

Minimierung der Phagenbelastung in Molke und Molkeprodukten durch Membranfiltration

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 PD Dr. Charles Franz/Dr. Horst Neve</p>
Industriegruppe:	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin
	<p>Projektkoordinator: Dr. Regina Schuster, Karwendel-Werke Huber GmbH & Co. KG, Buchloe</p>
Laufzeit:	2012 – 2015
Zuwendungssumme:	€ 480.300,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Der Käsemarkt unterliegt einem starken internationalen Wettbewerb, so dass die Optimierung von Prozessen und auch die Verwertung der bei der Käseherstellung anfallenden Molke (die fünf- bis zehnmal höher ist als Käse) wichtige Faktoren für den wirtschaftlichen Erfolg der Unternehmen sind. Molke wird dabei entweder zu den unterschiedlichsten, möglichst nativen Molkenproteinpräparaten veredelt oder direkt in den Unternehmen in verschiedenen Produkten eingesetzt.

Im Rahmen von zwei IGF-Projekten des FEI zum Vorkommen und zur Identifikation sowie zur Hitzeinaktivierung und Säure/Lauge-Inaktivierung von Bakteriophagen stellte sich heraus, dass die meisten Phagen eine Pasteurisation der Rohmilch überleben und einige besonders thermoresistent sind. Damit ist nicht zu vermeiden, dass Phagen in den Käseprozess gelangen und bei vorhandenen Wirtsmikroorganismen z. T. in hoher Anzahl (bis zu 10^9 Phagen mL^{-1}) in die Molke gelangen. Dies kann einerseits zu Problemen bei der Wiederverwertung der Molke oder des Molkenrahms bei den Un-

ternehmen führen, denn dadurch wird das Arbeitsgebiet (Temperatur-Zeit-Kombinationen, üblicherweise $< 100 \text{ }^\circ\text{C}$) für die Mikropartikulierung (MP) eingeschränkt, um thermoresistente Phagen sicher zu inaktivieren. Andererseits ist nicht auszuschließen, dass zugekaufte Molkenproteinpräparate mit einem hohen Anteil an nativen Molkenproteinen (β -Lactoglobulin-Denaturierungsgrad $< 30 \%$), die in der Herstellung fermentierter Milchprodukte, wie Joghurt oder Frischkäse, eingesetzt werden, durch ihre Belastung mit Phagen zu Fermentationsstörungen führen.

Im Ergebnis dieser beiden durchgeführten FEI-Projekte wurden bereits zahlreiche Maßnahmen von der Industrie ergriffen, um Fermentationsstörungen in Käsereien zu minimieren, z.B. wurde die Molkenrahmerhitzung angepasst. Außerdem wird inzwischen vermieden, funktionelle, native Molkenpräparate im eigenen Unternehmen als Rezepturbestandteil zur Herstellung fermentierter Milchprodukte zu nutzen, da hierdurch Phagen im Unternehmen rezirkuliert werden können; aber auch der Zukauf birgt Ri-

siken, denn derartige Molkenpulver können ebenfalls Phagen enthalten.

Fermentationsstörungen durch Bakteriophagen treten in kleinen und mittelständischen Unternehmen (KMU) unvorhergesehen auf und machen damit den Produktionsprozess schlechter kalkulierbar. Zwar kommt es meistens nicht zum Totalausfall einer Charge, da Mehrstammkulturen eingesetzt werden oder eine Kulturrerotation erfolgt, aber Produktionsverzögerungen und Qualitätsschwankungen (z.B. bei Aromakulturen) sind häufig die Folge. Der Schaden betrifft dann ganze Fermentations tanks (20.000 bis 50.000 Liter) und mehrere Chargen, wenn die Ursache z. B. im Rezepturbestandteil Molkenpräparat liegen sollte.

Es besteht damit ein Zielkonflikt: So ist eine thermische Eliminierung thermoresistenter Phagen in Molke zwar prinzipiell möglich, jedoch führt diese zu einer mindestens 60%igen Denaturierung der Molkenproteine. Auf der anderen Seite wird eine möglichst schonende thermische Verarbeitung angestrebt, um Molkenproteinpräparate mit einem möglichst hohen Anteil an nativen Molkenproteinen bereitzustellen.

