

Analyse hofseitiger Einflussfaktoren auf die *Pseudomonas*-Keimzahl in Rohmilch



Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle(n):	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL) Abt. Mikrobiologie Prof. Dr. Siegfried Scherer/Dr. Mareike Wenning/Dr. Genia Lücking Max-Rubner-Institut (MRI) Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie (Kiel) Prof. Dr. Charles Franz/Dr. Christina Böhnlein/Dr. Jan Kabisch
Industriegruppe(n):	Milchindustrieverband e. V. (MIV), Berlin
Projektkoordinator:	Jan Hesse frischli Milchwerke GmbH, Rehburg-Loccum
Laufzeit:	2018 - 2021
Zuwendungssumme:	€ 496.290,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI beantragt)

Ausgangssituation

Der Export von Milcherzeugnissen in Drittländer unterliegt seit Jahren starken Steigerungsraten. Die Ausfuhr von Konsummilch in Nicht-EU-Länder stieg beispielsweise 2019 im Vergleich zum Vorjahr um 30 % und beträgt nun ca. ein Fünftel des gesamten Exportes von Konsummilch. Mit diesem Export verbunden ist die Notwendigkeit einer deutlichen Verlängerung der Haltbarkeit der exportierten Produkte, um längere Transportphasen zu kompensieren und steigenden Kundenanforderungen gerecht zu werden. Dies stellt besondere Anforderungen an Dauermilcherzeugnisse, wie z. B. H-Milch, da es aufgrund von enzymatischem Proteinabbau zu sensorischen und textuellen Veränderungen der Milch noch vor Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums (MHD) kommen kann. Ursächlich hierfür sind zu einem erheblichen Teil hitzeresistente bakterielle Peptidasen, die vor allem durch Bakterien der Gattung *Pseudomonas* während der gekühlten Lagerung von Rohmilch gebildet werden. Sind diese Enzyme in der Rohmilch vorhanden, besteht aufgrund ihrer sehr hohen Hitzeresistenz keine Möglichkeit der Eliminierung mehr. Daher muss vermieden werden, dass sie während der Lagerung und dem Transport gebildet werden, was nur über eine Senkung der initialen *Pseudomonas*-Keimzahl in Rohmilch zu erreichen ist. Allerdings ist nicht bekannt, welche Faktoren bei der Milcherzeugung und -lagerung zu einer Erhöhung des *Pseudomonas*-Gehaltes beitragen. Im Verdacht stehen lange Lagerphasen, da *Pseudomonas* ein kältetolerantes Bakterium ist und bei Kühllagertemperaturen wachsen kann. Es gibt jedoch eindeutige Hinweise, dass auch der Primäreintrag bei der Milcherzeugung einen signifikanten Einfluss hat, wobei unklar ist, wo genau kritische Punkte liegen.

Ziel des Forschungsvorhabens war daher eine Analyse der hofseitigen Einflussfaktoren unter Berücksichtigung der verschiedenen Betriebsstrukturen in unterschiedlichen Regionen Deutschlands. Schwerpunktmäßig sollte der Zusammenhang einzelner Faktoren der Milcherzeugung mit dem Rohmilchmikrobiom und einer erhöhten *Pseudomonas*-Keimzahl aufgeklärt werden, um hierdurch Handlungsanweisungen ableiten zu können.

Forschungsergebnis

Im Rahmen des Vorhabens wurden 444 Rohmilchproben von 122 Erzeugerhöfen hinsichtlich ihrer *Pseudomonas*- und Gesamtkeimzahlen analysiert und diese mit 12 hofseitigen Parametern korreliert. Die Untersuchung veranschaulichte, dass die Faktoren Abholungsintervall, Tierhaltung, Milchkühlung, Produktionsart und Jahreszeit die *Pseudomonas*-Keimzahlen am stärksten beeinflussten. Insbesondere die ökologische Haltungform sowie eine Tierhaltung, die Auslauf oder Weidegang ermöglicht, waren mit niedrigeren Zellzahlen assoziiert. Die Ergebnisse der Mikrobiomanalyse von 425 Rohmilchproben mittels 16S-r-RNA-Amplikon-Sequenzierung ergaben, dass *Pseudomonas* im Durchschnitt einen relativen Anteil von 5,5 % am Milchmikrobiom aufwies. Analog zu den Ergebnissen der absoluten Keimzahlbestimmung zeigte die Mehrheit der Milchproben (84 %) nur eine recht geringe *Pseudomonas*-Belastung. Jedoch war bei den restlichen Proben der Anteil stark erhöht und variierte zwischen 5 und 95 %. Des Weiteren wiesen die Quartalsproben vieler Höfe eine stabile, spezifische Mikrobiota auf, während bei anderen Höfen die Milchproben hinsichtlich ihrer mikrobiellen Zusammensetzung stark schwankten.

Im Rahmen von 16 Hofbegehungen wurden die Eintragsrouten von *Pseudomonas* in Rohmilch analysiert. Durch Bestimmung der Gesamt- und *Pseudomonas*-Keimzahlen konnten verschiedenen Stellen in den Bereichen Rohmilchtank, Melkanlage und Melkzeug als Eintragswege auf den Höfen lokalisiert werden. Während der Eintrag von *Pseudomonaden* über die Luft und über die Wasserversorgung unwahrscheinlich erschien, wiesen hohe Keimzahlen im Bereich der Melkanlagen und auf Gummioberflächen (Dichtungen) auf kritische Stellen hin. Weiterhin waren *Pseudomonas*-Keimzahlen von über $\log 4$ KbE/ml am Zapfhahn/-deckel, der Öffnung des Entlüfters und des Entlüftungsdeckels am Rohmilchtank nachweisbar und können somit Eintragsquellen von *Pseudomonaden* darstellen.

