

## Identifizierung und Nachweis von Amylasen zur Sicherung der Qualität von stärkehaltigen Milcherzeugnissen

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle(n):</b>	Universität München Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch Prof. Dr. Erwin Märtlbauer/Dr. Richard Dietrich  Universität München Veterinärwissenschaftliches Department Lehrstuhl für Tierphysiologie Prof. Dr. Cornelia Deeg/Dr. Kristina Kleinwort
<b>Industriegruppe(n):</b>	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin  Projektkoordinator: Dr. Bernd Hammelehle Ehrmann AG, Oberschöneck
<b>Laufzeit:</b>	2018 - 2020
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 302.060,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Die steigende Nachfrage nach ungekühlt länger haltbaren Milcherzeugnissen führte in den letzten Jahren zu einer erhöhten Produktion stärkehaltiger und hitzebehandelter Milcherzeugnisse (z.B. von Joghurtherzeugnissen und UHT-Deserts). Trotz guter Hygienepraxis werden vermehrt Probleme bei der Haltbarkeit dieser Milchprodukte beobachtet, die sich in einer partiellen oder vollständigen Verflüssigung der Produkte durch Abbau der als Stabilisator/Verdickungsmittel zugesetzten modifizierten Stärke äußerte. Die Veränderungen treten unvermittelt, oft erst Monate nach Herstellung der Chargen auf und bedingen für die Hersteller kostenspielige Produktrücknahmen.

Die für eine Verflüssigung bzw. den Stärkeabbau verantwortlichen Enzyme sind Amylasen, die direkt, als Rückstände technischer Prozesse oder über die produzierenden Mikroorganismen in Rohwaren und Produkte eingetragen werden. Die ursächlichen Enzyme bzw. die diese produzierenden Mikroorganismen aus kontaminierten Produkten sind bislang nicht identifiziert. Auch ist unbekannt, wie der Eintrag dieser Stoffe bzw. der entsprechenden Keime in das Milchprodukt verhindert werden kann. Voraussetzung dafür ist die Entwicklung praxis-

tauglicher und sensitiver Verfahren zum Nachweis stärke-spaltender Enzyme in den Produkten und Rohwaren.

Ziel des Forschungsvorhabens war es zu klären,

- welche Amylasen für die Produktverflüssigung verantwortlich sind,
- über welchen Weg die Amylasen in die Produkte bzw. Rohstoffe gelangen und
- wie Amylase-Rückstände effizient und sensitiv nachgewiesen werden können.

Ein wesentlicher Bestandteil des Projektes war daher insbesondere auch die Entwicklung eines schnellen, praxistauglichen Verfahrens mit hoher Sensitivität und breiter Spezifität zum Nachweis der verantwortlichen amylolytischen Enzyme.

### Forschungsergebnis:

Ausgehend von der Arbeitshypothese, dass es sich bei den verantwortlichen Enzymen um bakterielle, hitzestabile, in einem weiten pH-Bereich aktive Amylasen handelt, wurden sowohl die betroffenen (verflüssigten) Produkte als auch alle eingesetzten Rohwaren mikrobiologisch und proteomisch untersucht und mit unveränderten Erzeugnissen verglichen. Im Laufe des Projektes konnten keine Hinweise darauf gefunden

werden, dass das Wachstum von Stärke-abbauenden Keimen in den Produkten ursächlich für das Auftreten von verflüssigten Fehlprodukten ist. Vielmehr konnte in einem proteomischen Ansatz die Verflüssigung eines Puddings eindeutig auf eine Kontamination mit einem technischen, amylolytischen Enzym (Cyclo-maltodextrin-Glucanotransferase, CGTase) zurückgeführt werden. Modellversuche zeigten, dass technisch eingesetzte CGTasen und auch  $\alpha$ -Amylasen selbst im Spurenbereich von  $< 1$  ng/g (7 pkat/g) in der Lage sind, eine Verflüssigung stärkehaltiger Milchprodukte zu induzieren. Exoamylasen waren hingegen deutlich weniger aktiv. Beide relevanten, technisch eingesetzten Endoamylasen weisen zudem eine ausgeprägte Hitzestabilität auf, auch nach UHT-Behandlung sind noch Restaktivitäten von 1 – 3 % nachweisbar. Bei der Kontamination von Produkten spielen belastete Rohwaren eine große Rolle, vor allem in Aroma-Präparationen konnten amylolytische Aktivitäten nachgewiesen werden. Da kommerzielle Amylase-Tests nicht in der Lage sind, die Enzyme auf dem erforderlichen Sensitivitätsniveau nachzuweisen, wurde im Projekt ein innovatives Nachweis-system entwickelt. Das Testprinzip beruht darauf, dass der amylolytische Abbau von entsprechend designten Enzymsubstraten mittels hochsensitivem Enzymimmuntest (EIA) nachgewiesen wird. Einfache Protokolle zur Synthese der für den Testaufbau benötigten Farbstoff-markierten Enzymsubstrate wurden etabliert sowie hochaffine Farbstoff-spezifische Antikörper generiert. Nach Optimierung des Verfahrens, wobei die für den enzymatischen Vorverdau wichtigen Parameter (Zuckerkettenlänge des Substrats, Substrat-Konzentration, Inkubationstemperatur/-zeit) sowie immunchemische EIA-Variablen (verwendeter mAk, Antikörper-Konzentration) im Fokus standen, konnten mit dem realisierten generischen Testsystem amylolytische Enzyme, insbesondere  $\alpha$ -Amylasen und CGTasen, ultrasensitiv im Bereich von 0,1 pkat/ml nachgewiesen werden. Rohwaren, wie Aromapräparationen, Kristallzucker, Fructose-Glucose-Sirups oder Fruchtzubereitungen, konnten ohne aufwändige Extraktionsverfahren mit dem Test auf dem erforderlichen Sensitivitätsniveau zuverlässig analysiert werden. Prinzipiell könnte das innovative Testverfahren nach Adaption auch zum Nachweis anderer Enzyme, wie z. B. Peptidasen oder Lipasen, eingesetzt werden.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