Ziel des Forschungsvorhabens war es vor diesem Hintergrund, Möglichkeiten zur Phagenreduktion mittels einer Crossflow-Membranfiltration (CFMF) für Phagen mit verschiedenen Morphologien experimentell zu untersuchen. Idee war, die in der Molke enthaltenen Phagen durch eine vorgeschaltete Phagenfiltration so weit zu reduzieren, dass die heute übliche und zwangsläufige Anreicherung der Phagen zusammen mit den Molkenproteinen in der Weiterverarbeitung, z.B. durch Ultrafiltration oder Eindampfung, minimiert werden kann. Ziel war die Reduktion des Phagentiters um 3 - 5 log-Stufen in der Molke. Des Weiteren sollten Molkenprodukte durch die Entwicklung eines Schnellnachweissystems frühzeitig hinsichtlich einer Phagenbelastung bewertet werden können.

Forschungsergebnis:

An Forschungsstelle 1 (Universität Hohenheim) wurde zunächst im Laborexperiment gezeigt, dass der Phagentiter in mit Phagen gespikter, idealer Molke mittels organischen Polyethersulfon (PES)-Membranen reduziert (bis zu 3 log-Stufen) und gleichzeitig eine hohe Permeation der majoren Molkenproteine erreicht werden

kann. Die Permeation von α -Lactalbumin war im Gegensatz zu β -Lactoglobulin signifikant höher und unabhängig von der Membrantrenngrenze. Die Phagenretention war unabhängig von der Morphologie der Phagen und stieg mit abnehmender Membrantrenngrenze (100 kDa > 300 kDa > 500 kDa). Lediglich Phagen mit großem Kapsid wurden signifikant besser zurückgehalten.

Im Weiteren wurde die Hypothese geprüft, dass Wirtsbakterien, die als „Fishing Tool“ der Molke zugegeben werden bzw. in der Praxis in der Molke ohnehin vorhanden sind, die Retention der Phagen verbessern. Diese Hypothese wurde bestätigt. Gründe sind, dass a) Phagen an die Wirtsbakterien adsorbieren und damit nicht mehr frei in der Molke vorliegen und b) die Wirtsbakterien und andere Stoffe eine Deckschicht auf der Membran bilden, wodurch weitere Phagen zurückgehalten werden.

Ausgehend von diesen Modellexperimenten wurde im Labormaßstab geprüft, ob eine Filtration mit keramischen Membranen vergleichbare Ergebnisse liefert. Zunächst wurden die Membranen charakterisiert (u.a. bezüglich ihrer Hydrophobizität, Porengröße). Anschließend wurden analog die Prozessparameter variiert und die resultierende Phagenretention und Permeation von Molkenbestandteilen untersucht. Die Proteinpermeation war vergleichbar mit denen der Experimente mit organischen Membranen. Die Phagenretention war allerdings bei vergleichbarer Trenngrenze mit anorganischen Membranen um 3 log-Stufen höher als bei den organischen Membranen. Diese Erkenntnisse sollten im größeren Maßstab an realer Molke verifiziert werden.

Dazu wurde in der Forschungs- und Lehrmolke-rei Hohenheim die bei der Schnittkäseherstellung anfallende Molke entrahmt und mit Phagen gespikt. Diese wurde anschließend im Technikumsmaßstab (70 Liter) (1,69 m², Gradientenmembran, 0,1 μ m, Membralox Modul 7 P - 1940 GP) filtriert (Überströmgeschwindigkeit 7 m s⁻¹ Transmembrandruck 0,06 MPa, 10 °C) und das ablaufende Permeat hinsichtlich Phagentiter und Molkenproteingehalt untersucht. Ablaufendes Retentat wurde während des Experiments vermischt und wieder dem Vorlaufbehälter zugeführt (Dauer des Experiments 90 min). Es wurde eine Phagenreduktion um > 4 log-Stufen über die Filtrationszeit von 90 min bei einer Proteinpermeation von > 80 % erreicht.

Somit stellt das Mikrofiltrieren (0,1 μm) von Käsemolke vor der Weiterverarbeitung einen attraktiven Prozessschritt zur Reduktion von Phagen dar. Weiterhin werden durch diesen Filtrationsschritt Schwebstoffe und Bakterien aus der Molke abgetrennt, nicht jedoch Enzyme oder funktionelle Bestandteile, wie z. B. Lactoferrin. Die „phagenfiltrierte“ Molke enthält bis zu 90 % der nativen Molkenproteine und bietet dadurch Potenzial für die Entwicklung neuer Produkte.

