

Thermophile Sporenbildner in Milch- und Molkepulvern - Quantifizierungsmethode und technologische Strategien zur Reduktion

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle(n):	<p>Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Milchwissenschaft und -technologie Prof. Dr. Dr. Jörg Hinrichs</p> <p>Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL) Abt. Mikrobiologie Prof. Dr. Siegfried Scherer/Dr. Mareike Wenning</p>
Industriegruppe(n):	<p>Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin</p> <p>Projektkoordinator: Dr. Werner Strohmaier Alpavit Käserei Champignon Hofmeister GmbH & Co. KG, Lauben/Allgäu</p>
Laufzeit:	2014 - 2017
Zuwendungssumme:	€ 467.650,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Der Export von Magermilchpulver aus der EU ist seit 2009 von 227.000 t auf einen neuen Rekordwert von 779.000 t in 2017 gestiegen. Zuwächse gab es aufgrund steigender Nachfrage im asiatischen Raum auch für andere Milch- und Molkeprodukte. So importierte China im Jahr 2017 247.300 t Magermilch- und 527.000 t Molkepulver, die z. B. in Infantformula eingesetzt werden, aber auch rekonstituiert in bzw. zu Milchprodukten verarbeitet werden. Milchprodukte aus Deutschland genießen im Ausland ein hohes Ansehen und haben einen hohen Marktanteil.

Pulverförmige Milch- und Molke Derivate sind technisch aufwändige und hochwertige Produkte, die u. a. mittels Membran- und Eindampfungsverfahren hergestellt werden. Bei diesen Produkten ist der Gehalt thermophiler Sporenbildner ein Kriterium für das Zurückweisen von Ware. So wird mittlerweile für den chinesischen Markt die Einhaltung eines Maximalgehalts von 1.000 Sporen gefordert.

Milchpulverproduzenten haben Schwierigkeiten, die von den Käufern geforderten Grenzwerte durchgehend einzuhalten, obwohl in den Unternehmen bereits die Bactofugation und die Mikrofiltration eingesetzt werden, um Sporenbildner vor dem Konzentrieren zu reduzieren. Auch eine thermische Behandlung der Konzentrate bei maximal 85 °C, die direkt vor der Trocknung durchgeführt wird, kann zwar die Anzahl vegetativer Zellen reduzieren, nicht aber die der enthaltenen Sporen. Problematisch ist zudem, dass eingetragene thermophile Sporenbildner in Pulverherstellungslinien anwachsen können und ggf. sporulieren. Es fehlt bisher an einer systematischen Ursachenforschung, insbesondere bezüglich der Sporulation, um Prozesse besser gestalten zu können. So ist z. B. unklar, an welchen Stellen und mit welcher Rate sich thermophile Sporenbildner im Prozess vermehren, und warum sie unter an sich guten Wachstumsbedingungen sporulieren.

Der Fokus des Forschungsvorhabens lag daher auf der Entwicklung einer Quantifizierungsmethode für vegetative thermophile Zellen und Sporen in Zwischen- und Endprodukten der Pulverherstellung, der Lokalisierung von Wachstum und Sporulation im Prozess, der Untersuchung von prozessassoziierten Einflussfaktoren auf Wachstum und Sporulation sowie daraus abgeleitet der Entwicklung geeigneter technologischer Strategien und Maßnahmen zur Minimierung vegetativer thermophiler Zellen und Sporen in der Milch- und Molkepulverproduktion.

Ziel des Projektes war es, die Hersteller von Milch- und Molkepulvern in die Lage zu versetzen, die extrem gestiegenen Qualitätsanforderungen ihrer Kunden zu erfüllen und Pulver mit Sporengehalten von <1.000 bzw. <300 Sporen pro Gramm Pulver liefern zu können.

Forschungsergebnis:

Im Rahmen des Vorhabens wurde zunächst die Methode zur quantitativen Bestimmung der thermophilen Gesamtkeim- und Sporenzahl optimiert und Untersuchungen zur thermischen Resistenz der vegetativen Zellen durchgeführt. Vegetative Zellen der Spezies *A. flavithermus* waren deutlich hitzesensibler als die der Art *G. stearotherophilus* und 6 von 11 Stämmen überlebten eine Laborpasteurisierung bei 73 °C und 20 s. Bei 80 °C für 10 min werden die vegetativen Zellen sicher abgetötet, thermophile Sporen in realen Prozessproben (Molke, Milch- und Molkenpulver) aber noch nicht reduziert. Daher stellt die Erhitzung bei 80 °C für 10 Minuten (wie für mesophile Sporen) die für eine Quantifizierung thermophiler Sporenbildner optimale Temperatur-Zeit-Kombination dar. Mit dieser Methode lassen sich thermophile Sporen sicher von der thermophilen Gesamtkeimzahl differenzieren, ohne die Sporenzahl zu beeinträchtigen.