Die Analysen der Milchproben von sieben Sammeltouren ergaben bei vier der Touren einen deutlichen Anstieg der *Pseudomonaden* (> 1 log-Stufe) in den Sammelwagen oder im Stapeltank der Molkereien. Dabei konnte kein klarer Zusammenhang mit der Transport- bzw. Lagerdauer festgestellt werden. Insbesondere bei den Sammelwagen waren teils hohe *Pseudomonas*-Keimzahlen bemerkbar, die nicht alleine auf Zellwachstum zurückführbar sind, sondern auf Kontaminationen hinweisen könnten. Mikrobiomdaten der Tourproben bestätigten das Wachstum psychrotoleranter Gattungen, u. a. von *Pseudomonas*, im Stapeltank.

Das Biofilmbildungsvermögen von *Pseudomonas*-Isolaten in Mikrotiterplatten und auf Edelstahl-Plättchen bei einer 6-tägigen Inkubation bei 6 °C in Milchmedium stellte sich als stammspezifisch und abhängig von der Oberfläche sowie von der Konzentration des Milchmediums dar. Auch die Charakterisierung der Peptidaseaktivität von *Pseudomonas* spp. auf Magermilch-Agar sowie von *Pseudomonas*-Biofilmen mittels Fluorescamin-Assay ergab eine Spezies- und Isolat-abhängige Aktivität. Die Bildung von Peptidasen in *Pseudomonas*-Mono-Biofilmen wurde zusammen mit einer erhöhten Aktivität im Vergleich zur planktonischen Wuchsform nachgewiesen. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen veranschaulichten die Zusammensetzung und Morphologie dieser Biofilme. Zudem konnte *P. proteolytica* aufgrund hoher Biofilm-Keimzahlen in unterschiedlichen Milchmedien in Kombinationen mit einer sehr hohen Peptidaseaktivität als potenzieller „Problemkeim“ identifiziert werden.

Wirtschaftliche Bedeutung

Im Jahr 2019 wurden in Deutschland rund 33 Mio. Tonnen Rohmilch produziert, mit denen der milchverarbeitende Sektor mit seinen 39.000 Beschäftigten ein Umsatzvolumen von mehr als 27 Mrd. € erwirtschaftete. Der in den letzten Jahren kontinuierlich steigenden Milchproduktion steht jedoch ein stagnierender Konsum in Deutschland gegenüber. Dem Export qualitativ hochwertiger Produkte kommt daher für die Wertschöpfung deutscher Molkereiunternehmen eine zunehmende Bedeutung zu.

Durch die Analyse der hofseitigen Einflussfaktoren ist es erstmals möglich, die Produktions- und Haltungsbedingungen sowie den Milchtransport und die Lagerung in Hinblick auf *Pseudomonas*-Belastung zu bewerten und daraus Handlungsanweisungen zur Reduktion unerwünscht hoher Keimzahlen abzuleiten. Auch werden kritische Stellen durch die Analyse der Eintragsrouten von *Pseudomonas* auf den Höfen eingegrenzt. Die Fähigkeit zur Biofilmbildung von *Pseudomonas* hebt weiterhin die Notwendigkeit der Optimierung effizienter Reinigungsstrategien hervor. Dies wird Molkereien und Milcherzeuger in die Lage versetzen, *Pseudomonaden* und folglich die Enzymmenge als Schlüsselfaktor für den Qualitätserhalt zu minimieren und Kundenreklamationen zu vermeiden. Profitieren werden davon nicht nur die milchverarbeitenden Unternehmen, sondern insbesondere auch die ca. 57.000 Milcherzeugerbetriebe, die mehrheitlich kleine und mittelständische Unternehmen (KMU) sind. Eine weitere Steigerung des Exports sichert ihnen die Abnahme größerer Milchmengen. Denkbar wäre zudem die Etablierung der *Pseudomonas*-Keimzahl als neuen Qualitätsparameter für Milchdauerzeugnisse ähnlich dem niedrigen Sporengehalt für Käseerzeugnisse.

Publikationen (Auswahl)

1. FEI-Schlussbericht 2021.
2. Gieschler, S., Fiedler, G., Böhnlein, C., Grimmler, C., Franz, C.M.A.P. & Kabisch, J.: *Pseudomonas kielensis* sp. nov. and *Pseudomonas baltica* sp. nov., isolated from raw milk in Germany. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71, 004717 (2021).
3. Hofmann, K., Huptas, C., Doll, E.V., Scherer, S. & Wenning, M.: *Pseudomonas haemolytica* sp. nov., isolated from raw milk and skimmed milk concentrate. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 2339-2347 (2020).
4. Hofmann, K., Woller, A., Huptas, C., Wenning, M., Scherer, S. & Doll, E.V.: *Pseudomonas cremoris* sp. nov., a novel proteolytic species isolated from cream. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71, 004597 (2020).
5. Hofmann, K., Huptas, C., Doll, E.V., Scherer, S. & Wenning, M.: *Pseudomonas saxonica* sp. nov., isolated from raw milk and skimmed milk concentrate. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 935-943 (2020).

Weiteres Informationsmaterial

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

Max-Rubner-Institut (MRI)
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel
Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie
Hermann-Weigmann-Str. 1, 24103 Kiel
Tel.: +49 431 609-2340
Fax: +49 431 609-2306
E-Mail: charles.franz@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

Förderhinweis

... 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.

Bildnachweis - Seite 1: © Toh Kheng Guan - stock.adobe.com #8412359

Stand: 6. Januar 2022