An Forschungsstelle 2 (MRI) wurden die für die Filtrationsversuche essentiellen Bakteriophagen aufgereinigt, aufkonzentriert und als hochreine Phagenpräparationen der Forschungsstelle 1 zur Verfügung gestellt. Aufgrund der schlechten Lagerstabilität der eingesetzten Phagen mussten diese mehrfach vor den Filtrationsversuchen aufgearbeitet werden. Des Weiteren wurden die bei der Filtration verwendeten Polyethersulfon-Membranen vor und nach den durchgeführten Filtrationen mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops untersucht und charakterisiert.

Für die Entwicklung von Nachweissystemen von Phagen der Milchsäurebakterien wurde die genomische DNA von thermoresistenten, neuartigen und „Problem“-Phagen (2 *Leuconostoc*- und 7 *L.-lactis*-Phagen) sequenziert. Die erhaltenen Genomsequenzen wurden an der Forschungsstelle 2 bioinformatisch analysiert (Annotation, vergleichende Sequenzanalysen). Durch vergleichende Sequenzanalysen der *Leuconostoc*-Phagen mit allen bisher publizierten Sequenzen von *Leuconostoc*-Phagen konnte der PCR-Assay zum Nachweis der *Leuconostoc*-Phagen optimiert werden. Innerhalb der verwendeten PCR-Primer konnten Abweichungen zwischen den Sequenzen festgestellt werden, wodurch einige Phagen nicht erfasst wurden. Durch Modifikation dieser Primer gelang es, alle bisher verfügbaren *Leuconostoc*-Phagen nachzuweisen.

Vergleichende Sequenzanalysen von vier thermoresistenten *L.-lactis*-Phagen der 936 Phagenspezies mit allen publizierten Sequenzen dieser Spezies führten zu einer Zielregion für einen spezifischen molekularen Nachweis der thermoresistenten *L.-lactis*-936-Phagen.

Anhand dieser Zielregion wurde ein LAMP („Loop mediated isothermal amplification“)-Assay entwickelt. Die LAMP-Methode wurde aufgrund ihrer einfachen Durchführbarkeit, des

geringen Zeitaufwands und besonders wegen ihrer hohen Spezifität ausgewählt. Die Methode wurde erfolgreich etabliert. Sauermolke, ideale Molke und Käsemolke wurden mit verschiedenen Phagen gespikelt. Die DNA wurde direkt aus der Molke isoliert und für den molekularen Nachweis eingesetzt. Die vier thermoresistenten Phagen wurden mit dieser molekularen Methode spezifisch nachgewiesen.

Die bisherige Nachweisgrenze der Phagen in Molke konnte von 10^4 Plaque-bildenden Einheiten (PbE) mL^{-1} um eine log-Stufe auf 10^3 PbE mL^{-1} optimiert werden. Für die schnelle und einfache Auswertung der Reaktionen wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®]-Safe dem Reaktionsgemisch nach Reaktionsende zugegeben. Aufgrund der großen Menge DNA, die bei einem LAMP-Assay amplifiziert wird, zeigten positive Reaktionen eine intensive Fluoreszenz nach Anregung mit UV-Licht.

Das entwickelte Testsystem ist ein verlässliches Werkzeug, um spezifische Phagen schnell (innerhalb von 90 Minuten) in Molke nachzuweisen. Dabei wird nur eine einfache Laborausstattung benötigt.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Der Käseproduktion kommt für die Wertschöpfung milchverarbeitender Unternehmen eine große Bedeutung zu. 2010 betrug die Käseproduktion in Deutschland ca. 2,4 Mio. Tonnen. Damit ist Deutschland EU-weit bei der Käseproduktion an erster Stelle. Die Eigenverwertung von Molke in den Betrieben oder die Verarbeitung zu unterschiedlichsten Molkenprodukten gewinnt in milchverarbeitenden Unternehmen eine immer größere wirtschaftliche Bedeutung. Molke aus der Käseproduktion enthält allerdings häufig eine hohe Konzentration an Phagen, die Probleme bei der Wiederverwertung hervorrufen kann. Das Projekt gibt Molkereien Werkzeuge an die Hand, mit der sich dieses Risiko erheblich minimieren lässt. Dazu bietet sich vor allem die Filtration an, da thermische Verfahren aufgrund der thermischen Denaturierung der hitzeempfindlichen Molkenproteine nur begrenzt anwendbar sind. Zur Überprüfung einer niedrigen Phagenkonzentration sind zudem schnelle und sensitive Nachweisverfahren notwendig. Die aus dem Projekt abzuleitenden technologischen Empfehlungen können in KMU einfach umgesetzt und damit die Prozesssicherheit verbessert werden.

