

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie

Produktsicherheit bei UltraClean- und kaltaseptischen Abfüllanlagen

Bartolomé P. Oliver-Daumen

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. K.-H. Engel
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Back (i. R.)
2. Univ.-Prof. Dr. H.-Chr. Langowski
3. Priv.-Doz. Dr. H. Evers
(Technische Universität Berlin)

Die Dissertation wurde am 21.09.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 25.07.2011 angenommen.

Dank

Die vorliegende Arbeit wurde unter Betreuung meines Doktorvaters Prof. Werner Back am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I bzw. dem heutigen Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie in Freising / Weihenstephan durchgeführt. Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sage ich meinen herzlichen Dank:

Herrn Univ.-Prof. Dr.-Ing. habil. Werner Back (i. R.) für die Überlassung des Themas und seine erwiesene Geduld.

Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Horst-Christian Langowski für seine Geduld und kritischen Korrekturen.

Herrn Priv.-Doz. Dr.-Ing. Hartmut Evers für seine Anregungen, Korrekturen und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Univ.-Prof. Dr.-Ing. Thomas Becker für die Möglichkeit zur Betreuung der Diplomanten im mikrobiologischen Labor des Lehrstuhls.

Meinen Freunden und Kollegen Dipl.-Ing. Dieter Heitzmann, Dipl.-Ing. Qian Fei, Dipl.-Ing. Johannes Tippmann, Dr.-Ing. Stephan Vey und Diplom-Lebensmitteltechnologe Rüdiger Stroh sowie meiner Mitarbeiterin Ute Herms für deren kritische Anregungen und Unterstützungen.

Allen Freunden und Kollegen sowie den Mitgliedern des VDI Ausschuss 4066, welche die Hoffnung nie aufgegeben haben.

Meinen Eltern, die mir meine Berufsausbildung ermöglichten und damit den eigentlichen Grundstein für diese Arbeit legten.

Mein großer Dank gilt auch meiner Frau Angelika, die mich moralisch unterstützt und in meinem Vorhaben bestärkt hat sowie ihre Hinnahme der Einschränkungen im Privatleben, welche eine Promotion neben dem eigentlichen Berufsleben mit sich bringt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Alle aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Freising / Weihenstephan, 17. September 2010

Bartolomé P. Oliver-Daumen

Inhaltsverzeichnis

Dank	II
Erklärung	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis.....	XII
Tabellenverzeichnis.....	XIV
1. Einleitung und Aufgabenstellung	15
2. Grundlagen und Kenntnisstand	19
2.1. Spezielle Probleme bei hitzeresistenten Keimen.....	19
2.1.1 Historie.....	19
2.1.2 Reaktionskinetische Grundlagen der Abtötungskinetik	19
2.1.3 Kennwerte zur Hitzeresistenz	21
2.2. Ausbildung von Hitzeresistenzen.....	25
2.3. Einfluss verschiedener Produktparameter auf die Hitzeresistenz von Mikroorganismen	26
2.4. Spezielle Probleme bei hitzeresistenten Keimen.....	31
2.5. Sporulation von Hefen	32
2.6. Entkeimung von Getränken in Abfüllanlagen.....	32
2.7. Entkeimungsverfahren für Verpackungen	33
2.7.1 Ozon	34
2.7.2 Peressigsäure (Nass-Verfahren)	35
2.7.3 Wasserstoffperoxid (Nass-Verfahren)	35
2.7.4 Wasserstoffperoxid mit Heißluft (Trocken-Verfahren)	35
2.7.5 Wasserstoffperoxid mit Dampf (Kondensations-Verfahren)	36
2.7.6 Plasma-Entkeimung.....	36
2.7.7 Ionisierte Luft	37
2.7.8 Carbon-Strahler	37
2.7.9 UV-Strahler	37
2.7.10 Gesamtbetrachtung	38
2.8. Hygienisches Design	38
2.9. Prozessabsicherung	39
2.10. Untersuchungsmethoden für Aseptik u. UltraClean-Anlagen	40
2.10.1 VDMA- Fachverbandsschriften und DIN- bzw. EN-Normen	40

2.10.2	Validierungsmappen	40
2.10.3	VDI-Richtlinie 4066 (in Vorbereitung)	40
2.10.4	Keimreduktionstests (Count-Reduction-Tests)	41
2.10.5	Challengetest (Standtest)	42
2.10.6	Endpointtest.....	42
2.10.7	Innenraumdesinfektions-Effizienztest (Endpointtest).....	43
2.10.8	Spritzschattentest	43
2.10.9	ATP-Test.....	45
3.	Material und Methoden	46
3.1.	Testsequenz	46
3.2.	Nachweismedien für mikrobiologische Nachweise und Identifizierungen	47
3.3.	Bestimmung der Hitzeresistenz von Getränkeschädlingen	48
3.3.1	Mikroorganismen	48
3.3.2	Vorzucht.....	49
3.3.3	Eingesetzte Gerätschaften	50
3.3.4	Versuchsbeschreibung	50
3.3.5	Versuchsdurchführung.....	52
3.3.6	Hitzeresistenzberechnungen nach DIN EN ISO 11138-1 und REUTER	53
3.4.	Testmethode zur erzwungenen Sporulation von Hefen.....	55
3.5.	Testmethoden zur Parametrierung von Kurzzeiterhitzern und Pasteuren.....	56
3.6.	Retentionstest u. Spritzschattentest	57
3.7.	ATP-Test.....	57
3.8.	Optimierungen im Hygienic Design und in der Verfahrenstechnik	58
3.9.	Endpointtest - Überprüfung der Rehygienisierung im Reinraum	58
3.10.	Standtest / Challengetest.....	59
3.11.	Transportkontrollen.....	60
3.12.	Keimreduktionstest	60
3.13.	Medien zur Anreicherung und Validierung.....	60
3.14.	Inbetriebnahme- und Abnahmekriterien	62
3.15.	Statistische Auswertungen	62
4.	Ergebnisse und Diskussion – Teil 1: Thermische Inaktivierung	64
4.1.	Ermittlung der Hitzeresistenz von Getränkeschädlingen (Isolate)	64
4.1.1	Betrieb R und J – <i>Pichia anomala</i>	64

4.1.2	Ermittlung der Hitzeresistenz von <i>Pichia anomala</i> (Askosporen).....	66
4.1.3	Stimulationen zur Askosporenbildung von <i>Pichia anomala</i>	67
4.1.4	Betrieb W – <i>Saccharomyces diastaticus</i>	69
4.1.5	Betrieb E, D und C – <i>Alicyclobacillus sp.</i>	70
4.1.6	Schlussfolgerung.....	72
4.2.	Ermittlung der Hitzeresistenz von ausgesuchten Teststämmen.....	72
4.2.1	Überlebenskurven der ausgesuchten Labor-Teststämme.....	74
4.2.2	<i>Bacillus subtilis</i> (DSM 4181).....	74
4.2.3	<i>Lactobacillus brevis</i> var. <i>frigidus</i> (L 150).....	78
4.2.4	<i>Lactobacillus lindneri</i> (L 2).....	81
4.2.5	<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404).....	84
4.2.6	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> / Sporen (DSM 3922).....	87
4.2.7	<i>Pichia anomala</i> / Askosporen (P 27).....	90
4.2.8	<i>Saccharomyces diastaticus</i> / Askosporen (S 2).....	93
4.3.	Diskussion / Hitzeresistenzen und Überlebenskurven.....	96
5.	Ergebnisse und Diskussion – Teil 2: Funktionsfähige Kaltseptik.....	100
5.1.	Berechnungen und Parametrierungen zur Pasteurisation.....	100
5.1.1	KZE-Anlagen und Pasteure.....	100
5.1.2	Störeinflüsse zur Funktionalität.....	100
5.1.3	Auslegung von Pasteurisationsanlagen.....	106
5.1.4	Diskussion.....	110
5.2.	Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit von Keimreduktionstests (CRT).....	111
5.2.1	Transportkontrollen.....	111
5.2.2	Keimreduktionstests.....	115
5.2.3	Diskussion zum Keimreduktionstest.....	117
5.3.	Methoden zur Beurteilung der mikrobiologischen Verfahrenstechnik.....	119
5.3.1	Endpointtest zur Desinfektions- u. Sterilisationseffizienz im Reinraum.....	119
5.3.2	Retentionsstest / Spritzschattentest.....	122
5.3.3	Außenreinigung (Schaum/Gel/CIP-Medien).....	130
5.4.	Qualified Hygienic Design / Demonstration der Eignung des RET-Mediums.....	133
6.	Zusammenfassung und Schlussfolgerung.....	137
7.	Literatur.....	143
8.	Anhang.....	154
8.1.	Beispiel zur Berechnung der Hitzeresistenz (<i>Pichia anomala</i>).....	154
8.2.	Stochastische Sicherheit zum Probenumfang.....	159
8.3.	Mikrobiologischer Kontroll- und Probenahmeplan.....	160
8.4.	Benetzungstest für PET-Flaschen.....	164
	Lebenslauf.....	165

Abkürzungsverzeichnis

Lateinisches Alphabet

Bezeichnung		Einheit
A	Akzeptanzkriterium	
c	Konzentration	[%]
d	Rohrinnendurchmesser	
D	Destruktionswert	[s]
D _{65 °C} -Wert	Destruktionswert bei 65 °C	
E _a	Aktivierungsenergie	[J/mol]
F	Fließgeschwindigkeit	[m/s]
h	Stunde	
hl/h	Hektoliter pro Stunde	
k ₀	Geschwindigkeitskonstante	1/T → 0
m	Neigung einer geradlinigen Kurve / optimale Übereinstimmung	
n	Anzahl der Datenpunkte	[]
N ₀	Anfangskeimzahl	
N ₂	Stickstoff	
p	Druck (statisch)	[bar]
P	Zeichen für Wahrscheinlichkeitsmaß	
r ²	Korrelationskoeffizient	
R _a	Oberflächenrauigkeit	[µm]
R	Universelle Gaskonstante	[J/mol·K]
Re	Zeichen für Reynolds-Zahl (dimensionslos)	
s ²	Varianz	
T	Absolute Temperatur (Kelvin)	[K]
t	Temperatur (Celsius)	[°C]
T _{max}	Zeichen für Maximaltemperatur	[K]
T _{ref}	Zeichen für Referenztemperatur	[K]
% vol	Volumenprozent	
w	Strömungsgeschwindigkeit	[m/s]
Δp	Druckdifferenz	[bar]

Griechisches Alphabet

Bezeichnung		Einheit
Σ	Summe	
ν	Kinematische Viskosität	$\left[\frac{m^2}{s} \right]$

Zeichen und Formeln

Bezeichnung	
°dH	Deutsche Härtegrade
\bar{x}	Mittelwert
3A	Sanitary Standards Administration Council

Abkürzungen

a.a.R.d.T.	allgemein anerkannte Regeln der Technik
a.a.R.d.VT.	allgemein anerkannte Regeln der Verfahrenstechnik
Abb.	Abbildung
ABN	Abnahme einer Anlage
ACF	Aseptic Cool Filling
AfG	Alkoholfreie Getränke
AG	Aktiengesellschaft
AISI	American Iron and Steel Institute
AK	Ausgangskeimzahl
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-Triphosphat
AVM	Aseptik Validation Medium
a_w -Wert	Maß für das freie nicht gebundene Wasser in einem (Wasseraktivität)
BAM-Agar	Spezialmedium zum Nachweis von <i>Alicyclobacillus sp.</i>
$bar_{\bar{u}}$	Maßeinheit f. Überdruck
BAT-Agar	Trockennährboden zum Nachweis von <i>Alicyclobacillus sp.</i> in Fruchtsäften und anderen Getränken
BAT-Bouillon	Spezialmedium zum Nachweis von <i>Alicyclobacillus sp.</i>
CA	Codex Alimentarius
CAF	Cold Aseptic Filling
Caso-Agar	Komplexmedium zum Anzüchtung von Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen
Caso-Bouillon	Komplexmedium zum Anzüchtung von Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen
CCP	Kritischer Kontrollpunkt
CE	EU-Konformität zur Technischen Dokumentation
Challengetest	Standtest in der Aseptik, simuliert eine Störung (Inkubation)
CIP	Cleaning in Place
CIR	Carbon-Infrarot-Strahler
CMC	Carboxymethylcellulose
Cp-Wert	Qualitätsmaßstab zur Fehlerrate (capability process)

CR	Count-Reduction
CRT	Count-Reduction-Test (Keimreduktionstest)
D-Count	Messgerät zur Partikelzählung (Schnellmethode)
DEV	Gelatine-Agar (Nachweismedium für Gesamtkeimzahl n. TWVO)
DHV	Druckhalteventil
DIN	Deutsches Institut für Normung
DSM 3922	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>
DSM 4181	<i>Bacillus brasiliensis</i> (ehemals <i>B. subtilis</i>)
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DT	Drucktank
DT-300	Bezeichnung LCD-Handthermometer (Voltcraft)
EHEDG	European Hygienic Engineering & Design Group
EN	Europäische Norm
Endo	Endo-Agar (Nachweismedium für coliforme Keime)
EPDM	Ethylen-Propylen-Dien-Mischpolymerisat
Erythrit-Hefeextrakt-Lösung	Anreicherungsmedium für Hefevorzuchten
ESL	Extended Shelf Life (Milchqualität)
F0-Wert	Letaleffekt Inaktivierungsprozess in Minuten
Fa.	Firma
FDA	US Food & Drug Administration
FFU	Fine-Filter-Units
FKM	Fluor-Elastomere, Fluorkautschuk (z. B. Viton)
FMEA	Fehlermöglichkeits- und Einflussanalyse
FÜ	Füller
F-Wert	Abtötungseffekt in Minuten Referenztemperatur
GAU	Größter Anzunehmender Unfall (Simulation Challengetest)
Glucose-Pepton-Lösung	Anreicherungsmedium, u.a. für <i>Bacillus subtilis</i>
GMP	Good Manufacturing Practice
GP	Gussplatte
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
HDPE	High-Density-Polyethylen
HEPA	High-Efficiency-Particulate-Airfilter
HPC	Hydroxypropylcellulose
IBN	Inbetriebnahme einer Anlage
IDM	Induktive Durchfluss-Messer
IFS	International Food Standard
IFU	International Federation of Fruit Producers
ILMH	Institut für Lebensmittelhygiene Stroh
ISO	International Standard Organization

KBE	Koloniebildende Einheiten
KG	Kieselgur
KL	Klasse
KZE	Kurzzeiterhitzung
L 150	<i>Lactobacillus frigidus</i> (Stamm-Nr. der TU-München)
L 2	<i>Lactobacillus lindneri</i> (Stamm-Nr. der TU-München)
Lactat-Hefeextrakt-Lsg.	Anreicherungsmedium für Hefevorzuchten
LCD	Liquid Crystal Display (Flüssigkristallbildschirm)
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
L-Wert	Letalwert
MAK	Maximale Arbeitskonzentration
Malzextrakt-Agar	Spezialmedium zur Askosporeninduzierung
MID	Magnetisch-Induktiver Durchflussmesser
MF	Membranfiltration
MLK	mittlere logarithmische Keimreduktion
MRS-Agar	Nachweismedium für Hefen und Schimmelpilze
Natrium-Acetat-Agar	Spezialmedium zur Askosporeninduzierung
NBB-A	Nachweis von Bierschädlingen nach Back, Agar
NBB-B-AM	Nachweis von Bierschädlingen nach Back, Anreicherungsmedium
NBR	Handelsname von Nitril-Kautschuk
NKS	Nährkartonscheiben
OFS	Orangen-Fruchtsaft-Serum
OGW	Oberer Grenzwert
OSA	Orangen-Serum-Agar
O-Saft	Orangensaft
P 27	<i>Pichia anomala</i>
PCA	Plate-Count-Agar
PE	Pasteurisationseinheit
PC-Agar	Plate-Count-Agar zum Nachweis von <i>Bacillus subtilis</i>
PEN	Polyethylennaphthalat
PET	Polyethylenterephthalat
pH-Wert	Wasserstoff-Ionenkonzentration (pondus hydrogenii)
PI-Kurven	Grafische Darstellung der Messwerte u. Prozessparameter
PP	Polypropylen
ppm	Parts per Million
PS	Polystyrol
PTF	Puffertank (Filtrat)
PTFE	Polytetrafluorethylen
PTS	Puffertank (Steril)
PTU	Puffertank (Unfiltrat)
PVPP	Polyvinyl-Poly-Pyrrolidon
P-Wert	F-Wert mit speziell def. Referenztemperatur und z-Wert (PE)