Analysen der Keimzahlen und Biodiversität von Rohmilch, Molke, Milch- und Molkenpulver ergaben eine deutliche Verschiebung der Artenflora von der Rohmilch zu Molke und Pulver begleitet von einem drastischen Keimzahlanstieg. Nur ca. ein Viertel der untersuchten Pulver hatte Sporenzahlen <1.000 KbE/g und drei Viertel erfüllten die

Anforderungen des chinesischen Marktes nicht. Die 2 durchgeführten prozessbegleitenden Stufenkontrollen von Magermilchpulver zeigten, dass thermophiles Keimwachstum schon im ersten Prozessschritt, der Separation/Anwärmung ab ca. 6-9 Stunden Standzeit, beginnt und auch hier bereits die Verschiebung der Artzusammensetzung von der charakteristischen Rohmilchflora hin zur Milchpulverflora stattfindet. Für die beprobte Molkenpulverproduktion war der Eintrag thermophiler Sporenbildner über die Molke ursächlich für das thermophile Keimniveau im Pulver. Hier sind entsprechende Käseprozesse zur Molkegewinnung sowie die Vorbereitung der Käseemilch von erheblicher Bedeutung. Für beide Produktkategorien stehen die Vorwärmprozesse inkl. der Rahmseparation sowie die Pasteurisation, wenn erfolgt, im Verdacht, für das frühzeitige Keimwachstum verantwortlich zu sein.

Durch eine Typisierung von *A. flavithermus*-Stämmen konnten die Transmission weniger Stämme innerhalb des Produktionsverlaufs beobachtet und zudem einzelne Stämme über einen längeren Zeitraum von mehreren Monaten wiederkehrend in Proben eines Unternehmens gefunden werden. Es wird vermutet, dass diese in der Anlage persistierenden Stämme durch Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen unzureichend aus der Anlage entfernt wurden und sich möglicherweise an die dort herrschenden Bedingungen angepasst hatten und es dadurch in folgenden Produktionen zu Rekontaminationen kam.

Da Konzentrate bei hohen Temperaturen gelieren, wurde für die Untersuchung der thermischen Stabilität der Endosporen in konzentrierten Produkten zunächst ein innovatives Shear-Heating-Testsystem entwickelt und aufgebaut, welches erlaubt, Konzentrate bei gleichzeitiger Scherung thermisch zu behandeln. Die Scherrate wirkte sich nicht signifikant auf die Reduktion des Sporengehalts aus. Bei einer Trockenmasse von 36 % wurde eine massive Partikelbildung beobachtet, die sich signifikant reduzieren ließ, wenn die Trockenmasse auf 30 oder 27 % erniedrigt wurde. Ein Vergleich der Inaktivierungsraten bei 110° C in Magermilch und Konzentrat (36 %) ergab zwar für die Hälfte der 10 getesteten Stämmen bessere Raten für Magermilch, in Konzentrat wurden hin-

gegen auch zwischen zwei und vier Log-Stufen der Sporen inaktiviert.

Durch die Tatsache, dass thermophile Sporenbildner einen sehr breiten Wachstumsbereich von 37-60 °C für *A. flavithermus* und 45-70 °C für *G. stearothermophilus* haben, und sowohl die vegetative Zelle als auch die Spore eine hohe Hitzeresistenz besitzen, ergeben sich kaum Möglichkeiten der Prozessanpassung in Hinblick auf eine Reduktion der Sporenzahlen nach der Rahmseparation und der Pasteurisierung sowie der Eindampfung. Generell sollte das Stapeln der Halbkonzentrate vermieden werden, da sich dadurch keimarme Produkte aus der ersten Produktionshälfte mit Produkten hoher Keimgehalte aus der zweiten Produktionshälfte mischen. Dies führt zu einem Nivellieren der Sporengehalte. Als technologische Option bietet sich die Mikrofiltration zur Reduktion thermophiler Sporen und Zellen vor der Eindampfung an. Weiterhin ist die thermische Behandlung von Halbkonzentraten eine weitere Möglichkeit, um den Sporengehalt zu reduzieren. Das aktuell größte Potential hingegen bietet die Optimierung der Reinigung und Desinfektion in Hinblick auf die Eliminierung aller Sporen aus dem Vorgängerprozess.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Im Jahr 2016 erwirtschaftete der Milchverarbeitende Sektor in Deutschland mit knapp 37.000 Beschäftigten an über 150 Betriebsstandorten ein Umsatzvolumen von knapp 23 Mrd. €. Von 2015 auf 2016 stieg die Produktion von Magermilchpulver von 415.000 t auf 429.000. Parallel wächst die Nachfrage nach hochqualitativen Milch- und Molkederivaten, die überwiegend unter Einsatz moderner Membrantrenntechnik gewonnen werden.