Die praktische Nutzung des Verfahrens ergibt sich insbesondere im Lebensmittelsektor, aufgrund der Berücksichtigung unterschiedlicher Phagenmorphologie sind die Ergebnisse aber auch für den biotechnologischen Bereich von Interesse. Das Phagentestsystem könnte von Zulieferunternehmen hergestellt und zum Phagenmonitoring vermarktet werden. Darüber hinaus leistet das Vorhaben auch wichtige Hinweise für andere Firmen der Zulieferindustrie, wie Starterkulturenhersteller, Membranlieferanten, sowie für den Maschinen- und Anlagenbau für die Auslegung oder Neukonzeption von Prozesslinien.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2015.
2. Brinks, E., Wagner, N., Neve, H., Samtlebe, M., Hinrichs, J., Franz, C. & 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).
3. Wagner, N., Brinks, E., Samtlebe, M., Hinrichs, J., Atamer, Z., Kot, W., Franz, C. M. A. P., Neve, H. und Heller, K. J.: Whey powders are a rich source and excellent storage matrix for dairy bacteriophages. Intern. J. Food Microbiol. 241, 308-317 (2017).
4. Wagner, N., Samtlebe, M., Charles, F., Neve, H., Heller, K. J., Hinrichs, J. und Atamer, Z.: Dairy bacteriophages isolated from whey powder: thermal inactivation and kinetic characterization. Intern. Dair. J. 68, 95-104 (2017).
5. Samtlebe, M., Wagner, N., Neve, H., Heller, K. J. Hinrichs, J. und Atamer, Z.: Reduction of *Lactococcus lactis* phage contamination in whey by means of membrane filtration: Impact of phage morphology and of bacterial host cells functioning as "phage fishing tool". Intern. Dair. J. 68, 88-94 (2017).
6. Samtlebe, M., Wagner, N., Brinks, E., Neve, H., Heller, K. J. Hinrichs, J. und Atamer, Z.: Production of phage free cheese whey: Design of a tubular laboratory membrane filtration system and assessment of a feasibility study. Intern. Dair. J. 71, 17-23 (2017).
7. Samtlebe, M., Rohrhirsch, F., Mesch, I., Wagner, N. und Hinrichs, J.: Viruzide Wirkung von elektrolysiertem Wasser gegenüber Bakteriophagen. DMW Milchwirt. 7, 409-413 (2016).
8. Brinks, E., Samtlebe, M., Wagner, N., Neve, H., Heller, K.J., Hinrichs, J. und Atamer, Z.: Nicht-thermische Phagenreduktion in Molke. DMW Milchwirt. 9, 293-297 (2016).
9. Samtlebe, M., Wagner, N., Neve, H., Heller, K. J., Hinrichs, J. und Atamer, Z.: Application of a membrane technology to remove bacteriophages from whey. Intern. Dair. J. 48, 38-45 (2015).
10. Atamer, Z., Samtlebe, M., Neve, H., Heller, K. J. und Hinrichs, J.: Elimination of bacteriophages in whey and whey products. Front. Microbiol., doi: 10.3389/fmicb. 2013. 00191 (2013).
11. Capra, M.L., Neve, H., Sorati, P.C., Pamela C., Atamer, Z., Hinrichs, J., Heller, K.J. und Quiberoni, A.: Extreme thermal resistance of phages isolated from dairy samples: Updating traditional phage detection methodologies. Intern. Dair. J. 30, 59-63, DOI: 10.1016/j.idairyj.2012.11.009 (2013).

Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hohenheim
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie
FG Milchwissenschaft und -technologie
Garbenstraße 21, 70599 Stuttgart
Tel.: +49 711 459-3792
Fax: +49 711 459-3617
E-Mail: jh-lth@uni-hohenheim.de

Max-Rubner-Institut (MRI)
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel
Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie
Hermann-Weigmann-Str. 1, 24103 Kiel
Tel.: +49 431 959-2343
Fax: +49 431 609-2306
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:



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages



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.