QHD	Qualified Hygienic Design
Re	Zeichen für Reynolds-Zahl (dimensionslos)
RET	Retentionstest
RI	Rinser
RLU	Relative Light Units
RO	Reverse Osmosis (Umkehrosmoseanlage)
S 22	<i>Saccharomyces diastaticus</i> (Stamm-Nr. der TU-München)
SI	Silikon-Kautschuk
SIP	Sterilisation in Place
SO ₂	Schwefeldioxid
sp.	Spezies
SSL-Bouillon	Schneller Spurennachweis für Limonadenschädlinge
Std.	Stunde
Swaps	Abstrichbesteck (steril)
Swirl	Sterilbeutel
Thermische Firewall	Bezeichnung für die Funktionalität einer KZE-Anlage
TWVO	Trinkwasser-Verordnung
UG	unterer Grenzwert
UHT	Ultra-Hoch-Temperatur
ULPA	Ultra Low Penetration Air
UV	Ultra-Violett
UV-Anlage	Wasserentkeimungsanlage mittels UV-Strahler
VCM	Vogel-Complete-Medium (Agarversion)
VDI	Verein Deutscher Ingenieure
VDMA	Verband Deutscher Maschinen- und Anlagenbauer
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser (deionisiertes Wasser)
VLB	Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin
VS	Verschließler
VS-Elemente	Verschließerelemente
Würze-Agar	Universalmedium für Hefen und Schimmelpilze
YGC-Agar	Selektivagar (Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar)
YPD-Agar	Yeast-Extract-Peptone-Dextrose Nährmedium, für die Anzucht von Hefen wie <i>Sacch. cerevisiae</i> und anderen Hefen
YPD-Bouillon	Yeast-Extract-Peptone-Dextrose Nährmedium, für die Anzucht von Hefen wie <i>Sacch. cerevisiae</i> und anderen Hefen
ZHF	Zentrifugal-Hochleistungs-Filter (Eigennahme Fa. Schenk)
ZKL	Zylindronischer Tank
z-Wert	Temperatur in °C zur Keimreduktion um 1/10

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung D-Wert (Beispiel)	20
Abbildung 2: Darstellung z-Wert (Beispiel)	20
Abbildung 3: Temperatúrauswirkung auf Mikroorganismen	25
Abbildung 4: Keimreduktion (MLK) des Innenraums nach VDMA u. VDI 4066	43
Abbildung 5: Versuchsaufbau	51
Abbildung 6: Dezimale Verdünnung	52
Abbildung 7: Plattengussverfahren	53
Abbildung 8: Beispiele von für die Regressionsanalyse erfassten Daten	54
Abbildung 9: Beispiel zur Berechnung der Neigung	54
Abbildung 10: Überlebenskurve <i>Bacillus subtilis</i> in alkoholfreiem Bier	75
Abbildung 11: Überlebenskurve <i>Bacillus subtilis</i> in Eistee	75
Abbildung 12: Überlebenskurve <i>Bacillus subtilis</i> in Orangensaft	76
Abbildung 13: Überlebenskurve <i>Bacillus subtilis</i> in Ringerlösung	76
Abbildung 14: D_{80} und D_{90} -Werte von <i>Bacillus subtilis</i>	77
Abbildung 15: z-Werte von <i>Bacillus subtilis</i>	77
Abbildung 16: Überlebenskurve <i>Lactobacillus frigidus</i> in alkoholfreiem Bier	79
Abbildung 17: Überlebenskurve <i>Lactobacillus frigidus</i> in Eistee	79
Abbildung 18: Überlebenskurve <i>Lactobacillus frigidus</i> in Orangensaft	80
Abbildung 19: Überlebenskurve <i>Lactobacillus frigidus</i> in Ringerlösung	80
Abbildung 20: D_{62} und $D_{67,5}$ -Werte von <i>Lactobacillus brevis</i> var. <i>frigidus</i>	81
Abbildung 21: z-Werte von <i>Lactobacillus brevis</i> var. <i>frigidus</i>	81
Abbildung 22: Überlebenskurven von <i>Lactobacillus lindneri</i> in alkoholfreiem Bier	82
Abbildung 23: Überlebenskurven von <i>Lactobacillus lindneri</i> in Eistee	82
Abbildung 24: Überlebenskurven von <i>Lactobacillus lindneri</i> in Orangensaft	83
Abbildung 25: Überlebenskurven von <i>Lactobacillus lindneri</i> in Ringerlösung	83
Abbildung 26: D_{59} und D_{69} -Werte von <i>Lactobacillus lindneri</i>	84
Abbildung 27: z-Werte von <i>Lactobacillus lindneri</i>	84
Abbildung 28: Überlebenskurven von <i>Aspergillus niger</i> in alkoholfreiem Bier	85
Abbildung 29: Überlebenskurven von <i>Aspergillus niger</i> in Eistee	85
Abbildung 30: Überlebenskurven von <i>Aspergillus niger</i> in Orangensaft	86
Abbildung 31: Überlebenskurven von <i>Aspergillus niger</i> in Ringerlösung	86
Abbildung 32: D_{55} und D_{65} -Werte von <i>Aspergillus niger</i>	87
Abbildung 33: z-Werte von <i>Aspergillus niger</i>	87
Abbildung 34: Überlebenskurven von <i>Alicyclob. acidoterrestris</i> (Sporen) in alkoholfreiem Bier	88
Abbildung 35: Überlebenskurven von <i>Alicyclob. acidoterrestris</i> (Sporen) in Eistee	88
Abbildung 36: Überlebenskurven von <i>Alicyclob. acidoterrestris</i> (Sporen) in Orangensaft	89
Abbildung 37: Überlebenskurven von <i>Alicyclob. acidoterrestris</i> (Sporen) in Ringerlösung	89
Abbildung 38: D_{86} und D_{95} -Werte von <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> / Sporen	90
Abbildung 39: z-Werte von <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> / Sporen	90
Abbildung 40: Überlebenskurven von <i>Pichia anomala</i> (Askosporen) in alkoholfreiem Bier	91
Abbildung 41: Überlebenskurven von <i>Pichia anomala</i> (Askosporen) in Eistee	91
Abbildung 42: Überlebenskurven von <i>Pichia anomala</i> (Askosporen) in Orangensaft	92
Abbildung 43: Überlebenskurven von <i>Pichia anomala</i> (Askosporen) in Ringerlösung	92
Abbildung 44: D_{58} und D_{67} -Werte von <i>Pichia anomala</i> / Askosporen	93
Abbildung 45: z-Werte von <i>Pichia anomala</i> / Askosporen	93
Abbildung 46: Überlebenskurven von <i>Sacch. diastaticus</i> (Askosporen) in alkoholfreiem Bier	94
Abbildung 47: Überlebenskurven von <i>Sacch. diastaticus</i> (Askosporen) in Eistee	94
Abbildung 48: Überlebenskurven von <i>Sacch. diastaticus</i> (Askosporen) in Orangensaft	95
Abbildung 49: Überlebenskurven von <i>Sacch. diastaticus</i> (Askosporen) in Ringerlösung	95
Abbildung 50: D_{62} und $D_{67,5}$ -Werte von <i>Saccharomyces diastaticus</i> / Askosporen	96
Abbildung 51: z-Werte von <i>Saccharomyces diastaticus</i> / Askosporen	96
Abbildung 52: Filtration Betrieb "G"	101

Abbildung 53: Filtration Betrieb "W"	102
Abbildung 54: Aufzeichnung eines Filtrationsprotokolls aus Betrieb G	102
Abbildung 55: Aufzeichnung eines Filtrationsprotokolls aus Betrieb W	103
Abbildung 56: Abfüllung Kaltseptik Betrieb "R"	103
Abbildung 57: Aufzeichnung von Trübungswerten aus Betrieb R	104
Abbildung 58: Aufzeichnung von Messwerten aus Betrieb R.....	104
Abbildung 59: Transportkontrolle - Flaschen nach Höhe der Inokulationskeimzahl geordnet	112
Abbildung 60: Transportkontrolle - Flaschen nach den Labors geordnet.....	112
Abbildung 61: Transportkontrolle - Verschlüsse nach den Labors geordnet.....	113
Abbildung 62: Transportkontrolle - Flaschen/Becher/Verschlüsse nach Packmittel	114
Abbildung 63: Abweichung ermittelter Keimreduktionswerte aufgrund der Berechnungsart	116
Abbildung 64: Keimreduktionswert-Auswertung nach minimaler log. Keimreduktion (sortiert nach Seriennummern).....	116
Abbildung 65: Keimreduktionswert -Auswertung nach minimaler log. Keimreduktion (sortiert nach Labor bzw. Prüfstelle).....	117
Abbildung 66: Transportbehältnisse zum Endpointtest im Reinraum / Isolator	120
Abbildung 67: Befestigungsvarianten zum Endpointtest im Reinraum / Isolator	120
Abbildung 68: Aufbringung des Mediums zum Retentionstest.....	123
Abbildung 69: Retentionstest auf Spritzschatten.....	128
Abbildung 70: Retentionstest auf konstruktive Mängel	128
Abbildung 71: Verschleißerelemente / alte und neue Konstruktion.....	134
Abbildung 72: Flaschenerkennungssonden / alte und neue Konstruktion	134
Abbildung 73: Spritzschatten im Bereich der Füllventile / Lösung Zielstrahlreiniger	135
Abbildung 74: Spritzschatten an den Kabeldurchbrüchen / Lösung Zielstrahl	135
Abbildung 75: Spritzkugeln verschweißt (Mangel) / Düsen rotierend (QHD)	136
Abbildung 76: Mangelndes Hygienische Design im Bereich Füllventile.....	136

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersichtstabelle der Kenngrößen zur Reaktionskinetik.....	24
Tabelle 2: Hitzeresistenz verschiedener Mikroorganismen (1)	28
Tabelle 3: Hitzeresistenz verschiedener Mikroorganismen (2)	29
Tabelle 4: Entwicklung der Lösungen und Pasten für den Spritzschattentest	45
Tabelle 5: Mikroorganismen "Isolate".....	48
Tabelle 6: Mikroorganismen "Testkeime".....	49
Tabelle 7: Zertifikat für eingesetztes Edelstahlblech (Endpointtest).....	61
Tabelle 8: Identifizierung von <i>Pichia anomala</i> (VLB-Berlin 02)	64
Tabelle 9: Identifizierung von <i>Pichia anomala</i> (VLB-Berlin 02)	65
Tabelle 10: Identifizierung von <i>Pichia anomala</i> (Institut Romeis).....	65
Tabelle 11: Identifizierung von <i>Pichia anomala</i> (TUM-WZW)	65
Tabelle 12: Ermittlung z-Wert von <i>Pichia anomala</i> im Eistee (R-01)	66
Tabelle 13: Ermittlung z-Wert von <i>Pichia anomala</i> in Ringerlösung (R-02)	66
Tabelle 14: Ermittlung z-Wert von <i>Pichia anomala</i> im Eistee (R-03)	66
Tabelle 15: Ermittlung z-Wert von <i>Pichia anomala</i> im Eistee (J-04)	67
Tabelle 16: Sporulation von <i>P. anomala</i> durch Zellgifte Teein und Koffein.....	68
Tabelle 17: Sporulation von <i>P. anomala</i> durch Dehydratisierung	68
Tabelle 18: Taxonomierung von <i>Saccharomyces diastaticus</i>	69
Tabelle 19: Identifizierung von <i>Alicyclobacillus sp.</i> (01)	70
Tabelle 20: Identifizierung von <i>Alicyclobacillus sp.</i> (02)	71
Tabelle 21: Identifizierung von <i>Alicyclobacillus sp.</i> (03)	71
Tabelle 22: Lokalisierung von <i>Alicyclobacillus sp.</i> (01)	71
Tabelle 23: Auflistung ermittelter Regressionen D- und z-Werte (1).....	73
Tabelle 24: Auflistung ermittelter Regressionen D- und z-Werte (2).....	73
Tabelle 25: Mikrobiologische Ergebnisse zum KZE-Durchbruch Betrieb G (1).....	105
Tabelle 26: Mikrobiologische Ergebnisse zum KZE-Durchbruch Betrieb G (2).....	106
Tabelle 27: Berechnung PE-Werte aus D- u. z-Werten für Keimvorbelastung	108
Tabelle 28: Spezifische Pasteurisationseinheiten für eine KZE-Anlage.....	109
Tabelle 29: Übersicht zur Auswertung der Transportkontrollen	114
Tabelle 30: Endpointtest – Mikrobiologische Überprüfung der inokulierten Aluminiumstreifen	121
Tabelle 31: Endpointtest – Mikrobiologische Überprüfung der inokulierten Edelstahlstreifen	121
Tabelle 32: Vergleichsuntersuchungen der RET-Lösung zur Zuckerlösung	124
Tabelle 33: Prüfung einer 2,0 %-igen Retentionstest-Lösung auf mikrobiologische Inertheit 1	125
Tabelle 34: Prüfung einer 2,0 %-igen Retentionstest-Lösung auf mikrobiologische Inertheit 2	126
Tabelle 35: Prüfung einer 2,0 %-igen Retentionstest-Lösung auf mikrobiologische Inertheit 3	127
Tabelle 36: Auswertung Reinigungseffizienztest.....	129
Tabelle 37: Demonstration - Vergleich ATP-Messungen / Abstrichproben / RET-Medium 1	131
Tabelle 38: Demonstration - Vergleich ATP-Messungen / Abstrichproben / RET-Medium 2	132

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Die hohen Anforderungen der Konsumenten an die Qualität von Getränken sowie der steigende Wettbewerb üben zunehmend Druck auf die Abfüllbetriebe und deren Zulieferer aus. Das Resultat ist ein kontinuierlicher Verbesserungsprozess aller Verfahren und Faktoren, welche die Beschaffenheit eines Produktes bzw. Getränks beeinflussen. Dazu zählen nicht nur die Güte der Rohstoffe sowie deren Verarbeitung, sondern auch die Abfüllung des fertigen Getränks bzw. Produktes. Aus diesem Grund spielt gerade im Bereich der Prozesstechnik bei der Getränkeabfüllung die Produktqualität eine wichtige Rolle.

Aseptikanlagen und UltraClean-Anlagen sind Anlagen zur Abfüllung und Verpackung mikrobiologisch empfindlicher Produkte, ohne den Zusatz von sonst üblicher Kaltentkeimungsmittel und Konservierungsmittel. Auch eine Heißabfüllung bzw. Pasteurisation der abgefüllten Gebinde ist mit dieser Verfahrenstechnik nicht mehr nötig. In den VDMA-Fachverbandsschriften für "Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen" zum Thema "Aseptische und keimarme Abfüllmaschinen für die Nahrungsmittelindustrie" sind diese definiert und beschrieben [1]. Um den Anforderungen der Anwender von Anlagen und letztendlich dem Endverbraucher gerecht zu werden, ist daher eine Forcierung der Forschung und Entwicklung durch Versuche an Anlagen in der Praxis unerlässlich. Diese Versuche dienen zur Erforschung von neuartigen Desinfektions- und Reinigungsmitteln, dem angepassten Flaschendesign, optimiertem Medieneinsatz, der Sterilisationsverfahren und der mikrobiologischen Verfahrenstechnik sowie der Sicherstellung einer kommerziellen Sterilität der abzufüllenden Produkte.

Ein wesentlicher Teil der vorliegenden Arbeit besteht daher in der Untersuchung, Entwicklung und Bewertung

- des mikrobiologischen Wirkungsgrades und der Entkeimungseffizienz
- der Reinigungseffektivität und Rehygienisierungseffizienz
- der Hitzeresistenz und Inaktivierungseigenschaften von Getränkeschädlingen
- der Entwicklung von Untersuchungsmethoden zur Prozessabsicherung sowie
- die Entwicklung eines Mediums zur Überprüfung der äußeren Hygiene.

