

Erhöhte Phagensicherheit in Molkereien durch hochspezifische molekulare Phagen-Nachweissysteme und eine orthogonale Prozessstrategie zur Phagenreduktion in Molke

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Bonn
Forschungsstellen:	<p>Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Milchwissenschaft und -technologie Prof. Dr. Dr. Jörg Hinrichs</p> <p>Max-Rubner-Institut (MRI) Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Kiel Prof. Dr. Charles Franz/Dr. Horst Neve</p>
Industriegruppe(n):	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin
	<p>Projektkoordinator: Dr. Ralf Zink DMK Deutsches Milchkontor GmbH, Bremen</p>
Laufzeit:	2017 - 2020
Zuwendungssumme:	€ 492.250,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Rohmilch enthält Bakteriophagen in Titern von bis zu 10^4 Plaque-bildenden Einheiten (PbE) mL^{-1} mit großer Biodiversität. In vorangegangenen IGF-Projekten wurde gezeigt, dass mit wenigen Ausnahmen die Molkerei-Bakteriophagen der mesophilen Säuerungs- und Aromakulturen die Kurzzeit-Pasteurisation überstehen. Somit gelangen unterschiedliche Phagenspecies in den Käsungsprozess. Treffen die Phagen auf sensitive Wirtsbakterien, so vermehren sie sich bis zu einem Titer von bis zu 10^9 PbE mL^{-1} Molke oder g^{-1} Käse. Werden phagenbelastete Molkeprodukte in den Betrieben recycelt, können Fermentationsstörungen die Folge sein. Bisher kann die „Phagenfreiheit“ von Molke weder schnell geprüft noch garantiert werden.

Im Rahmen des IGF-Projekts AiF 16714 N wurde deshalb ein neues, hochspezifisches molekulares Nachweissystem basierend auf der LAMP-Methode (Loop-mediated isothermal Amplification) entwickelt, mit dem innerhalb von 90 min gezielt vier besonders thermoresistente

Lactococcus-lactis-Problemphagen der 936 Species in einer Molkenprobe mit einer Nachweisgrenze von 10^3 PbE mL^{-1} detektiert werden können. Darüber hinaus wurden in den IGF-Projekten AiF 14339 N und AiF 15886 N experimentelle Daten zur thermischen Inaktivierung thermoresistenter Phagen ermittelt, die inzwischen erfolgreich für das Auslegen der thermischen Behandlung in Prozessen genutzt werden. Allerdings werden beim thermischen Inaktivieren der Phagen Molkenproteine denaturiert, so dass dies keine Option für funktionelle Molkenproteinpräparate mit einem hohen Anteil an nativen Molkeproteinen darstellt. Für solche Produkte konnte aber im Rahmen des IGF-Projekts 16714 N eine nicht-thermische Alternative aufgezeigt werden, mit der mittels Mikrofiltration Phagen um mehr als 4 log-Stufen in nativer Molke reduziert werden können. Ist die Molke gering belastet, kann eine solche phagenfiltrierte Molke zum Recycling im Betrieb oder zur Weiterverarbeitung genutzt werden. Ist der Ausgangsphagentiter jedoch höher, z. B. 10^8 PbE mL^{-1} , würde die alleinige Filtration keine ausreichende Phagensicherheit

garantieren. Für diese Fälle wäre die sog. orthogonale Prozessführungsstrategie – unterstützt durch den Phagen-Schnellnachweis (s.o.) – geeignet.

In der orthogonalen Prozessführungsstrategie werden definitionsgemäß Prozessschritte kombiniert, deren technologische Maßnahmen/Verfahren sich im Wirkmechanismus ergänzen, beispielsweise die UV-C-Behandlung einer bereits phagenfiltrierten Molke. Während in den USA die UV-C-Behandlung von Lebensmitteln bereits zugelassen ist, ist die Behandlung in Deutschland nur für die Entkeimung von Trinkwasser, die Oberflächenentkeimung von Hartkäse und für Fruchtzubereitungen gesetzlich erlaubt.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, die Phagen der Milchsäurebakterien in Molken mit geeigneten molekularen Schnellmethoden nachzuweisen und mittels orthogonaler Prozessschritte, bestehend aus einer Filtration und einer UV-C-Behandlung, ohne negative Produktveränderungen in der Summe um bis zu 9 log-Stufen zu reduzieren. Erarbeitet werden sollten Zusammenhänge zwischen der UV-C-Dosis und der Phageninaktivierung und den ggf. auftretenden Produktveränderungen. Letzteres dient der Prozessauslegung, um Risiken für den Konsumenten und unerwünschte Qualitätsveränderungen auszuschließen. Schließlich sollten mit den experimentellen Arbeiten die Grundlagen für die Nutzung der UV-C-Behandlung von Molke und für eine mögliche Zulassung erarbeitet werden.

Forschungsergebnis:

Im Rahmen des Vorhabens wurde an Forschungsstelle 1 (Universität Hohenheim) ein experimenteller Aufbau zur UV-C-Behandlung etabliert. Dazu wurde die Bestrahlungskammer BS-02 (Opsytec Dr. Gröbel GmbH, Ettlingen) verwendet, mit der eine definierte UV-C-Exposition von flüssigen Proben im Labormaßstab möglich ist. Hierbei sind vor allem die absorptiven Eigenschaften der zu bestrahlenden Medien zu beachten – durch Molke dringen weniger UV-C-Strahlen als durch Wasser –, weshalb die Schichtdicke angepasst werden musste.

