels bezüglich der Produkthaltbarkeit erfüllt werden.

Das potentielle Marktvolumen für mit H₂O₂-Dampf entkeimte Verpackungen ist groß; dies gilt speziell für die Getränke- und Milchindustrie aufgrund ihrer mikrobiologisch sensiblen Produkte und der angestrebten langen Haltbarkeit. Traditionell ist H₂O₂ in der milchverarbeitenden Industrie ein etabliertes Entkeimungsmittel für Kartonverbundverpackungen für Milch- und Milchlischprodukte. 2010 wurden 5.276 Mio kg Konsummilch abgesetzt, davon wurden etwa 96 % in Kartonverbundverpackungen abgefüllt. Aufgrund des vergleichsweise niedrigen Chemikalienverbrauchs und der reduzierten Rückstandsproblematik könnte sich in diesem Bereich die Entkeimung mit gasförmigem H₂O₂ gegen das Verfahren mit einem H₂O₂-Tauchbad durchsetzen. Die Abfüllung von Getränken in Kunststoffflaschen ist ein großes und stetig wachsendes Marktsegment. 2009 wurden 14.733 Mio. Liter Getränke in Einwegkunststoffflaschen und 4.769 Mio. Liter in Mehrwegkunststoffflaschen abgefüllt.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI Schlussbericht 2016.
2. Eschlbeck, E. und Kulozik, U.: Erhöhung der Wasserstoffperoxidkonzentration im Entkeimungsgas bewirkt bei Kondensatbildung keine verbesserte Inaktivierung bakterieller Sporen. Jahresbericht Milchwiss. Forsch. ZIEL, ISBN 978-3-939182-75-7, 72-74 (2015).
3. Eschlbeck, E. und Kulozik, U.: Beeinflussung der Oberflächenhydrophobizität von bakteriellen Sporen durch verschiedene Anzuchtbedingungen. Jahresbericht Milchwiss. Forsch. ZIEL, ISBN 978-3-939182-63-4, 88-90 (2014).
4. Eschlbeck, E. und Kulozik, U.: Einfluss des Fermentations-pH-Wertes auf die Resistenz von Bacillus subtilis Sporen gegenüber flüssigem Wasserstoffperoxid. Jahresbericht Milchwiss. Forsch. ZIEL (im Druck) (2016).

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
Zentralinstitut für Ernährungs- und
Lebensmittelforschung
Abt. Technologie
Weihenstephaner Berg 1
85350 Freising-Weihenstephan
Tel.: +49 8161 71-4205
Fax: +49 8161 71-4384
E-Mail: ulrich.kulozik@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