Insbesondere die Möglichkeit Joghurt, Molke und Milchinhaltsstoffe mit Fruchtsaft sowie auch Soja und Frucht, Schorlen, Biermix-, Wellness-, Sport-, Aqua-Plus-Getränke sowie aromatisierte Wässer abzufüllen, zwingen zu höheren hygienischen Anforderungen an entsprechend konzipierte Anlagen. Auch für Bier und Biermischgetränke sind die

Grundgedanken, Überlegungen und Konstruktionsmerkmale einer kaltseptischen bzw. UltraClean-Abfüllung interessant. Für deren Einsatz können sowohl qualitative Gründe wie auch Aspekte zu Einsparpotentialen hinsichtlich der Substitution eines Tunnelpasteurs für Flaschen oder Dosen bzw. einer Heißabfüllung sprechen [2, 3]. Des Weiteren wird dem Ernährungswert von unpasteurisierten Produkten, frei von chemischen Konservierungsmitteln eine immer höhere Bedeutung beigemessen. Dies gilt insbesondere in asiatischen Ländern, wenn ein thermisch behandeltes Lebensmittel nicht akzeptiert wird. Die kaltseptische Abfüllung setzt eine separate Entkeimung des Produktes, der Flaschen, Becher bzw. Weichkartonverpackungen sowie der Verschlüsse voraus. Es bedarf demzufolge einer darauf abgestimmten Technologie und Verfahrenstechnik mit dem entsprechenden Prozessing und Hygienemanagement. Des Weiteren steigen die mikrobiologisch und hygienisch bedingten Sicherheitsanforderungen für die kommerzielle Sterilisation der Produkte mittels Kurzzeiterhitzungsanlagen und an das Hygienische Design der Abfüllanlagen [4].

Nur unter diesen Voraussetzungen können die hohen Sicherheitsansprüche und die geforderten Entkeimungsraten bezüglich Mikrobiologie, Hygiene und Aseptik umgesetzt werden. Die Intensität der thermischen Beaufschlagung zur Pasteurisation bzw. Kurzzeiterhitzung der verschiedensten Getränke muss deren Funktion als sog. "Thermische Firewall" sicherstellen. Dieser Ausdruck ist eine Bezeichnung für die Funktionalität einer KZE- oder UHT-Anlage bzw. eines Pasteurs. Hierzu sind Kenntnisse der spezifischen Hitzeresistenzen der vorliegenden getränkeschädlichen Mikroorganismen, demnach deren D- und z-Werte, erforderlich. Speziell bei den getränkeschädlichen Sporenbildnern, wie *Alicyclobacillus sp.*, sowie bei den Askosporen bildenden Hefen sind aus der Literatur nur spärliche bzw. wenig verlässliche Daten der Inaktivierungseigenschaften zu finden. Die eingestellten Pasteurisationseinheiten sind aus diesem Grunde meist zu niedrig und bilden somit eine mikrobiologische Schwachstelle in der Verfahrenstechnik und ein hohes Abfüllrisiko. In dieser Arbeit wurde die Hitzeresistenz typischer Getränkeschädlinge in unterschiedlichen Medien untersucht, um eindeutige Parametrierhilfen und eine neuartige Basis für die Pasteurisation aufzustellen.

Kontrollkriterien zur Beurteilung der Funktionsfähigkeit von Aseptik- und UltraClean-Anlagen sind somit wesentliche Bestandteile der Abfülltechnologie und stellen die Grundlage für einen abgesicherten Abfüllprozess ohne Kaltkonservierungsmittel bzw. Heißabfüllung dar. Dies betrifft sowohl die Phase der Inbetriebnahme als auch die spätere Leistungsabnahme einer Abfüllanlage. Diese umfasst auch die Routineüberwachung im Rahmen der Betriebskontrolle bzw. des Eigenkontrollsystems und die Wiederaufnahme des Betriebs nach

Instandhaltungsarbeiten, Umbauten, Reparatur- und Optimierungsmaßnahmen im Prozessing und im Hygienemanagement. Ein vereinheitlichtes Schema zur Vorgehensweise der jeweiligen Schritte existiert nicht. Somit ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit, eindeutige und wissenschaftlich abgesicherte Kriterien für die Prozessabsicherung und Validierung in der Praxis zu entwickeln. Im Speziellen wurde daher u. a. auch ein von getränkeschädlichen Mikroorganismen nicht verwertbares, universelles Test-Medium entwickelt, welches zur Durchführung von Spritzschatten- bzw. Retentionstests herangezogen werden kann. Des Weiteren wurde der bestehende, in der Praxis angewandte Endpointtest [5], der zur Überprüfung der Sterilisationseffizienz für Reinräume und Isolatorbereiche eingesetzt wird, auf den Anwendungsbereich der Reinigungseffizienz von CIP-Medien, Haftsäumen und Gelen für Maschinenoberflächen und Innenräume angepasst und entsprechend weiterentwickelt. Seitens des VDMA liegen einige Überprüfungsmodalitäten und Vorgaben für UltraClean- und Aseptikanlagen vor [6]. Individuelle Abnahmekriterien werden auch von den Maschinenlieferanten vorgegeben; diese sind jedoch nicht als neutral anzusehen [7, 8].

Die mittlere logarithmische Keimreduktion wird in der Praxis vertragsbedingt als Entscheidungskriterium für Abnahmen herangezogen. In der Durchführung, Auswertung und Interpretation der Keimreduktionstests liegen jedoch unterschiedliche Auffassungen zwischen Lieferanten und Betreibern vor. Die Ursachen liegen in den Ungenauigkeiten bei den Bestimmungen und sind der eigentliche Grund für diese Problematik. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit umfangreiche statistische Auswertungen erstellt, um eine kritische Betrachtung der Transportkontrollen und Keimreduktionstests vornehmen zu können. Als Transportkontrollen werden die Vergleichsverpackungen bezeichnet, die zwar mit den Teststämmen inokuliert, nicht jedoch den Entkeimungsprozess durchlaufen haben. Diese dienen dann den Bestimmungen zur Ausgangskeimzahl in den Berechnungen zur Keimreduktion. Mit diesen Ergebnissen sind praxisrelevante bzw. aussagekräftige Fehlertoleranzen zu ermitteln. Hinsichtlich der Modalitäten zur Inbetriebnahme und Abnahme bzw. Validierung von UltraClean-Anlagen und kaltseptischen Abfüllanlagen gibt es keine verbindlichen Regularien. In der Praxis folgt man meist den Empfehlungen der Anlagenbauer, die individuell auf die jeweilige Abfüllanlage abgestimmt sind.

Es besteht dringender Handlungsbedarf zur Erstellung eines umfangreichen und für den Betreiber und Anlagenlieferanten orientierenden Kataloges bzw. einer Checkliste zur Inbetriebnahme und Abnahme der Abfüllanlagen für mikrobiologisch empfindliche Getränke. Ein ebenso wichtiges Ziel dieser Arbeit ist es daher, geeignete Kontroll- und Überwachungskriterien zur Beurteilung der Funktionsfähigkeit von UltraClean-Anlagen und

aseptischen Abfüllanlagen zu erarbeiten, um damit eine für das jeweilige Produkt individuell abgesicherte Abfüllung zu gewährleisten.

Zur Übersicht seien die Ziele der Arbeit nochmals zusammengefasst:

- Erstmalige Untersuchungen zur Hitzeresistenz typischer Getränkeschädlinge in unterschiedlichen flüssigen Medien durch die Ermittlung der spezifischen D- und z-Werte und der Überlebenskurven.
- Erstmalige Untersuchungen zum Stressverhalten von *Pichia anomala* und den Auslösefaktoren zur spontanen Sporulation als Askospore.
- Darstellung der Keimvorbelastung, um eindeutige Parametrierhilfen zur Pasteurisation aufzustellen. Bisher sind derartige Werte nur auf die thermische Desinfektion bezogen in der Literatur zu finden.
- Erstellung von Pasteurisationsbedingungen auf Basis der neuen Erkenntnisse zu den Inaktivierungseigenschaften bzw. Hitzeresistenzen der untersuchten Getränkeschädlinge
- Ausarbeitungen von wissenschaftlich fundierten Kontroll- und Abnahmekriterien sowie Prozessabsicherungen für die Praxis.
- Entwicklung eines von Getränkeschädlingen nicht verwertbaren Mediums zur Durchführung von Retentionstests bzw. Spritzschattentests, welches in der Form bisher nicht verfügbar ist.
- Anpassung und Weiterentwicklung des in der Praxis angewandten Endpointtests zur Überprüfung der Sterilisation, auf die Überprüfung der Reinigungseffizienz an Maschinenoberflächen für CIP-Medien, Haftsäumen und Gelen.
- Statistische Auswertungen zur kritischen Betrachtung der Transportkontrollen und Keimreduktionstests, um praxisrelevante bzw. aussagekräftige Fehlertoleranzen aufzustellen, die bisher für Praxisanlagen ungenügend oder gar nicht zur Verfügung standen.
- Entwicklung und Ausarbeitung konstruktiver Vorschläge zum hygienischen Design, die in dieser Form noch nicht vorliegen.

2. Grundlagen und Kenntnisstand

2.1. Spezielle Probleme bei hitzeresistenten Keimen

2.1.1 Historie

Ursprünglich wurde die thermische Haltbarmachung nach empirisch gewonnenen Daten durchgeführt. Erst durch die Arbeiten von PASTEUR wurde 1863 einwandfrei wissenschaftlich bewiesen, dass am Verderb von Lebensmitteln in erster Linie Mikroorganismen beteiligt sind und diese durch Hitze abgetötet werden können [9]. Man ist damals davon ausgegangen, dass die Mikroorganismen durch entsprechend hohe Temperaturen schlagartig absterben. Durch die Arbeiten von BIGELOW (1921) und BALL (1923) und anderen wurde ein bestimmter Absterbeverlauf entdeckt, der schließlich zu einer Beschreibung des mathematischen Verlaufs der Absterbeordnung führte [10].

2.1.2 Reaktionskinetische Grundlagen der Abtötungskinetik

Üblicherweise gilt, dass der Prozess der Keimreduktion mit einer reaktionskinetischen Funktion erster Ordnung beschrieben wird und demnach eine Funktion der Temperatur und Zeit ist [11-16].

$$(1) \quad N(t) = N_0 \exp[-k_t t]$$

Die Temperaturabhängigkeit der Reaktionskonstanten k beschreibt man über einen Arrhenius-Ansatz mit der Aktivierungsenergie E_a .

$$(2) \quad k = k_0 \exp\left[-\frac{E_a}{RT}\right]$$

Damit ergibt sich der Dezimalreduktionswert (D-Wert), definiert durch die erforderliche Zeit, um die Zahl der Mikroorganismen auf ein Zehntel abzusinken, der ebenfalls temperaturabhängig ist.

$$(3) \quad D = \frac{\ln 10}{k}$$

$$(4) \quad D = \frac{\ln 10}{k_0} \exp\left[\frac{E_a}{RT}\right]$$

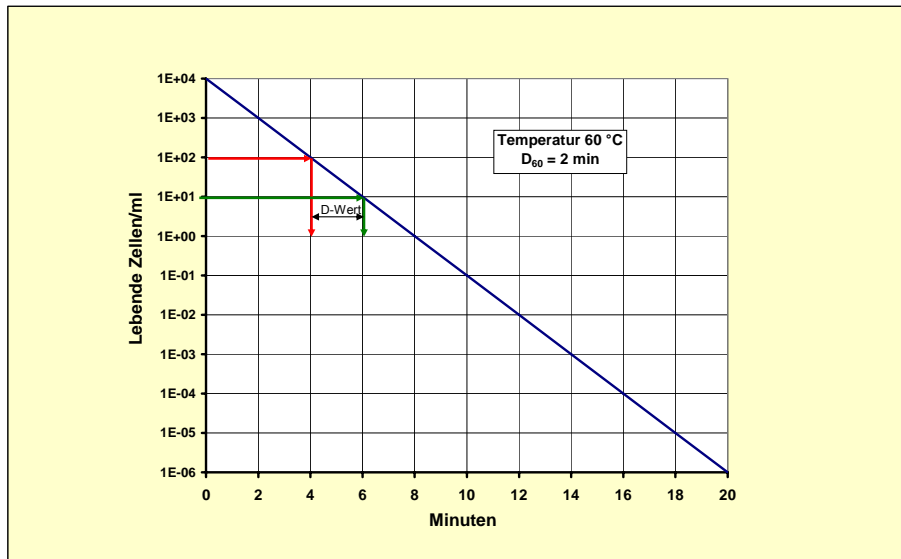


Abbildung 1: Darstellung D-Wert (Beispiel)

Die Temperatur, um den D-Wert auf ein Zehntel zu reduzieren, der z-Wert, lässt sich nach diesem Ansatz ebenfalls berechnen.

$$(5) \quad z = \frac{T_1^2 \frac{R}{E_a} \ln 10}{1 - T_1 \frac{R}{E_a} \ln 10}$$

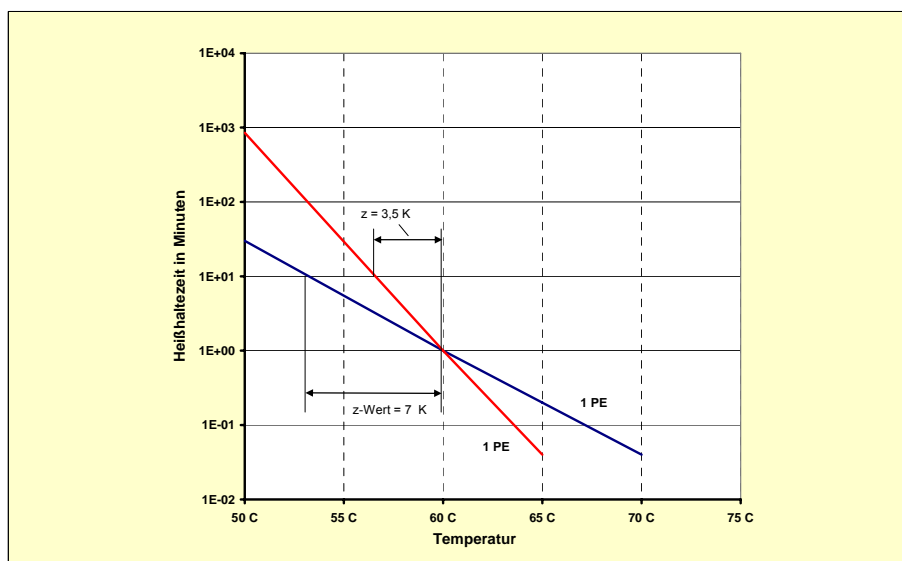


Abbildung 2: Darstellung z-Wert (Beispiel)

D	= Destruktionswert
E_a	= Aktivierungsenergie [J/mol]
k_0	= Geschwindigkeitskonstante für $[1/T \rightarrow 0]$
k_t	= Reaktionskonstante
N_0	= Anfangskeimzahl
R	= universelle Gaskonstante
T	= absolute Temperatur [K]
T_1	= Anwendungstemperatur [K]
z	= Temperatur in °C zur Keimreduktion um 1/10

Danach ist der z-Wert streng genommen keine Konstante, sondern ebenfalls von der Ausgangstemperatur abhängig. Allerdings ist diese Abhängigkeit nicht sehr stark ausgeprägt, so dass man über größere Temperaturbereiche z als konstant annehmen kann [17-19].

2.1.3 Kennwerte zur Hitzeresistenz

Der D-Wert, die Zeit, die benötigt wird, um bei definierten Temperaturen die Keimzahl um eine Zehnerpotenz zu reduzieren, stellt demnach die Steigung der Überlebenskurve (vgl. Abbildung 1) dar und kann, wie auch der z-Wert, wie folgt dargestellt werden [17-19]:

$$(1) \quad D = -\frac{1}{t} \log \left(\frac{N}{N_0} \right)$$

$$(2) \quad z = \frac{T_1 - T_2}{\log D_2 - \log D_1}$$

Der z-Wert, die erforderliche Temperaturerhöhung, den D-Wert um eine Zehnerpotenz zu reduzieren, entspricht damit der Steigung der logarithmisch aufgetragenen D-Werte gegen die Temperatur [20].