Für die Inaktivierungsversuche wurden gut charakterisierte *L.-lactis*-Bakteriophagen von Forschungsstelle 2 (MRI) aufgereinigt und als hochkonzentrierte Phagenpräparationen der Forschungsstelle 1 zur Verfügung gestellt. Alle untersuchten *L.-lactis*-Phagen konnten mittels UV-C-Strahlung vollständig, d. h. > 9 log-Stufen, inaktiviert werden. In Wasser waren dafür

UV-C-Dosen von etwa 0,1 J cm⁻² ausreichend, wohingegen in nativer Molke etwa 5 J cm⁻² erforderlich waren. Wird der Phagentiter durch eine vorangehende Phagenfiltration bereits um 4 log-Stufen reduziert, verringern sich die benötigten UV-C-Dosen um etwa die Hälfte. Da kein Unterschied zwischen thermoresistenten und thermosensitiven Phagen festgestellt wurde, ist diese Inaktivierungsmethode auch für die „Problem“-Phagen besonders vielversprechend.

Darüber hinaus untersuchten beide Forschungsstellen mögliche, durch die UV-C-Strahlung verursachte Produktveränderungen der nativen Molke. Der Riboflavingehalt und das Aminosäurespektrum wurden erst bei extrem hohen Dosen von bis zu 20 J cm⁻² beeinflusst, jedoch wurden schon bei etwa 0,5 J cm⁻² flüchtige Stoffe gebildet, die einen unangenehmen Geruch nach „Stall“ bzw. „Kuhmist“ aufweisen. Ob die UV-C-Behandlung in kontinuierlichen Anlagen schonender erfolgt, soll im Nachgang des Projekts noch im Rahmen eines Upscaling-Experiments geprüft werden. Es konnten keine zytotoxischen, genotoxischen oder mutagenen Wirkungen nachgewiesen werden. Damit steht einer Genehmigung der UV-C-Behandlung nativer Molke grundsätzlich nichts entgegen.

An Forschungsstelle 2 wurde der LAMP-Assay weiterentwickelt und die Durchführzeit auf unter eine Stunde gesenkt. Hierdurch können sechs hitzeresistente *L.-lactis*-„Problem“-Phagen mit den neu entwickelten LAMP-Primern in den Medien Wasser, native Molke und Käsemolke nachgewiesen werden. Große Phagengruppen müssen aufgrund hoher Heterogenität auf Basenpaarebene in Untergruppen unterteilt werden, um eine höhere Übereinstimmung der konservierten Bereiche zu erreichen. Für die größte *L.-lactis*-Phagengruppe 936 konnte dies erfolgreich angewandt und alle getesteten Phagen dieser Phagengruppe nachgewiesen werden.

Während des gesamten Forschungsvorhabens wurden von Forschungsstelle 2 insgesamt 197 Rohmilchproben verschiedener Molkereien auf das Vorkommen von Phagen gescreent. In 79 Proben konnten Phagen verschiedener Phagengruppen nachgewiesen werden, darunter auch neuartige *L.-lactis*-P335-„Hybrid“-Phagen, die eine hohe Verwandtschaft zu *S.-thermophilus*-Phagen aufzeigten. Die Titer variierten zwischen 10 und 2,6 x 10⁶ PbE mL⁻¹.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Käseproduktion in Deutschland betrug 2018 ca. 2,5 Mio. Tonnen. Des Weiteren wurden über 345.000 Tonnen Molkenpulver in deutschen Molkereien produziert (2017). Deutschland ist weltweit der größte Exporteur von Milchprodukten und exportierte 2018 insgesamt ca. 327.000 Tonnen Molkenpulver.

Molke aus der Käseproduktion enthält hohe Konzentrationen an Phagen und kann bei Einsatz von Molkenpulvern bei der Herstellung fermentierter Lebensmittel zu Fermentationsstörungen führen. Die in diesem Projekt erarbeiteten grundlegenden Daten bilden eine notwendige Voraussetzung für die Zulassung eines neuen Behandlungsverfahrens.

Die technologischen Empfehlungen können in milchverarbeitenden Betrieben und in der Zulieferindustrie genutzt werden, um die Prozesssicherheit zu verbessern und um Fermentationsstörungen zu minimieren. Durch den schnellen Nachweis von Phagen in niedriger Konzentration erhalten Unternehmen zudem ein Werkzeug an die Hand, um kurzfristig über die Weiterverwendung bzw. Weiterverarbeitung von Molke zu entscheiden.

Die Ergebnisse werden die Wettbewerbsfähigkeit der deutschen Hersteller steigern und verschaffen ihnen einen Vorsprung auf dem Exportmarkt.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2020.
2. Brinks, E.: Charakterisierung der Genome verschiedener *Lactococcus* und *Leuconostoc* Phagen und Entwicklung eines hochsensitiven und molekularen Nachweisverfahrens für besonders hitzeresistente Phagen der Gruppe 936. Dissertation Universität Kiel (2019).

3. Brinks, E., Wagner, N., Neve, H., Samtlebe, M., Hinrichs, J., Franz, C.M.A.P. & Heller, K.J.: Detection of *Lactococcus lactis* phage P680, a heat resistant member of the 936 group of phages, by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Intern. Dair. J. 82, 1-3 (2018).

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

Max-Rubner-Institut (MRI)
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel
Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie (Kiel)
Hermann-Weigmann-Str. 1, 24103 Kiel
Tel.: +49 431 609-2343
Fax: +49 431 609-2306
E-Mail: charles.franz@mri.bund.de
E-Mail: horst.neve@mri.bund.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/via