Mit den im Projekt erarbeiteten Erkenntnissen zum Übergang thermophiler Sporenbildner aus der Rohmilch in Milch- und Molkekonzentrierungsprozesse, wie Membranfiltration und Eindampfung, können technologische Empfehlungen zur Minimierung des Risikos einer hohen Zahl thermophiler Sporenbildner im Endprodukt Pulver gemacht werden. Die entwickelte Methodik zur Differenzierung zwischen vegetativen thermophilen Sporen-

bildnern und deren Sporen kann dazu genutzt werden, die mikrobiologische Qualität von Milchpulvern reproduzierbar zu bestimmen und wird damit zur Verbesserung der Qualitätssicherung in der Pulverproduktion beitragen. Da bislang keine einheitliche und allgemein verbindliche Methode für den Gehalt an thermophilen Sporenbildnern nach VDLUFA oder ISO existiert, werden die Forschungsergebnisse in die Entwicklung einer allgemein anerkannten Methode einfließen. Aus den ermittelten Daten zum Wachstum- und Sporulationsverhalten sowie der Hitzeresistenz thermophiler Sporenbildner kann abgeleitet werden, wie die individuelle Veränderung der Prozessführung gestaltet werden muss, um eine Verminderung des Sporengehalts zu erzielen.

Die wirtschaftlichen Vorteile liegen in der Vermeidung von Schadensfällen bzw. von Reklamationen bei nicht eingehaltenen mikrobiologischen Vorgaben für Pulver. Gerade Kunden in Asien stellen inzwischen höchste Qualitätsanforderungen, die häufig mit modifizierten, länderspezifischen Methoden bestimmt werden. Damit wächst der Druck auf die Hersteller in Europa, diese Anforderungen zu erfüllen und Methoden verfügbar zu machen, die langfristig international akzeptiert werden. Wenn Waren aufgrund nicht erfüllter Spezifikationen zurückgewiesen werden, hat dies beträchtliche wirtschaftliche Konsequenzen, u.a. aufgrund des erheblichen Aufwands für den Warenrücktransport.

Die mikrobiellen Anforderungen an Konzentrate und Pulver, vor allem an die maximale Anzahl an thermophilen Sporenbildnern, wachsen. Produkte mit zu hohen Keimzahlen lassen sich nicht vermarkten, was in diesem sehr werthaltigen und stark wachsenden Marktsegment von großer wirtschaftlicher Bedeutung ist. In jüngster Zeit traten Fälle auf, bei denen vereinzelte, mikrobiell belastete Chargen einzelner Unternehmen zu Einfuhrsperren für ganze Länder geführt haben. Mit Hilfe der im Rahmen dieses Projektes gewonnenen Daten können Filtrations- und Konzentrationsprozesse hinsichtlich der Belastung der Endprodukte mit thermophilen Keimen so optimiert werden, dass die Spezifikationsvorgaben eingehalten werden. Eine verbesserte Ausnutzung der Rohstoffe durch entsprechendes technolo-

gisches Know-how führen zu einer erhöhten Wertschöpfung, schaffen Potenziale für Innovationen und können insbesondere KMU helfen, sich Marktnischen zu erschließen und diese zu erhalten.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2017.
2. Dettling, A., Doll, E., Wedel, C., Hinrichs, J., Scherer, S. & Wenning, M.: Accurate quantification of thermophilic spores in dairy powders. Intern. Dair. J. 98, 64-71 DOI 10.1016/j.idairyj.2019.07.003 (2019).
3. Wedel, C., Wunsch, A., Wenning, M., Dettling, A., Kayser, K.H., Lehner W.D. & Hinrichs J.: Thermal treatment of skim milk concentrates in a novel shear-heating device : Reduction of thermophilic spores and physical properties. Food Res. Intern. 107, 19-26 (2018).
4. Reich, G., Wenning, M., Dettling, A., Etombi, K. E. L., Scherer und Hinrichs, J.: Thermal resistance of vegetative thermophilic spore forming bacilli in skim milk isolated from dairy environments. Food contr. 82, 114-120 (2017).
5. Reich, C., Büthe, B., Sonne, A., Wenning, M. & Hinrichs, J.: Membranfiltration in der Milchverarbeitung – Fouling und mikrobiologische Risiken. DMW – Milchw. 22, 794-799 (2015).

Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hohenheim
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie
FG Milchwissenschaft und -technologie
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 Lebensmittelforschung (ZIEL)
Abt. Mikrobiologie
Weihenstephaner Berg 3, 85354 Freising
Tel.: +49 8161 71-3516
Fax: +49 8161 71-4512
E-Mail: siegfried.scherer@wzw.tum.de
E-Mail: mareike.wenning@wzw.tum.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 125, 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:



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 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.