Um die Hitzeresistenz der Mikroorganismen besser vergleichen zu können, rechnet man die ermittelten D-Werte mit Hilfe des z-Wertes in den einheitlichen F-Wert auf die Referenztemperatur 121 °C bzw. 394,15 K um. Dieser weist demnach die Anzahl der Minuten auf, die bei der konstanten Referenztemperatur von 121 °C denselben Abtötungseffekt ergeben und stellt die Integration definierter Letalwerte (L-Werte) dar [21]. Der erforderliche F-Wert für eine definierte Keimabtötung bei der thermischen

Inaktivierung wird aus den ermittelten D-Werten und der vorliegenden Keimbelastung berechnet.

$$(3) \quad F = D_{(T)} \lg \frac{n_0}{n}$$

Somit lassen sich die Werte wie folgt ineinander umrechnen:

$$(4) \quad D_{(T)} = F \cdot 10^{\frac{T_{ref} - T}{z}}$$

Somit ist der D – 121 °C-Wert gleich dem F-Wert [17]. Wenn man die kurzen Phasen von Aufheizzeit und Abkühlzeit vernachlässigt, kann die Temperatur über die Zeit als konstant angesetzt werden. Der F-Wert berechnet sich dann vereinfacht wie folgt:

$$(5) \quad F = 10^{\frac{T_1 - T_R}{z}} \cdot t$$

In der Getränkeindustrie wird jedoch meist mit den sog. Pasteureinheiten operiert, die nach SCHNEIDER ein Maß für die kumulierten Letalwerte darstellen und somit die angewandte thermische Dosierung bei einer Hitzebehandlung quantifizieren [22]. Der sog. P-Wert, ausgedrückt in Pasteureinheiten, stellt demnach einen F-Wert mit speziell definierter Referenztemperatur und z-Wert dar. Die Dimension des P-Wertes ist somit an sich als eine Zeiteinheit definiert, wird jedoch entsprechend der Referenztemperatur und des z-Wertes in Pasteureinheiten (PE) ausgedrückt [22] [23].

Lt. ROESICKE [11-16] wurde als Maßeinheit für die Pasteureinheiten die Einwirkungsdauer von 1 Minute bei den Bezugstemperaturen 60°C bzw. 80°C gewählt.

$$(6) \quad \lg \frac{D_{T_{ref}}}{D_T} = z(T - T_0)$$

Die entlogarithmierte Gleichung von ROESICKE [11], die das Verhältnis von Abtötungszeit zur Temperatur beschreibt, wurde wie folgt dargestellt:

$$(7) \quad D_{T_0} = D_T \cdot 10^{z(T - T_0)}$$

Empirisch wurde von ROESICKE [11] an verschiedenen Keimen festgestellt, dass zwischen 60 °C und 90 °C die Keimzahl einer Temperaturerhöhung um 7 °C und sonst gleichen Bedingungen um den Faktor 10 sinkt.

Da der z-Wert mit 7 °C bei der Bezugstemperatur von 60 °C ermittelt wurde, besteht folgender Zusammenhang:

da $z = \frac{1}{7}$ und $\sqrt[7]{10} = 1,393$ sowie $T_0 = 60 \text{ °C}$

kann lt. ROESICKE [11-16] auch geschrieben werden:

$$(8) \quad D_{60} = D_T \cdot 1,393^{\left(\frac{T}{\text{°C}} - 60\right)}$$

Definitionsgemäß zählt die Einwirkungszeit bei 60 °C die Pasteurisationseinheiten in Minuten, so dass die rechte Seite der Formel von (8) den Ausdruck für die in der Getränkeindustrie verwendete PE für Bier und Wein darstellt [24, 25]:

$$(9) \quad PE = t \cdot 1,393^{\left(\frac{T}{\text{°C}} - 60\right)}$$

Für die Fruchtsaftindustrie wird als Temperaturbasis 80 °C verwendet, so dass diese Berechnungen mit nachstehender Formel vorgenommen werden [24, 25]:

$$(10) \quad PE = t \cdot 1,2589^{\left(\frac{T}{\text{°C}} - 80\right)}$$

- D = Destruktionswert
- F = F-Wert [min]
- N = Keimzahl
- N_0 = Anfangskeimzahl
- PE = Pasteurisationseinheiten
- T = Behandlungstemperatur [K]
- t = Zeit [min]

t_{60}	= Referenzzeit bei 60 °C[min]
T_1	= Inaktivierungstemperatur 1 [K]
T_2	= Inaktivierungstemperatur 2 [K]
T_{ref}	= Referenztemperatur [K]
z	= Temperatur in °C zur Keimreduktion um 1/10

Nachstehend sind zur besseren Übersicht die Zusammenhänge und Definitionen der Kennwerte zur Hitzeresistenz nochmals dargestellt.

Tabelle 1: Übersichtstabelle der Kenngrößen zur Reaktionskinetik

D	Destruktionswert	$D = -\frac{1}{t} \log \left(\frac{N}{N_0} \right)$	Zeit zur Keimreduktion um 10^1
z	z-Wert	$z = \frac{T_1 - T_2}{\log D_2 - \log D_1}$	Temperaturerhöhung des D-Werts zur Keimreduktion um 10^1
F	F-Wert	$F = n \cdot D$	Anzahl der Minuten, die denselben Abtötungseffekt bei der konstanten Referenztemperatur 121,1 °C bewirkt.
D_{60}	D_{60} -Wert	$D_{60} = D_T \cdot 1,393^{\left(\frac{T}{^\circ\text{C}} - 60\right)}$	Zeit zur Keimreduktion um 10^1 bei 60°C
PE	Pasteurisationseinheit	$PE = t \cdot 1,393^{\left(\frac{T}{^\circ\text{C}} - 60\right)}$	Berechnungsbasis 60°C
PE	Pasteurisationseinheit	$PE = t \cdot 1,2589^{\left(\frac{T}{^\circ\text{C}} - 80\right)}$	Berechnungsbasis 80°C

2.1.3.1 Temperatureinwirkung auf Mikroorganismen

Die Temperatur kann sich auf zwei unterschiedliche Weisen auf die Mikroorganismen auswirken. Jenseits einer Mindesttemperatur laufen mit steigender Temperatur chemische und enzymatische Reaktionen in der Zelle mit größerer Geschwindigkeit ab und die Zellen wachsen schneller. Oberhalb einer bestimmten Temperatur (letale Temperatur) können jedoch Proteine irreversibel geschädigt werden. Somit nehmen Wachstum und Stoffwechselfunktion innerhalb eines Bereichs mit der Temperaturerhöhung zu, bis dann ab einem Punkt Inaktivierungsreaktionen einsetzen. Jenseits dieses Punktes fallen sämtliche Zellfunktionen schnell aus. Somit gibt es für jeden Mikroorganismus ein Temperatur-Minimum, unter dem er nicht wächst, ein Temperatur-Optimum, bei dem die

Zelle am schnellsten wächst und ein Temperatur-Maximum, über das hinaus die Zelle abgetötet wird.

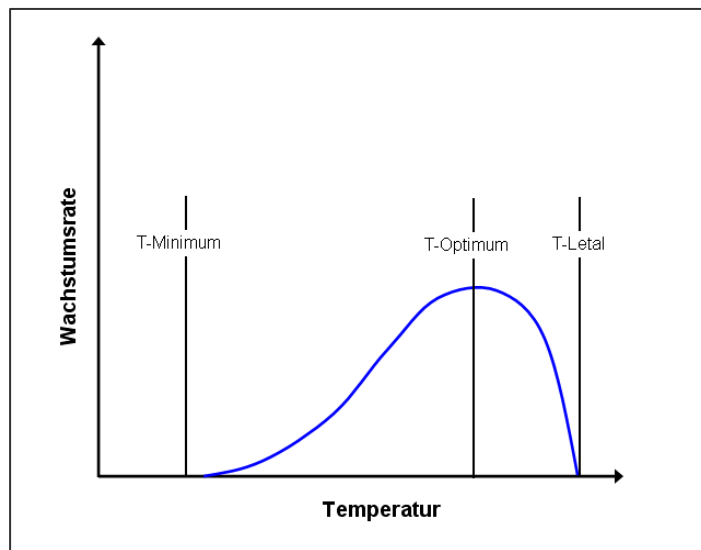


Abbildung 3: Temperaturschwankung auf Mikroorganismen

Diese Temperaturen sind für jede Mikroorganismenart charakteristisch, aber nicht völlig festgelegt, da sie durch andere Umwelteinflüsse, insbesondere durch die Zusammensetzung des Mediums, modifiziert werden können. Allgemein liegen die Temperaturmaxima in einem komplexen Medium höher als in einer definierten Lösung, z.B. Ringerlösung [26].

2.1.3.2 Sterilisation von Produkten

In der DIN EN ISO 11138-1 Teil 1: Sterilisation von Produkten für die Gesundheitsfürsorge - Biologische Indikatoren - werden u. a. die Verfahren und Berechnungen zur Bestimmung der D- Werte exakt vorgegeben [27]. Für die Bestimmung der z-Werte wird auf die Berechnungsgrundlage von REUTER zurückgegriffen [28-30].

2.2. Ausbildung von Hitzeresistenzen

Die Thermische Inaktivierung von Mikroorganismen gilt nach wie vor als favorisierte Methode zur Implementierung einer "Getränke- bzw. Produktsterilität" zur Sicherstellung einer definierten mikrobiologischen Haltbarkeit [24, 25]. Die Abtötung der vegetativen Zellen von Bakterien und Hefen erfolgt bereits bei 60 °C innerhalb weniger Minuten. Askosporen und Schimmelpilzsporen werden jedoch erst bei Temperaturen von über 70 °C (typisch 5 bis 10 Minuten) und Bakteriensporen oberhalb von 120 °C (typisch 15 Minuten) sicher abgetötet [16]. Die Abtötungseffizienz ist demnach abhängig von der

Art des Mikroorganismus, der Einwirkungstemperatur, der Einwirkungszeit sowie der Keimvorbelastung. Des Weiteren haben die Art des Getränkes, der pH-Wert sowie gewisse Schutzkolloide einen Einfluss auf den gewünschten Abtötungserfolg. Diese Gesetzmäßigkeiten werden jedoch oft nicht berücksichtigt, wenn neue Getränkesorten kreiert und deren Produktion und Vermarktung aufgenommen werden [31]. Die eigentliche Durchführung zur Bestimmung der D- und z-Werte ist in der DIN EN ISO 11138-1 beschrieben [27]. In der Literatur finden sich jedoch nur spärliche Hinweise auf die Hitzeempfindlichkeit von Getränkeschädlingen [32-34] [12, 35, 36]. Die bekannten D- u. z-Werte sind zur besseren Übersicht in tabellarischer Form zusammengestellt worden (vgl. Tabelle 2 u. Tabelle 3).

Einflüsse auf die Abtötungskinetik bestehen dahingehend, dass trübe, pastöse, pulpen- bzw. faserhaltige Produkte Schutzhüllen induzieren, welche die letale thermische Dosis beeinflussen [37].

Dieses Phänomen ist u. a. aus der Pasteurisation von Weißbier und naturtrüben Fruchtsäften bekannt, da u.a. für naturtrübe Getränke höhere Pasteurisationseinheiten angesetzt werden müssen als für filtrierte Produkte [24]. Des Weiteren bestehen, wie bereits erwähnt, deutliche Unterschiede in der Hitzeempfindlichkeit von vegetativen Zellen und von Askosporen bzw. Bakteriosporen. Hier empfiehlt sich daher die Durchführung eines Hitzeresistenz-Tests der identifizierten Mikroorganismen, um die D- und z-Werte der Kontaminationskeime zu ermitteln. Dies kann jedoch nur stets mit einer Wachstumsform erfolgen; respektive entweder in der vegetativen Form oder in der sexuellen Form (z.B. Askosporen).

2.3. Einfluss verschiedener Produktparameter auf die Hitzeresistenz von Mikroorganismen

Kohlenhydrate

Die Anwesenheit von Zucker und Stärke in dem Medium, in welches die Mikroorganismen inkubiert wurden, bewirkt einen Anstieg der Hitzeresistenz. Dieser Effekt ist teilweise durch die abnehmende Wasseraktivität bei hohen Zuckerkonzentrationen bedingt. Allerdings variiert die Hitzeresistenz bei gleicher Wasseraktivität und unterschiedlichen Kohlenhydraten stark. Auch der Alkoholgehalt hat einen großen Einfluss auf die Hitzeempfindlichkeit, z.B. bei den schädlichen Lactobazillen, da die Hitzeresistenz bei höheren Alkoholkonzentrationen abnimmt [18].

pH-Wert

Mikroorganismen sind am hitzeresistentesten bei ihrem pH-Optimum, das bei Hefen im Bereich zwischen pH 4,0 und 6,0 liegt [25, 34]. Bei den getränkeschädlichen Bakterien liegt dieses in der Regel bei ca. pH 7,0 [25]. Mit zunehmender Abweichung von diesem Wert steigt die Hitzeempfindlichkeit stetig an. Bei niedrigeren pH-Werten wirkt sich die Hitzebehandlung schädigender auf die Mikroorganismen aus [18].

Wasseraktivität (a_w -Wert)

Die Wasseraktivität (auch a_w -Wert) ist ein Maß für frei verfügbares Wasser in festen und flüssigen Materialien. Sie ist definiert als der Quotient des Wasserdampfdrucks über einem Material (p) zu dem Wasserdampfdruck über reinem Wasser (p_0) bei einer bestimmten Temperatur. Lt. BROWN ist der a_w -Wert ein wichtiges Maß bezüglich der Haltbarkeit von Lebensmitteln und beeinflusst bei Mangel an freiem Wasser die Wachstumsprozesse von, an Wasser adaptierte Mikroorganismen, indem dieser Prozess verlangsamt wird.

Empfindliche Organismen können gar abgetötet werden, xerophile Organismen hingegen sollen bei sinkendem Wassergehalt besser wachsen [38]. Das Wachstumsoptimum liegt bei den meisten Mikroorganismen bei einem a_w -Wert von 0,98 – 1,0. Deutlich niedrigere Wasseraktivitäten von bis zu 0,6 tolerieren sogenannte xerophile Mikroorganismen; Beispiele sind osmophile (zuckeradaptierte) Hefen oder extrem halophile Bakterien. Mit der Absenkung des a_w -Wertes ist lt. KESSLER [39] eine Erhöhung der Hitzeresistenz einiger Mikroorganismen verbunden. Eine diesbezügliche Abhängigkeit der Hitzeresistenz von *Salmonella sp.*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces rouxii* und *Schizosaccharomyces pombe*, konnte bereits von verschiedenen Autoren nachgewiesen bzw. ermittelt werden [40-43].

Lipide

In fetthaltigen Gemischen ist die Hitzeresistenz größer als in bis auf den Fettanteil gleichartigen Produkten. Es wurde festgestellt, dass Fette die Wasseraktivität in der direkten Umgebung der Zelle beeinflussen. Entscheidend ist für die Abtötungsgeschwindigkeit unter anderem die Wasseraktivität in der unmittelbaren Umgebung der Mikroorganismen und auch der Sporen. Langkettige Fettsäuren bewirken einen größeren Hitzeschutz als kurzkettige Fettsäuren [18].

Proteine

Proteine im Medium haben eine schützende Wirkung auf Mikroorganismen. Daraus folgt, dass proteinhaltige Medien stärker hitzebehandelt werden müssen als proteinfreie, um dasselbe Ergebnis zu erzielen [18].