Die deutsche Milchindustrie ist einer der umsatzstärksten Wirtschaftszweige der Lebensmittelindustrie. Stetige Erweiterungen des Produktangebots, innovative Produktionsmethoden und

der weltweite Export stellen die Hersteller vor immer neue hygienische Herausforderungen. Über den entstehenden Schaden durch sich verflüssigende Produkte, die für den wachsenden Exportmarkt bestimmt sind, existieren bislang keine statistischen Erhebungen, allerdings werden die wirtschaftlichen Schäden (hohe Rückrufkosten, Imageverlust) als erheblich betrachtet. Es sind zahlreiche Betriebe und unterschiedlichste Produkte betroffen. Durch die teilweise sehr lange Zeit (Wochen/Monate) bis zum Auftreten des Produktmangels kann bislang nicht verhindert werden, dass die Produkte ausgeliefert/verschifft werden.

Das Vorhaben wurde die Basis zur Verhinderung bzw. Früherkennung der Verflüssigung stärkehaltiger, hitzebehandelter Milcherzeugnisse geschaffen. Die Ergebnisse werden dazu beitragen, den hohen Qualitätsstandard deutscher Milchprodukte zu sichern und zu verbessern. Durch die Verfügbarkeit des hochsensitiven, breit einsetzbaren und kostengünstigen Tests wird es möglich, Probleme rechtzeitig zu erkennen sowie die tatsächlichen Ursachen zu identifizieren und auszuräumen. Damit wird eine deutliche Verminderung von Produktionsausfällen bei lang haltbaren Produkten (insbesondere von Puddingen, Joghurtherzeugnissen mit Fruchtzubereitungen und von UHT-Desserts) erreicht.

Die Ergebnisse sind insbesondere relevant für die milchverarbeitende Industrie und für Hersteller von Aroma- und Fruchtzubereitungen. Verlässliche Analysemethoden zum Nachweis der Amylasen sichern die Wettbewerbsfähigkeit der Unternehmen und können einen wesentlichen Beitrag zur Sicherung bestehender und zur Schaffung neuer Arbeitsplätze leisten. Darüber hinaus können die Ergebnisse in der mittelständischen Diagnostikindustrie zur Entwicklung kommerzieller Schnelltests führen.

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2020.
2. Hofmayer, Dietrich, R. & Märtlbauer, E.: Entwicklung eines hochsensitiven Testes zum Nachweis Stärke-abbauender Enzyme. Tagungsbd. 60. Arbeitstag. Lebensmittelsicherheit/Verbraucherschutz, 383-384, Verlag der DVG (2019).
3. Hofmayer, Dietrich, R. & Märtlbauer, E.: Identifizierung und Nachweis von Amylasen zur Sicherung der Qualität von stärkehaltigen Milcherzeugnissen. Arbeitstag. Lebensmittelsicherheit/Verbraucherschutz, Amtstierärztl. Dienst, Sonderausg. 25.9.-28.9.2018, 172 (2018).

**Weiteres Informationsmaterial:**

Universität München  
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch  
Schönleutner Str. 8  
85764 Oberschleißheim  
Tel.: +49 89 2180-78601  
Fax: +49 89 2180-78602  
E-Mail: e.maertlbauer@mh.vetmed.uni-  
muenchen.de

Universität München  
Veterinärwissenschaftliches Department  
Lehrstuhl für Physiologie, Arbeitsgruppe Deeg  
Lena-Christ-Straße 48  
82152 Planegg/Martinsried  
Tel.: +49 89 2180-1630  
Fax: +49 89 2180-2554  
E-Mail: cornelia.deeg@lmu.de  
E-Mail: deeg@tiph.vetmed.uni-muenchen.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



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.