Tabelle 2: Hitzeresistenz verschiedener Mikroorganismen (1)

Mikroorganismus	D-Wert [min]	Bezug [°C]	z-Wert [°C]	Quelle
<i>Aspergillus niger</i> (Conidiosporen) Medium: Phosphat-Puffer pH 5,5 mit 40 % Saccharose	1,0 min	62,0 °C	4,9 °C	Baggermann und Samson [36]
<i>Bacillus cereus</i> (Endosporen) Medium: Magermilch	2,7 – 3,1 min	100,0 °C	6,1 – 9,2 °C	Baumgart [35]
<i>Bacillus cereus</i> (Endosporen) Medium: Pflanzenöl	17,5 – 30 min	121,0 °C	Keine Angaben	Baumgart [35]
<i>Bacillus macerans</i> (Endosporen) Medium: keine Angaben	0,1 – 0,5 min	100,0 °C	6,6 – 8,9 °C	Sinell [12]
<i>Byssoschlamys fulva</i> (Askosporen) Medium: Fruchtsaft	12,0 min	90,0 °C	7,8 °C	Baumgart [35]
<i>Byssoschlamys fulva</i> (Askosporen) Medium: Phosphat-Puffer pH 5,5 mit 40 % Saccharose	1,0 min	84,0 °C	3,3 °C	Baggermann und Samson [36]
<i>Byssoschlamys nivea</i> (Askosporen) Medium: Sahne, 10 % Fett	1,9 min	92,0 °C	5,0 - 7,0 °C	Baumgart [35]
<i>Byssoschlamys nivea</i> (Askosporen) Medium: Phosphat-Puffer pH 5,5 mit 40 % Saccharose	1,0 min	84,5 °C	5,2 °C	Baggermann und Samson [36]
<i>Clostridium sporogenes</i> (Endosporen) Medium: keine Angaben	0,1 – 1,5 min	121,1 °C	7,7 – 10 °C	Sinell [12]
<i>Neosartorya aureola</i> (Askosporen) Medium: keine Angaben	10,0 min	85,0 °C	12,0 °C	Baumgart [35]
<i>Neosartorya fischeri</i> var. <i>fischeri</i> (Askosporen), Medium: keine Angaben	5 - 10 min	85,0 °C	10,0 °C	Baumgart [35]
<i>Neosartoria fischeri</i> var. <i>glabra</i> (Askosporen) Medium: keine Angaben	10 – 21 min	85,0 °C	12,0 °C	Baumgart [35]
<i>Neosartoria fischeri</i> var. <i>spinosa</i> (Askosporen) Medium: keine Angaben	10 – 96 min	85,0 °C	6,0 °C	Baumgart [35]
<i>Penicillium chrysogenum</i> (Conidiosporen) Medium: Phosphat-Puffer pH 5,5 mit 40 % Saccharose	1,0 min	60,5 °C	5,7 °C	Baggermann und Samson [36]
<i>Penicillium notatum</i> (Conidiosporen) Medium: Phosphat-Puffer pH 5,5 mit 40 %	1,0 min	61,0 °C	5,0 °C	Baggermann und Samson [36]
<i>Talaromyces flavus</i> (Askosporen) Medium: Fruchtsaft	2,2 min	90,6 °C	5,2 °C	Baumgart [35]

Tabelle 3: Hitzeresistenz verschiedener Mikroorganismen (2)

Mikroorganismus	D-Wert [min]	Bezug [°C]	z-Wert [°C]	Quelle
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> Medium: Orangensaft	5,3 min	95,0 °C	9,5 °C	Stahl und Scheide [44]
<i>Aspergillus niger</i> Medium: Puffer pH = 5,5	1,0 min	62,0 °C	9,0 °C	Stahl und Scheide [44]
<i>Bacillus cereus</i> Medium: Magermilch	3,1 min	100,0 °C	9,2 °C	Stahl und Scheide [44]
<i>Bacillus coagulans</i> Medium: keine Angaben	0,1 min	121,0 °C		Stahl und Scheide [44]
<i>Bacillus stearothermophilus</i> Medium: Puffer pH = 5,5	1,5 min	121,0 °C	6,0 °C	Stahl und Scheide [44]
<i>Byssochlamys fulva</i> Medium: Fruchtsaft	12,0 min	90,0 °C	7,8 °C	Stahl und Scheide [44]
<i>Byssochlamys nivea</i> Medium: Sahne 10% Fett	1,90 min	92,0 °C	7,0 °C	Stahl und Scheide [44]
<i>Candida sp.</i> Medium: keine Angaben	1,0 min	65,0 °C	4,5 °C	Stahl und Scheide [44]
<i>Clostridium botulinum</i> Medium: keine Angaben	0,2 min	121,0 °C	10,0 °C	Stahl und Scheide [44]
<i>Clostridium perfringens</i> Medium: Fleischsaft	0,5 min	110,0 °C		Stahl und Scheide [44]
Coliforme Keime Medium: keine Angaben	3,0 min	65,0 °C	6,6 °C	Stahl und Scheide [44]
<i>Escherichia coli</i> O157 Medium: keine Angaben	0,8 min	60,0 °C	4,8 °C	Stahl und Scheide [44]
<i>Eupenicillium sp.</i> Medium: Himbeerpulpe	15,0 min	90,0 °C		Stahl und Scheide [44]
<i>Lactobacillus spec.</i> Medium: keine Angaben	1,0 min	65,0 °C	5,5 °C	Stahl und Scheide [44]
<i>Leuconostoc sp.</i> Medium: keine Angaben	1,0 min	65,0 °C	5,5 °C	Stahl und Scheide [44]
<i>Neosartorya</i> Medium: keine Angaben	9,6 min	85,0 °C	12,0 °C	Stahl und Scheide [44]
Osmophile Hefen Medium: Puffer pH = 5,5	1,0 min	55,0 °C	4,2 °C	Stahl und Scheide [44]
<i>Penicillium sp.</i> Medium: Puffer pH = 5,5	1,00 min	60,0 °C	5,7 °C	Stahl und Scheide [44]
<i>Pichia anomala</i> Medium: keine Angaben	1,0 min	55,0 °C	6,4 °C	Stahl und Scheide [44]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Medium: keine Angaben	0,8 min	55,0 °C	5,0 °C	Stahl und Scheide [44]
<i>Talaromyces flavus</i> (Askosporen) Medium: Fruchtsaft	2,2 min	90,6 °C	5,2 °C	Stahl und Scheide [44]
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i> Medium: Puffer pH = 5,5	1,0 min	55,0 °C	4,2 °C	Stahl und Scheide [44]

Hemmende Inhaltsstoffe

Eine Abnahme der Hitzeresistenz von Mikroorganismen tritt beim Erhitzen in einem Medium ein, in dem sich hitzestabile, antimikrobielle Substanzen wie SO₂ befinden. Dieser Effekt wird genutzt, indem man hemmende Substanzen vor dem Erhitzen zugibt, um so die erforderliche Hitzeeinwirkung zu verringern [18].

Wachstumsbedingungen

Mit vorheriger Temperaturbehandlung der Mikroorganismen nimmt auch deren Hitzeresistenz zu. Je höher die Kultivierungstemperatur, desto größer die Hitzeresistenz der Mikroorganismen. Dies trifft vor allem auch bei Sporen zu. Zellen, die vorher mäßiger Hitze ausliefert waren, werden relativ resistenter [25].

Reduzierende Stoffe

Reduzierende Stoffe können die Disulfid-Brücken der Sporenhülle aufbrechen und so ihre Empfindlichkeit gegenüber dem Einwirken chemischer Substanzen erhöhen. Dadurch erhöht sich gleichzeitig die Abtötungsgeschwindigkeit bei chemischen Desinfektionsvorgängen. Ein Vermindern der Hitzeresistenz in alleiniger Anwesenheit reduzierender Stoffe konnte allerdings nicht beobachtet werden [45].

Schleim und Schleimhüllen

Einige Mikroorganismen haben jenseits der Zellwand noch Anlagerungen aus stark gequollenem, also wasserhaltigem, schleimigem Material. Die Hüllen sind teilweise erheblich dicker als die Zelle selber [25]. Allerdings hängt ihre Bildung im hohen Maße von den Wachstumsbedingungen ab. Ist diese Schicht nach außen scharf begrenzt, spricht man von Kapseln, ansonsten von Schleimhüllen. Lebenswichtig sind diese Schleimhüllen nicht, sie schützen allerdings die Zelle vor äußeren Einflüssen wie Trockenheit und Hitze [24, 46].

Sporen

Einige vegetative Zellen sind in der Lage, Sporen als äußerst stabile Überlebensform zu bilden. Diese treten zwar nicht im "normalen" Lebenszyklus auf, sondern werden als Reaktion auf veränderte Lebensbedingungen gebildet, so z.B. bei Erschöpfung des Nährstoffvorrats im Wachstumsmedium, bei Überführung von einem nährstoffreichen in ein nährstoffarmes Medium, nach Ende der exponentiellen Phase oder bei Anhäufung von Stoffwechselprodukten [47].

Wachstumsphasen

Die Hitzeresistenz von Mikroorganismen hängt auch von der Wachstumsphase der Zellen ab. Zellen in der stationären Phase sind resistenter gegenüber Hitze als Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase. Es wurde auch berichtet, dass die Hitzeresistenz in der Anlaufphase der Wachstumskurve (lag-Phase) sehr hoch ist, aber beim Eintreten in die exponentielle Phase (log-Phase) auf ein Minimum abnimmt. Das heißt, dass alte Zellen resistenter gegen Hitze sind als junge, da durch die Teilung die Zellwand an den Sprossnarben sehr dünn ist und somit anfälliger gegenüber äußeren Einflüssen [18, 24].

Praxisbedingungen

In der Praxis kommt es immer wieder zu einem "Schlupf" bzw. "Durchbrüchen" bei der Pasteurisation von Getränken, da die vorliegenden Mikroorganismen nicht taxonomiert, die Keimdichte ignoriert oder unterschätzt wird sowie die Hitzeresistenzen unbekannt sind. Insbesondere bei den getränkeschädlichen Sporenbildnern, wie *Alicyclobacillus sp.*, sowie bei den Askosporen bildenden Hefen, wie *Pichia anomala* und *Saccharomyces diastaticus*, sind aus der Literatur nur wenige Daten der D- und z-Werte in Getränken zu finden. Die eingestellten Pasteurisationseinheiten sind oftmals zu niedrig, berücksichtigen in der Regel nur die vegetative und nicht die sexuelle Form des Mikroorganismus und bilden somit eine mikrobiologische Schwachstelle in der Verfahrenstechnik [33, 34, 48].

2.4. Spezielle Probleme bei hitzeresistenten Keimen

Als hitzeresistente Keime sind in der Getränkebranche die Sporen des *Alicyclobacillus sp.* bekannt. Diese werden u.a. über die verschiedenen Apfel- und Zitrusfrüchte-Konzentrate in die Betriebe eingebracht. Da die KZE-Anlagen der Containerannahme und auch die Pasteure vor den Abfüllanlagen jedoch nicht für die Abtötung dieser Mikroorganismen ausgelegt sind, überleben diese die Pasteurisation und beeinträchtigen damit negativ die abgefüllten Endprodukte. Dies ist u.a. darauf zurückzuführen, dass in der Praxis kaum eine Wareneingangskontrolle erfolgt, die Keimvorbelastung ignoriert und die Keimarten nicht bekannt sind [4, 25, 45, 49-55].

Gleiches gilt auch sinngemäß, wenn Askosporen von bisher "harmlosen" Hefen vorliegen und deren Hitzeresistenz nicht bekannt ist. In der Regel werden KZE-Anlagen und Pasteure auf eine produktschonende thermische Behandlung ausgelegt, so dass auch die hitzeresistenteren Askosporen passieren können, auskeimen und damit das Produkt verderben [4, 25, 39, 48-53, 56-62].

2.5. Sporulation von Hefen

Neben der vegetativen Vermehrung der Hefen durch Sprossung kann unter bestimmten Milieubedingungen eine sexuelle Vermehrung der Hefen durch die Ausbildung von Askosporen erfolgen. Auslösefaktor ist in der Regel ein Nährstoffmangel und der Übergang vom Hungerwuchs zur Spore. Mittels Natrium-Acetat-Agar lässt sich die Askosporenbildung im Labor durchführen [25, 35, 63-65].

Weitere Auslösefaktoren, insbesondere durch Stress bedingte Umstände, sind für die hier untersuchten Hefen *Pichia anomala* und *Saccharomyces diastaticus* bisher nicht bekannt.

2.6. Entkeimung von Getränken in Abfüllanlagen

Kurzzeiterhitzungsanlagen (KZE) bzw. Pasteure sind in Molkereien, Fruchtsaftbetrieben sowie in der Brauerei- und Getränkeindustrie voll in die Produktions- und Abfüllprozesse integriert. In der alkoholfreien Erfrischungsgetränkeindustrie werden bei bestimmten Getränkesorten mittlerweile auch kaltsterile Verfahren vor der Abfüllung bei bestimmten Getränkesorten ebenfalls eingesetzt. Je nach Konsistenz der zu pasteurisierenden Getränke gelangen Plattenapparate oder Röhren-Wärmeübertrager zum Einsatz [3, 66-68]. Bei der Pasteurisation von Getränken müssen demnach aus qualitativen Gründen schonende Verfahren angewandt werden. Da die Hitzebehandlung gleichzeitig einen schädlichen Effekt auf Qualitätsmerkmale hat, ist eine präzise Konzeption der Hitzebehandlung wichtig. So führt eine zu hohe thermische Belastung in eiweiß- und zuckerhaltigen Getränken häufig zu Farbveränderungen durch Maillardreaktionen, und Oxidationen zu Geschmacksabweichungen (Pasteurisations-, Brot-, Oxidationsgeschmack) und zu Beeinträchtigungen von Vitaminen und Aromakomponenten. Höhere Temperaturen mit kurzer Einwirkungszeit sind deshalb den Niedertemperaturbereichen vorzuziehen [37]. Durch die Hitzebehandlung kann lediglich die Gefahr einer Kontamination auf ein Minimum reduziert werden, was als "kommerzielle Sterilität" bezeichnet wird [69].

Dies hat jedoch zur Folge, dass der eigentlichen Pasteurisation Grenzen gesetzt sind, da nicht alle potentiellen getränkespezifischen Schädlinge eliminiert werden können. Daneben gibt es eine Reihe von anderen Hyphenpilzen, die ebenfalls hitzeresistente Askosporen bilden wie *Aspergillus niger* oder *Penicillium chrysogenum*. Aus Literaturdaten ist bekannt, dass *Zygosaccharomyces bailii* und *Zygosaccharomyces rouxii* hitzeresistente Askosporen ausbilden können [24, 25]. Um hier den gewünschten Abtötungseffekt zu erzielen, ist daher eine fraktionierte Pasteurisation oder bei klaren Produkten eine vorgeschaltete Sterilfiltration erforderlich und hohe mikrobiologische

Qualitätsanforderungen an die einzusetzenden Sirupe und Konzentrate zu stellen [70] [13, 22]. Für die Kurzzeiterhitzungsanlagen werden als Führungsgrößen in der Regel jedoch die Pasteurisationseinheiten auf Basis der "80 °C Fruchtsaftformel" herangezogen, um die benötigte letale thermische Dosis festzulegen. Nur wenn die benötigten Pasteurisationseinheiten richtig ermittelt und dann auch angewendet werden, kann die KZE-Anlage auch als "Mikrobiologische Firewall" wirken [50]. Je nach Anwendungsbereich kommen Plattenapparate oder Röhrenmodule für die Kurzzeiterhitzung zum Einsatz. Letztere werden bei UltraClean-Anlagen und Aseptikanlagen sowie bei der Hoch-Kurzzeiterhitzung (Milch) eingesetzt, damit u. a. auch pulpe- und faserhaltige Produkte hierüber gepumpt werden können. Unabhängig von der Bauart des Wärmeübertragers, muss die Peripherie stimmig und das Prozessing stabil sein. Insbesondere muss der Eintrag von Gasblasen vermieden werden, da ansonsten die Mikroorganismen, bedingt durch den niedrigeren Wärmeleitwert von Luft und Kohlensäure, wie in "Überlebenskapseln" die Pasteurisationsanlage passieren können. Dass KZE-Anlagen nicht immer "sicher" sind, belegen viele leidvolle Erfahrungen der Betreiber, Hinweise aus der Literatur [10, 11, 33, 71] und eigene Untersuchungen in den Betrieben. Potentielle Störquellen liegen vor:

- in der Hardwarekonfiguration und peripheren Anlagentechnik
- im Materialverschleiß und bei Korrosion
- in der Steuerungstechnik beim An- u. Abfahren sowie bei den Umschaltphasen
- in der thermischen Beaufschlagung, der anstehenden Keimdichte und Keimart
- in Handlingsfehlern sowie
- in der Nichtberücksichtigung der Hitzeresistenzen der Mikroorganismen

Insbesondere eine nicht stimmige Strömungstechnik sowie das Auftreten von Gasblasen innerhalb des Systems lassen die KZE-Anlage zum unkalkulierbaren Risiko werden, da die Keimabtötung teilweise außer Funktion gesetzt wird [28-30]. Für die erfolgreiche Funktionalität einer KZE-Anlage besteht demnach u. a. auch die Grundvoraussetzung, dass die Keimdichten im unsterilen Produkt ermittelt werden, und die vorliegenden Keimarten (Schimmelpilze, Hefen und Bakterien) bekannt bzw. identifiziert sind [4].

2.7. Entkeimungsverfahren für Verpackungen

Bei der Flaschendesinfektion bzw. Flaschensterilisation werden unterschiedliche Konzepte für die UltraClean- und aseptische Abfüllung eingesetzt. Die Begriffe "Aktivator" und "Injektor" sind herstellereigene Bezeichnungen für autarke Anlagenteile bei der Flaschenentkeimung bzw. Sterilisation vor dem Rinser. Dabei kann die Verweilzeit bzw.

Einwirkungszeit der Medien auf die Flaschen durch einen modularen Aufbau variiert, durch einen Außenrinsler ergänzt oder durch größere Aktivierungs- bzw. Rinsereinheiten beeinflusst werden. Die Behandlungszeiten für die eigentliche Entkeimungszeit liegen zwischen 5 und 30 Sekunden, in Abhängigkeit des jeweiligen anlagenspezifischen Entkeimungskonzepts. Grundsätzlich wird bei den kaltseptischen Abfüllanlagen in die Bereiche "trockene" Sterilisation und "nasse" Desinfektion unterschieden. Diese Begriffsdefinition ist darauf zurückzuführen, dass die Packmittel nach dem Prozess trocken oder nass sind. An bewährten Verfahren für die Praxis sind zu nennen:

Trockene Verfahren:

- Sterilisation mit Dampf und Wasserstoffperoxid
- Sterilisation mit Heißluft und Wasserstoffperoxid

Nasse Verfahren:

- Desinfektion mit Peressigsäure
- Desinfektion mit Peressigsäure und Dampf

Neben der bewährten kaltseptischen Abfüllung im PET-Asept-Verfahren mit Peressigsäure wird alternativ auch die "Trockensterilisation" mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) angewandt. Das H_2O_2 -Verfahren war ursprünglich für die Milchindustrie konzipiert, bei dem die Wasserstoffperoxid-Sterilisation das etablierte Verfahren darstellt, bzw. länderspezifisch bei Zertifizierungen von Aufsichtsbehörden gefordert wird. Auch bei Verwendung von komplex aufgebauten Verschlüssen (Sportcaps), wie Push-Pull oder Flip-Top, bietet die H_2O_2 -Sterilisation deutliche Vorteile gegenüber der Peressigsäure-Behandlung. Ein wesentlicher Grund für den Einsatz von H_2O_2 ist auch der merklich reduzierte Wasserverbrauch und der damit einhergehende Abwasseranfall [72]. Verfahren zur Desinfektion mittels ionisierter Luft bzw. Luft/Wasser-Mischungen erfüllen z. Z. noch nicht die geforderten Abtötungsraten [56]. Die Plasma-Entkeimung ist in der Entwicklungsphase und scheint Erfolg versprechend zu sein, wird jedoch noch nicht kommerziell eingesetzt [73].

2.7.1 Ozon

Ozon ist das stärkste in der Wasserdessinfektion zugelassene Desinfektionsmittel [74]. Bei UltraClean-Anlagen wird Ozonwasser gelegentlich beim Rinsprozess eingesetzt. Es erfüllt jedoch nicht die Kriterien im Vergleich zum Einsatz von Peressigsäure oder gasförmigem Wasserstoffperoxid hinsichtlich der erforderlichen Keimabtötungseffizienz.

2.7.2 Peressigsäure (Nass-Verfahren)

Die Konzentrationen der Peressigsäure liegen in der Praxis zwischen 500 und 2.500 ppm bei Temperaturen zwischen 58 °C bis 60 °C. Bei der Nassdesinfektion wird meist ein Netzmittel zur Verringerung der Oberflächenspannung des Rinsmediums mit einer Konzentration von 0,1 bis 0,2 % zudosiert, um die Benetzung der Flascheninnenwandung sicher zu stellen. Auch stehen mögliche Gesundheitsgefahren durch peroxidhaltige Desinfektionsmittel bei der aseptischen Abfüllung in der Diskussion [75], so dass entsprechende Absaugvorrichtungen und Sicherheitsmaßnahmen bei der Planung berücksichtigt werden müssen.

2.7.3 Wasserstoffperoxid (Nass-Verfahren)

Wasserstoffperoxid wird bei der Nasssterilisation in Konzentrationen bis 2.000 ppm und darüber eingesetzt. Hier gelten die gleichen physikalischen Gesetzmäßigkeiten wie bei der Peressigsäure. Nach der Desinfektionsphase mit Peressigsäure bzw. Wasserstoffperoxid erfolgt eine Ausspülung der Flaschen bzw. Kappen mit Sterilwasser. Im Anschluss daran werden die Flaschen mit Sterilluft ausgeblasen. Der Rinser sollte über eine separate Absaugung verfügen und CIP-fähig sein. Damit wird sicher gestellt, dass die MAK-Werte nicht erreicht werden und neben der Sterilisation des Rinsers auch saure Reinigungsmittel zur Eliminierung eventueller Ablagerungen eingesetzt werden können [76, 77].

2.7.4 Wasserstoffperoxid mit Heißluft (Trocken-Verfahren)

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, auch Sterilluft zum Desinfektionsmittel Wasserstoffperoxid in die Flasche einzudüsen. Bei dieser Art der Sterilisation von Packstoffen kann eine "echte" Trockensterilisation unter Einsatz von gasförmigem H_2O_2 durchgeführt werden [78]. Dabei werden die Flaschen auf die Behandlungstemperatur von 50 °C bis 60 °C vorgewärmt, dann innen mit gasförmigem Wasserstoffperoxid unter Vermeidung von Kondensation sterilisiert. Der Vorteil dieses Trocken-Sterilisationsverfahrens liegt in der Anwendung moderater Temperaturen. Eine weitere Variante stellt ein Verfahren dar, bei dem die Heißlufttemperaturen im Bereich von > 150 °C liegen und einen Zerfall des H_2O_2 -Moleküls bewirken, so dass ein Sauerstoffradikal entsteht. Somit kann in Sekunden die Abtötungseffizienz im Verpackungsmaterial sicher gestellt werden [79]. Mit diesen Konzepten lassen sich nach den allgemein anerkannten Regeln der Technik (a. a. R. d. T.) folgende geforderten Ziele erreichen:

- Entkeimungsleistung bei Sprühverkeimung in der Flasche bei Entkeimung über 5 Zehnerpotenzen (gemäß Count-Reduction-Test für Sporen von *Bacillus subtilis* (*atrophaeus*) und *Aspergillus niger* oder andere Teststämme)
- Definierte Restkonzentration an H₂O₂ gemäß FDA-Richtlinie [80, 81] < 0,5 ppm
- Minimaler Schrumpf der Behältnisse mit weniger als 5 %

2.7.5 Wasserstoffperoxid mit Dampf (Kondensations-Verfahren)

Wird parallel zur Wasserstoffperoxidlösung Dampf injiziert oder die Flüssigkeit verdampft, so erübrigt sich ein zusätzliches Benetzungsmittel, da die Benetzung durch den kondensierenden Dampf auf der Flaschenoberfläche sicher gestellt ist [79, 82, 83]. Hier liegen die Temperaturen ebenfalls unter 65 °C, um eine Deformation der Flasche zu verhindern. Das Verfahren lässt sich in mehrere Stufen unterteilen [84]:

1. Das auf wenige Prozent verdünnte H₂O₂-Wassergemisch wird unmittelbar vor der Applikation verdampft.
2. Das H₂O₂-Dampfgemisch wird mittels Sterilluft in die Flasche oder in/auf den Verschluss eingeblasen.
3. Das H₂O₂-Dampfgemisch kondensiert auf den zu dekontaminierenden, nicht angewärmten Oberflächen und benetzt diese vollständig. Der Vorgang kann visuell sehr gut verfolgt werden. Die Temperatur in den Flaschen und Verschlusskappen steigt nicht über 65 °C.
4. Durch Wärmezufuhr in die Flaschen und in bzw. an die Kappen (im Injektor bzw. Aktivator) wird das H₂O₂ gespalten, der entstehende atomare Sauerstoff tötet Mikroorganismen zuverlässig ab.
5. Die Oberfläche wird getrocknet, es bleibt kein H₂O₂ zurück.

Gleiches gilt sinngemäß für die Außensterilisation von Flaschen. Vor dem Aktivator wird das H₂O₂-Dampfgemisch auf der Oberfläche kondensiert. Die im Inneren zugeführte Warmluft zersetzt durch die Wärmezufuhr das außen anhaftende H₂O₂ mit den gleichen Effekten.

2.7.6 Plasma-Entkeimung

Der Einsatz von Gasplasmen ist eine innovative Technologie für die nichtthermische Entkeimung bzw. Sterilisation von Packstoffen. Plasmen wirken über chemische Radikale, Ionenbeschuss und UV-Strahlung [73, 85]. Sie zerstören damit Keime und können auch Biomoleküle wie z. B. Pyrogene von Oberflächen entfernen. Aufgrund der moderaten Temperaturen sind Gasplasmen besonders für die Behandlung von thermolabilen

Materialien wie Kunststoffen (z. B. PET, HDPE, PS, PE) geeignet. Die hohe Leistungsfähigkeit bei Behandlungszeiten im Sekundenbereich und die Vielseitigkeit der Plasmatechnik ermöglichen diverse Applikationen in der Verpackungstechnik [86-88].

2.7.7 Ionisierte Luft

Verfahren zur Desinfektion von Flaschen und Verschlüssen mittels ionisierter Luft werden in der Getränkeindustrie ebenfalls eingesetzt [89], die Entkeimungseffizienz ist jedoch begrenzt [90, 91]. Bei UltraClean- und aseptischen Abfüll- und Verpackungsanlagen kommt dieses Verfahren daher nicht zum Einsatz, da die erforderlichen Keimreduktionsraten nicht sicher gestellt werden können.

2.7.8 Carbon-Strahler

Carbon-Infrarot-Strahler können Keime zuverlässig und praxistauglich abtöten. Auch dickere Keimschichten, poröse Oberflächen oder Staubpartikel sind kein Hinderungsgrund für die entkeimende Wirkung der Carbon-Infrarot-Strahler. Die Tiefenwirkung der Carbon-Strahler erreicht auch tiefer liegende Keime [92]. Infrarot-Strahlung überträgt große Energiemengen in kurzer Zeit. Eine Entkeimung mit Infrarot-Strahlung ist eine thermische Entkeimung mit Hilfe kontrollierter Hitze. Untersuchungen zeigen, dass ein ausreichender Entkeimungseffekt mit Carbon-Infrarot-Strahler bereits bei 130 °C bis 140 °C Substrattemperatur in weniger als 30 Sekunden eintritt [93]. Je nach Strahlerleistung, Feuchtigkeit und gewünschter Geschwindigkeit kann die Keimreduktion zwischen 120 °C und 160 °C innerhalb von 10 bis 30 Sekunden erreicht werden. Durch die Infrarot-Wärme wird auf Platinen bzw. Aluminiumsiegel aufgebracht H₂O₂ aktiviert, d.h. es entstehen hier Sauerstoffradikale, um eine Oberflächendesinfektion zu induzieren. Carbon-Infrarot-Strahler verbinden die hoch wirksame Strahlung im mittleren Wellenlängenbereich mit ausreichend hohen Flächenleistungen. Infrarot-Strahler mit der Carbon-Technologie "CIR" liefern Flächenleistungen bis 150 kW/m² und Reaktionszeiten im Sekundenbereich. Die schnellen Reaktionszeiten der Carbon-Strahler lassen eine gute Steuer- und Regelbarkeit zu. Der Einsatzbereich ist schwerpunktmäßig z. Z. auf taktbezogene Maschinen im Bereich der Molkereibranche begrenzt.

2.7.9 UV-Strahler

Für Entkeimungen im UltraClean- und Aseptikbereich entsprechen die klassischen UV-Desinfektionsanlagen nicht den definierten Abtötungsanforderungen. Neuere Verfahren basieren auf der Lichtimpuls-Technologie von ca. 0,3 ms pro Flash mit einer Energie von 0,7 bis 2,0 J/cm² bei mittleren logarithmischen Keimreduktionsraten von Zehnerpotenzen > 3 bis 4 [93]. Diese Technologie, bei der auch deren thermische Energie zur

Keimabtötung genutzt wird, ermöglicht eine Trockendekontamination ohne den Zusatz chemischer Produkte und ohne Gamma-Bestrahlung. Das Verfahren eignet sich u. a. für Verschlusskappen, Kronenkorken, Schalen, Preforms und Deckelfolien zur Verpackung empfindlicher Flüssigprodukte (ultrasauberes Packaging und ESL – Extended Shelf Life). Die Anlagen werden in die Verpackungs- oder Abfülllinien integriert, bevor das Produkt in Kontakt zur Verpackung kommt. Sie ersetzen chemische Entkeimungsverfahren wie Wasserstoffperoxid oder Peressigsäure sowie Bestrahlung (Gamma oder Beta). Die Technologie wurde auf die Referenzkeime "*Bacillus subtilis*" und "*Aspergillus niger*" durch mehrere Testverfahren, u. a. beim Fraunhofer Institut, bestätigt [94].

2.7.10 Gesamtbetrachtung

Die Konzepte zur Reinigung, Desinfektion und Sterilisation sind demnach nicht unmittelbar miteinander vergleichbar, obwohl für jede Anwendung der Grundsatz einer Abtötungsrate von Zehnerpotenzen > 4 bis > 6 gilt [95-99]. Differenzierungen bestehen jedoch maßgeblich hinsichtlich der Parameter Medium, Aggregatzustand, Konzentration und Einwirkungszeit sowie der Überwachungsfunktionen im Prozess. So kann der Durchfluss der Medien bei den Rundläufern mittels Magnetisch-Induktiver Durchflussmesser (MID) oder Flügelradmesszelle, das Spritzbild mittels Digitalkamera oder die Flaschentemperatur mittels Infrarotsensor erfasst und kontrolliert werden. Bei den taktbezogenen Linearmaschinen wird ausschließlich über die Durchsatzmengen der Medien die Prozessüberwachung sicher gestellt. Neuere Messeinheiten erfassen jedoch auch bereits die durchgesetzten Dampf- und Luftmengen sowie die Desinfektionsmedien.

2.8. Hygienisches Design

Die hygienischen Anforderungen an Abfüll- und Verpackungsmaschinen werden in den verschiedensten DIN-Normen, VDMA-Verbandvorschriften, Richtlinien, Verordnungen und in den EHEDG-Spezifikationen vorgegeben [100-102]. Auch die IFS Food Version 5 sowie die Berufsgenossenschaft Nahrungsmittel (BGN) stellen Anforderungen an die hygienische Gestaltung von Abfüll- und Verpackungsanlagen mit den entsprechenden Überwachungsfunktionen [103, 104]. Die für das hygienische Design relevanten Konstruktionsmerkmale von Bauteilen in und an UltraClean-Anlagen sowie kaltaseptischen Abfüllanlagen sind recht umfangreich, wie die aktuellen Anlagenversionen belegen. In der Praxis trifft man jedoch immer wieder Konstruktionen an, die entweder einen Biofilmaufbau ermöglichen, nicht rehygienisierbar sind, oder in Bezug auf die mikrobiologische Verfahrenstechnik, ungeeignet sind bzw. falsch betrieben werden.

Hierzu zählen u. a. Messwertaufnehmer, Füllventile, Fehlkonstruktionen im Reinraum bzw. Isolator und im Prozessing sowie der Einsatz von dynamischen statt statischen Dichtungen, ungeeigneter Werkstoffe sowie nicht frei umspülbare Bauteile. Typische Konstruktionsfehler liegen auch in der Auswahl und Gestaltung der Dichtungsmaterialien, geometrischen Anforderungen bez. Ecken, Sicken und Hohlräumen, nicht frei umspülbaren Maschinenelementen sowie nicht frei ablaufenden Bereichen am Füller und Verschleißer sowie den Übergabesternen und an den Innenraumverkleidungen. Bezüglich der mikrobiologischen Verfahrenstechnik werden oftmals Überwachungsparameter nicht gesetzt bzw. sind hierfür keine geeigneten Messwertaufnehmer installiert. Auch stellen Programmverriegelungen, die nicht den hohen Anforderungen der Asepsis entsprechen ein Risiko bez. einer abgesicherten Abfüllung dar. Dies gilt u. a. für die Bereiche der Chemikaliendosage sowie der Prozessmedien wie Heißluft- und Dampfzufuhr bei der Sterilisation der Flaschen, Becher, Verschlusskappen und Platinen.

Ebenfalls problematisch kann die mangelnde Funktionalität einer KZE-Anlage sein, wenn die Ventilschaltungen und das vorgeschaltete Prozessing die Eintragung von Gasblasen ermöglichen. Auch nicht hygienegerechte aseptische Verschraubungen und Ventile sowie ein negatives Druckgefälle im Pasteur sind oftmals die Ursache von Kontaminationsquellen.

2.9. Prozessabsicherung

Zur Prozessabsicherung kann und wird vor der Inbetriebnahme und Abnahme einer aseptischen Abfüllanlage eine Risikoanalyse in Form einer Fehlermöglichkeits- und Einflussanalyse (FMEA) durchgeführt werden [105, 106]. Hierbei sind die auftretenden Fehler zu klassifizieren und entsprechend einzuordnen [107]. Mittels einer tabellarischen Aufstellung, inkl. der fotografischen Dokumentation, lassen sich dann die einzelnen Bereiche und Maschinenteile mit Bild, Bauteil, Funktion, möglicher Fehler, mögliche Ursachen des Fehlers, derzeitige Kontrollmaßnahmen, empfohlene Abstellmaßnahmen und getroffene Maßnahmen systematisieren.

Somit können alle Bereiche der Gesamtanlage bewertet und eine Risiko- und Fehleranalyse erstellt werden. Die Darstellung beinhaltet in der Regel u. a. Pareto-Diagramme, die aus den Risikoprioritätszahlen erstellt werden.

2.10. Untersuchungsmethoden für Aseptik u. UltraClean-Anlagen

2.10.1 VDMA- Fachverbandsschriften und DIN- bzw. EN-Normen

Der Verband Deutscher Maschinen- und Anlagenbauer (VDMA) hat eine Reihe von Fachverbandsvorschriften erstellt, die sich mit der Überprüfung und dem Betrieb der Anlagen befassen [5, 6, 100, 108-119]. Ebenfalls gelten auch VDI-Richtlinien und DIN-Normen für den Bereich der Reinräume und Isolatoren [120-123].

2.10.2 Validierungsmappen

Für die Inbetriebnahme, Abnahme und sog. Validierung sind herstellersistenspezifische Überprüfungsmodalitäten die Regel, um die "zugesicherten Eigenschaften", vormals Garantien, für die Abfüll- und Verpackungsanlagen sicher zu stellen. In der Regel wird folgendes Ablaufschema durchlaufen:

- Inbetriebnahme
- Vortest
- Keimreduktionstest
- Steriltest Staffel 1
- Standtest bzw. Challengetest
- Steriltest Staffel 2
- Abnahmeproduktion

Es bestehen jedoch gravierende Unterschiede und auch differierende Auffassungen bezüglich des Umfangs und der Methodik der Validierung. So werden u. a. bei Rundläufern die Keimreduktionstests nicht an allen Desinfektions- bzw. Sterilisationspositionen durchgeführt. Auch wird der Challengetest, d.h. die Inkubation der Produktionslinie über 48 bis 72 Stunden mit Produkt oder einem Testmedium, in der Regel nur im bzw. bis zum Sterilpuffertank und nicht vom Auslauf der KZE-Anlage bis zum Füller – im Produktionsstatus – durchgeführt [7, 8].

2.10.3 VDI-Richtlinie 4066 (in Vorbereitung)

Verbindliche Abnahme- und Kontrollkriterien für Aseptik- u. UltraClean-Anlagen existieren nicht, vielmehr erlässt jeder Hersteller und Betreiber spezifische Vorgaben, die vertraglich geregelt sind. Aus diesem Grund befasst sich der Verein Deutscher Ingenieure im Richtlinienausschuss VDI 4066 mit der Thematik "Hygienische Anforderungen an die Herstellung und aseptische Abfüllung von Getränken – Blatt 1: Grundlagen und Auslegungskriterien" [124]. Diese VDI-Richtlinie 4066 soll als unabhängige Empfehlung

für die Projektierung, Funktionalität und den Betrieb von aseptischen Abfüllanlagen verstanden werden.

2.10.4 Keimreduktionstests (Count-Reduction-Tests)

Nach der VDMA-Fachverbandsschrift Nr. 6 [116], sind aseptisch arbeitende Abfüllmaschinen (Aseptikanlagen) Verpackungsmaschinen, die ein steriles Füllgut (z.B. Getränke) rekontaminationsfrei in ein zumeist auf der Maschine entkeimtes Packmittel füllen. Um dies zu erreichen, werden hohe Anforderungen an den Wirkungsgrad der Entkeimungsvorrichtungen für das Packmittel, den Maschineninnenraum sowie die produktführenden Teile gestellt. So wird für die Packmittelentkeimung eine Keimreduktion für das jeweilige Entkeimungsverfahren geeigneter Testkeime nach VDMA Nr. 10 von mindestens vier bzw. fünf Zehnerpotenzen als notwendig erachtet [112].

Bei Low-Acid-Produkten, d.h. pH-Werten $> 3,8$ und bei High-Acid-Produkten, d. h. pH-Werten $< 3,8$ wird als Testkeim *Bacillus subtilis* eingesetzt. Bei der UV-Entkeimung wird als Testkeim *Aspergillus niger* eingesetzt [125]. Diese liegen als definierte fertige Sporensuspension vor, meist in 70 % iger ethanolischer Lösung in Keimdichten von 10^4 bis 10^8 pro Milliliter, und können bei Fachfirmen bezogen werden. Als Auftragsverfahren für die Beimpfung bzw. Inokulation der Flaschen und Becher wird das Sprühen eingesetzt, wobei insbesondere auf folgende Bedingungen zu achten ist:

- Beimpfen in keimarmer Umgebung
- Gleichmäßiger, feiner Auftrag
- Trocknung bei Raumtemperatur in keimarmer Umgebung

Als Auftragsverfahren für die Beimpfung bzw. Inokulation der Verschlüsse und Platinen wird das Aufpipettieren eingesetzt. Auch hier gelten die Voraussetzungen:

- Beimpfen in keimarmer Umgebung und
- Trocknung bei Raumtemperatur in keimarmer Umgebung

Beim Keimreduktionstest (Count-Reduction-Test) durchlaufen die mit dem Testkeim künstlich verkeimten Packmittel die Aseptik-Anlage. Dabei wird die Anzahl der lebensfähigen Sporen vor und nach dem Passieren der Entkeimungs- bzw. Sterilisationsvorrichtung bestimmt und aus der Differenz der Keimzahlen die Abtötungsrate ermittelt.

Eine Überprüfung der kritischen Prozessparameter vor dem Testlauf muss unbedingt erfolgen und entsprechend dokumentiert werden. Die Durchführung des Keimreduktionstest (CRT) ist in der VDMA-Fachverbandsschrift Nr. 6 eindeutig beschrieben [116]. Bei mehrbahnigen Abfüllmaschinen wird eine Auswertung nach einzelnen Bahnen empfohlen [56, 126]. Die Inokulationen der Packmittel für die Keimreduktionstests sind jedoch in der praktischen Anwendung mit Fehlern behaftet (siehe 3.15), gleiches gilt für die anschließenden Probenverarbeitungen. Auch werden bei Rundläufern nicht 100 % der Ventile am Rinser, Sterilisator, bzw. Aktivator berücksichtigt und in die Untersuchung eingebunden [56]. Dies ist insofern für diese Arbeit von Bedeutung, da mit dieser praktizierten Untersuchung keine wissenschaftlich abgesicherte Aussage zur mikrobiologisch abgesicherten Funktionalität der aseptischen Abfüllanlagen getroffen werden kann.

2.10.5 Challengetest (Standtest)

Der Challengetest, besser als Standtest bezeichnet, wird zur mikrobiologisch-hygienischen Überprüfung der installierten Anlagentechnik - vom Auslauf der Kurzzeiterhitzungsanlage bis in den Sterilpuffertank – eingesetzt. Dabei wird das Produkt oder auch eine entsprechende Test- bzw. Nährlösung im aktiven Produktionszustand über 48 bis 72 Stunden zur Inkubation in der Anlage belassen [7, 8]. Beim Anfahren wird dann in der Regel neben der Stufenkontrolle, d.h. der mikrobiologischen Kontrolle über die einzelnen Prozessstufen [127], eine Testabfüllung durchgeführt, die nach einer Warmlagerung von 14 bis 21 Tagen bei 28 °C – 30 °C visuell und mikrobiologisch verprobt wird. Die Losgröße schwankt zwischen 3.000 und 10.000 Packmittel [124]. Es werden jedoch individuelle Abweichungen bei der Durchführung vorgenommen, da der Test sowohl mit/ohne aktiver KZE-Anlage wie auch mit/ohne in Produktion befindlicher Abfüllanlage sowie mit/ohne befülltem Ring- bzw. Abfüllkessel durchgeführt wird.

2.10.6 Endpointtest

Beim Endpointtest werden die Flaschen und Verschlüsse zwar ähnlich wie beim Keimreduktionstest mit Testkeimen künstlich beimpft, jedoch in drei abgestuften Keimbelastungen, die sich jeweils um eine Zehnerpotenz unterscheiden. Die Details und allgemeine Vorgehensweise werden in der VDMA-Fachverbandsschrift Nr. 6 ausführlich beschrieben [116]. Der Hauptunterschied zum Keimreduktionstest liegt darin, dass beim Endpointtest die künstlich verkeimte Verpackung mit einem auf den Testkeim abgestimmten sterilen Nährmedium befüllt und nach einer Bebrütungsphase nur die Anzahl unsteriler Packmitteleinheiten ermittelt wird. Der Endpointtest liefert über den Wirkungsgrad der Packstoffsterilisation hinaus Aussagen über den gesamten Prozess,

von der Produktzuführung und Abfüllung bis hin zum rekontaminationsfreien Verschließen der Verpackung.

2.10.7 Innenraumdesinfektions-Effizienztest (Endpointtest)

Zur Überprüfung der Entkeimungseffizienz im Sterilbereich der Verpackungs- und Abfüllmaschinen wird als Referenzmethode der Test nach der VDMA-Fachverbandsschrift Nr. 8 – „Prüfung von Aseptikanlagen, Entkeimung im Sterilbereich“, als sog. Endpointtest durchgeführt. Hierbei wird überprüft, ob die lt. VDMA-Klassifizierung geforderten Keimreduktionsraten bei der Desinfektion und Sterilisation an den Maschinenoberflächen im Innenraum eingehalten werden [5].

mittlere logarithmische Keimreduktion (MLK) nach VDMA u. VDI 4066	Verpackungs- u. Füllmaschine		
	Klasse III	Klasse IV	Klasse V
Packmittel		MLK \geq 4	MLK \geq 5
Maschineninnenraum	MLK \geq 2	MLK \geq 3	MLK \geq 4

Abbildung 4: Keimreduktion (MLK) des Innenraums nach VDMA u. VDI 4066

Bei UltraClean-Anlagen und kaltseptischen Abfüllanlagen werden die Desinfektionen bzw. Sterilisationen mit Peressigsäure oder mit in Dampf bzw. Heißluft eingebrachtem Wasserstoffperoxid durchgeführt. Bei der letzteren Variante entsteht aus dem H₂O₂ ein Sauerstoffradikal, so dass die Keimabtötungseffizienz um einige Zehnerpotenzen über der der Peressigsäure liegt. In der Praxis werden konfektionierte Aluminiumfolien punktförmig mit dem Teststamm *Bacillus subtilis* (DSM 4181) in den Zehnerpotenzen 3, 4 und 5 inokuliert und an 10 Positionen auf bzw. an den Maschinenoberflächen mit Klebeband positioniert. Nach Beendigung der Innenraum-Rehygienisierung bzw. Sterilisation werden die Teststreifen mit einer Pinzette in Petrischalen überführt. Die VDMA-Methode beschreibt die mikrobiologische Verarbeitung und die entsprechenden Arbeitsschritte [5]. Für die Praxis ist dieser Test jedoch sehr umständlich und nicht für die Überprüfung kompletter Reinigungsprogramme auf alkalischer Basis geeignet, da die Aluminiumfolien teilweise angelöst werden und freier Wasserstoff bzw. Knallgas entstehen kann. Demzufolge ist er jeweils anzupassen [56].

2.10.8 Spritzschattentest

In regelmäßigen Abständen sind bei Inbetriebnahmen sowie im laufenden Betrieb Überprüfungen der in Reinräumen und Isolatoren installierten Innenraum-Reinigungssysteme notwendig, um die vorhandene Hardware zu überprüfen, da sowohl

die Düsen und Sprühkugeln in ihrer Funktionalität wie auch in ihrer Ausrichtung durch Wartungs- und Inspektionsarbeiten an der Maschine dejustiert sein können [128]. Die Anforderungen an die Innenraum-Rehygienisierung von Reinräumen in UltraClean (Klassifizierung IV) und Aseptikanlagen (Klassifizierung V) werden in den einzelnen VDMA-Fachverbandsschriften [5, 6, 109, 112, 114] sowie im Entwurf der neuen VDI-Richtlinie 4066 festgelegt [123]. Diese Empfehlungen bzw. Richtlinien stellen die allgemein anerkannten Regeln der Technik dar (a.a.R.d.T.). Die Innenräume der konventionellen Abfüllanlagen werden der Klasse III zugeordnet.

Danach werden für den Reinraum bzw. Isolator, je nach Zuordnung der Abfüllmaschine, unterschiedliche Keimreduktionsraten für den Innenraumbereich mit Zehnerpotenzen zwischen 2 und 4 gefordert. Für die klassischen Abfüllanlagen liegen noch keine verbindlichen Empfehlungen vor. Es besteht jedoch auch hier die Vorgabe, dass keine Sprüh- bzw. Spritzschatten resultieren dürfen, um einen potentiellen Biofilmaufbau durch nicht abgereinigte Produkt- bzw. Getränkereste entstehen zu lassen. Bei der aktuell praktizierten Durchführung dieser Überprüfungen lassen sich Biofilme mittels Abstrichproben (Swaps) und geeigneter Nährmedien, wie Plate-Count-Agar oder NBB-B-AM [24, 27, 49, 129] bzw. auch nicht abgereinigtes organisches Material mittels der ATP-Messmethode nachweisen. Um die Effizienz des installierten Innenraum-Reinigungssystems auch visuell überprüfen zu können, wird daher neben den mikrobiologischen Abstrichproben ein Retentions- und Spritzschattentest eingesetzt. Die Ursprünge gehen auf einen von OLIVER-DAUMEN praktizierten, erstmalig im Jahr 2002 durchgeführten Einsatz mittels einer Kieselgur-Aufschlammung zurück [56].

Als aufzutragende Spritzschatten-Testmedien werden mittlerweile die unterschiedlichsten Zusammensetzungen verwendet (vgl. Tabelle 4). So ist man von der abrasiven Kieselgur zu eingefärbten zuckerhaltigen Medien übergegangen [130]. Diese haben jedoch alle den Nachteil, dass die Haftung an der Maschinenoberfläche nicht befriedigt und ein Nährmedium in Form von Kohlehydraten aufgetragen bzw. eingebracht wird. Bei nicht korrekt funktionierenden Spritzdüsensystemen können somit Mikroorganismen anwachsen, mit den bekannten negativen Folgen einer Reinfektion für die UltraClean- und aseptischen Abfülltechnologie.

Tabelle 4: Entwicklung der Lösungen und Pasten für den Spritzschattentest

Zusammensetzung	Nährmedium	Anmerkung
Kieselgur mit Wasser	[nein]	abrasiv, 24 h Aufrocknung
Kieselgur mit Alkohol-Wasser	[nein]	abrasiv, 8 h Aufrocknung
Zellulose mit Alkohol-Wasser	[nein]	keine Haftung
Molke / Joghurt	[ja]	gute Haftung
Zuckersirup mit Rote Beetesaft	[ja]	gute Haftung, schnell antrocknend
Glucosesirup mit Kirschsafft	[ja]	gute Haftung, schnell antrocknend
Stärke mit Wasser u. LM-Farbstoff	[ja / nein]	mittlere Haftung
Alkohol-Wasser u. LM-Farbstoff	[nein]	keine Haftung
Zellulose, Stärke mit Wasser u. Riboflavin	[nein]	schlechte Haftung, Abdunklung und UV-Licht

2.10.9 ATP-Test

Der ATP-Test dient dem Nachweis von organischen Verschmutzungen. Das Wirkprinzip beruht auf einer Reaktion des in organischen Materialien vorhandenen ATP mit dem Enzym Luziferase. Dabei kommt es zu einer Biolumineszenz-Reaktion. Das emittierte Licht wird dabei in einer Auswerteeinheit detektiert. Die detektierte Lichtmenge wird dabei in RLU (Relative Light Units) wiedergegeben und ist proportional zur Menge der organischen Verschmutzung.

Da die ATP-Messung jedoch mit Fehlern behaftet ist und Fehlinterpretationen resultieren [125], wird dieser Test kritisch betrachtet und daher werden die mikrobiologischen Abstrichproben nach BACK bevorzugt [24].

3. Material und Methoden

3.1. Testsequenz

Im Jahr 2002 und den darauffolgenden Jahren traten in verschiedenen Betrieben der Brauerei- und Getränkeindustrie bisher nicht erklärbare und zu diesem Zeitpunkt auch nicht nachvollziehbare Produktbeeinträchtigungen durch Getränkeschädlinge in konventionellen und aseptischen Abfüllanlagen auf. Daraufhin wurden Identifikationen der Mikroorganismen durchgeführt und sowohl primäre Infektionen durch das Passieren der Kurzzeiterhitzungsanlagen wie auch Sekundärinfektionen aus dem Maschinenumfeld nachgewiesen. Diese Identifizierungen der isolierten Mikroorganismen wurden zusätzlich durch extern vergebene Untersuchungen bestätigt. Des Weiteren wurden auch Bestimmungen und Untersuchungen zur Hitzeresistenz durchgeführt, um zu belegen, dass die erhöhten z-Werte einzelner Mikroorganismen, insbesondere der Sporen und Askosporen, die Ursache für bisher nicht bekannte Primärinfektionen darstellen. Repräsentative Testkeime wurden daher sowohl einer Simulation in definierten Situationen unterworfen, als auch unter realen Bedingungen überprüft, so dass eine Identifikation der Ursachen für die hohen Hitzeresistenzen erfolgen konnte. Basierend auf den darauf gewonnenen Erkenntnissen wurden Untersuchungsmethoden zur Überwachung der kaltseptischen Abfüllung entwickelt:

Teil I: Thermische Inaktivierung

- Bestimmung der Hitzeresistenzen ausgesuchter und identifizierter spezieller Getränkeschädlinge
- Simulation der Askosporenbildung durch Einwirkung der Zellgifte Teein, Koffein und durch Dehydratisierungen
- Fehler- und Ursachenfindung für das Passieren von Getränkeschädlingen durch Kurzzeiterhitzungsanlagen und Pasteure
- Neuberechnungen zur notwendigen letalen thermischen Energie für ausgesuchte Testkeime

Teil II: Funktionsfähige Kaltseptik

- Entwicklung eines Testmediums zur Überprüfung der inneren Anlagenhygiene
- Lokalisierung von Infektionsquellen sowie Schwachstellen im hygienischen Maschinendesign

- Modifikation des Challengentests zur mikrobiologischen Überprüfung und Absicherung der aseptischen Abfüllung
- Entwicklung des Spritzschattentests bzw. Retentionstests zur Überprüfung der Rehygienisierung an Maschinenoberflächen
- Entwicklung eines nährstofffreien Mediums für den Spritzschattentest
- Weiterentwicklung des Endpointtests als Untersuchungsmethode für die Reinigungs- und Sterilisationseffizienz in Reinräumen und Isolatoren
- Statistische Auswertungen der inokulierten Transportkontrollen (Nullprobe) und der inokulierten Flaschen und Verschlüsse beim Keimreduktionstest
- Entwicklung von abgesicherten Aussagen zur mittleren logarithmischen Keimreduktion inokulierter Verpackungseinheiten

3.2. Nachweismedien für mikrobiologische Nachweise und Identifizierungen

Die nachfolgend dargestellten eingesetzten Nährmedien entsprechen in ihrer Zusammensetzung den der Fachliteratur angegebenen Rezepturen [35]. Weitere Details sind an den einzelnen Stellen angegeben.

Flüssige Nährmedien:

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ BAT-Bouillon ▪ Caso-Bouillon ▪ Endvergorenes Bier ▪ Erythrit-Hefeextrakt-Lsg. ▪ Glucose-Pepton-Lösung ▪ Lactat-Hefeextrakt-Lsg. ▪ NBB-B-AM ▪ SSL- Bouillon ▪ YPD-Bouillon | <p>Spezialmedium zum Nachweis von <i>Alicyclobacillus sp.</i></p> <p>Komplexmedium zur Anzucht von Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen</p> <p>Anreicherungsmedium für Dextrin vergärende Hefen</p> <p>Anreicherungsmedium für Hefevorzuchten</p> <p>Anreicherungsmedium, u.a. für <i>Bacillus subtilis</i></p> <p>Anreicherungsmedium für Hefevorzuchten</p> <p>Anreicherungsmedium zum Nachweis von Bierschädlingen nach Back</p> <p>Anreicherungsmedium für Hefen und Schimmelpilze</p> <p>Yeast-Extract-Peptide-Dextrose Nährmedium für die Anzucht von Hefen</p> |
|---|--|

Feste Nährmedien:

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ BAM-Agar ▪ BAT-Agar ▪ Caso-Agar ▪ DEV-Gelatine-Agar ▪ Endo-Agar ▪ Malzextrakt-Agar ▪ MRS-Agar ▪ Natrium-Acetat-Agar ▪ NBB-A | <p>Spezialmedium zum Nachweis von <i>Alicyclobacillus sp.</i></p> <p>Trockennährboden zum Nachweis von <i>Alicyclobacillus sp.</i></p> <p>Komplexmedium für Bakterien, Hefen und Schimmelpilze</p> <p>Nachweismedium für Gesamtkeimzahl n. TWVO</p> <p>Nachweismedium für coliforme Keime</p> <p>Spezialmedium zur Askosporeninduzierung</p> <p>Nachweismedium für Hefen und Schimmelpilze</p> <p>Spezialmedium zur Askosporeninduzierung</p> <p>Nachweis von Bierschädlingen nach Back, Agar</p> |
|---|---|

- OFS Orangen-Fruchtsaft-Serum
- OSA Orangen-Serum-Agar
- PC-Agar Plate-Count-Agar zum Nachweis von *Bacillus subtilis*
- Würze-Agar Universalmedium für Hefen und Schimmelpilze
- YGC-Agar Selektivagar (Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar)
- YPD-Agar Yeast-Extract-Peptone-Dextrose Nährmedium zur Hefeanzucht

3.3. Bestimmung der Hitzeresistenz von Getränkeschädlingen

Die Untersuchungen zur Hitzeresistenz von potentiellen Getränkeschädlingen wurden auftragsbezogen im Rahmen von Betriebsberatungen, Gutachten und wissenschaftlichen Arbeiten [28, 51, 52] durchgeführt.

Die Versuchsserien zur Ermittlung der D- und z-Werte von ausgesuchten Teststämmen in unterschiedlichen Getränkesorten sind an der Technischen Universität München (WZW) vorgenommen worden [51, 52].

3.3.1 Mikroorganismen

Die aus den in den Betrieben isolierten Mikroorganismen, sog. "Wildfänge", wie auch die zur Untersuchung im Labor herangezogenen Teststämme sind nachstehend aufgeführt:

Tabelle 5: Mikroorganismen "Isolate"

Stamm	Betrieb	Zustandsform	Herkunft
<i>Pichia anomala</i>	R	Sporen	Fruchtsaftbetrieb
<i>Pichia anomala</i>	J	Sporen	Mineralwasserbetrieb
<i>Pichia anomala</i>	K	Sporen	Backwarenbetrieb
<i>Saccharomyces diastaticus</i>	W	Sporen	Brauerei
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	H	Sporen	Mineralwasserbetrieb
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	D	Sporen	Konzentratbetrieb
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	C	Sporen	Fruchtsaftbetrieb

Aus Gründen der Geheimhaltung wurden die untersuchten Betriebe nicht namentlich aufgeführt, sondern mit einem Synonym-Buchstaben belegt. Die aus den Betriebsstätten ermittelten Untersuchungen und Ergebnisse der dort isolierten Mikroorganismen, sog. "Wildfänge", sind in einer separaten Aufstellung als Übersichtstabelle zusammengefasst, um deren Zuordnung transparenter darstellen zu können (vgl. Tabelle 5 und Tabelle 6).

Die Identifizierungen der Wildfänge wurden bei den Hefen mittels morphologischer Untersuchungen, Auxonogramm, Fermentationen und Assimilationen in verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen durchgeführt [63-65]. Die Untersuchungen auf *Alicyclobacillus spec.* erfolgten durch die Flow-Cytometry-Methods (FCM-Methode) zur Quantifizierung und Differenzierung sowie in Anlehnung der Methode No. 12 der International Federation of Fruit Producers (IFU) [131, 132].

Tabelle 6: Mikroorganismen "Testkeime"

Stamm	Stamm-Nr.	Zustandsform	Herkunft
<i>Lactobacillus lindneri</i>	L 2	Vegetativ	TUM Weihenstephan, Brauerei 1
<i>Pichia anomala</i>	P 27	Sporen	TUM Weihenstephan, Brauerei 1
<i>Saccharomyces diastaticus</i>	S 22	Sporen	TUM Weihenstephan, Brauerei 1
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	DSM 3922	Sporen	Biotecon Potsdam
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404	Sporen	Biotecon Potsdam
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 4181 Nr. 61	Sporen	Biotecon Potsdam
<i>Lactobacillus brevis var. frigidus</i>	L 150	Vegetativ	TUM Weihenstephan, Brauerei 1

Die Teststämme wurden den Stammsammlungen der Technischen Universität München (WZW) entnommen bzw. bei der Firma Biotecon, Potsdam, erworben.

3.3.2 Vorzucht

Alle Keimsuspensionen sollten für die Bestimmung der D-Werte zur Ermittlung der Hitzeresistenz eine Keimzahl von ca. 10^8 KBE / ml haben. Um eine Beeinflussung des Wachstumsmediums zu verhindern, wurden sie daher mit steriler Ringerlösung ausgewaschen. Die Ausgangskeimzahlbestimmung der Sporen-Suspensionen wurde, um das Wachstum vegetativer Zellen auszuschließen, nach kurzem Erhitzen (10 s) auf 70 °C durchgeführt. Die untersuchten vegetativen Zellen müssen in der stationären Phase

vorliegen, da sie in dieser am hitzeresistentesten sind. Nach dem Auswaschen in steriler Ringerlösung wird die stationäre Phase durch kühles Lagern über einige Tage erreicht.

3.3.3 Eingesetzte Gerätschaften

3.3.3.1 Geräte:

- Wasserbad
- Pipette 1 ml
- Reagenzglas-Schüttler
- Stoppuhr
- Brutschrank
- Thermometer, LCD- Handthermometer DT-300, Voltcraft, 0,1 °C+- 1 Digit

3.3.3.2 Nährmedien:

- NBB-Agar Bestell-Nr. 2.04709.782, Döhler, Darmstadt
- OFS-Agar Bestell-Nr. 2.04707.782, Döhler, Darmstadt
- VCM-Agar Bestell-Nr. VCM-Select A3, Fa. Vermicon, München

3.3.3.3 Erhitzungsmedien:

- Ringerlösung Bestell-Nr. 1.15525, Merck, Darmstadt, pH 7,0 +-0,2
- Ice Tea (Nestea Pfirsich) pH-Wert 4,65
- Orangen-Nektar 50% Fruchtsaftgehalt (rio d' oro) pH-Wert 3,0
- Pils alkoholfrei (Jever Fun) pH-Wert 4,3

3.3.3.4 Methode

Die Bestimmungsmethoden werden in Anlehnung an die in der DIN EN ISO 11138-1 beschriebenen Bestimmungen der D- und z-Werte durchgeführt [133].

3.3.4 Versuchsbeschreibung

Um den D-Wert zu ermitteln, sind die Untersuchungsproben bei den festgelegten Einwirkbedingungen abgestuften Expositionen zu unterziehen, wobei alle Verfahrensvariablen außer der Zeit konstant bleiben. Durch Variation der Temperatur wird der z-Wert ermittelt. Die Untersuchungsproben sind unter definierten Einwirkbedingungen zu behandeln. Der Bereich der Expositionen ist festzulegen. Es sind mindestens fünf folgende Expositionen anzuwenden, zu denen gehören müssen (vgl. Anlage 8.1):

- eine Exposition, bei der die Probe nicht behandelt wird (Blindwert)
- mindestens eine Exposition, bei der die lebensfähige Keimpopulation auf 10^{-4} des Ausgangsinokulums verringert wird, d.h. demnach um 4 Zehnerpotenzen.

Für jede Exposition sind bei jeder Bestimmung nicht weniger als drei Untersuchungsproben zu verwenden. Für jede Exposition ist die gleiche Anzahl an Mehrfachbestimmungen anzusetzen [134]. Die Abtötung der Mikroorganismen beginnt bei der letalen Temperatur. Die Versuche zur Bestimmung der Hitzeresistenz werden bei höheren Temperaturen durchgeführt. Im Versuch ist es wichtig, unter isothermen Bedingungen zu arbeiten, um möglichst genaue Ergebnisse zu ermitteln. Da beim Aufheizen auf Versuchstemperatur und beim Abkühlen unter die letale Temperatur ebenfalls eine Abtötung der Keime stattfindet, sind diese Temperaturbereiche zeitlich möglichst klein zu halten (praktische Isotherme). Durch das Vorwärmen der 9 ml des Getränkes und das sofortige Schütteln nach der Zugabe von 1 ml Keimsuspension ist die isotherme Bedingung erfüllt. Beim Abkühlen wird 1 ml Getränk-Keimsuspension in 9 ml sterile Ringerlösung pipettiert und dadurch sofort weit unter die letale Temperatur heruntergekühlt. Kommen hohe Versuchstemperaturen zum Einsatz, muss die sterile Ringerlösung in einem Eisbad vorgekühlt werden, um die Reaktion zu stoppen.

3.3.4.1 Vorbereitungen

Die Gussplatten müssen, um ein verwendbares Ergebnis zu liefern, innerhalb 15 Minuten nach dem Stoppen der thermischen Einwirkung gegossen werden. Dies ist wichtig, um den Zustand nach einer Exposition zu erfassen, da ansonsten sowohl die Endpopulation wie auch die Ausgangskeimzahl zunehmen würde [135]. Um ein zügiges Arbeiten zu gewährleisten, wurde pro Versuch (Temperaturstufe, Mikroorganismus, Getränk) eine dezimale Verdünnungsreihe vorgenommen. Die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten erfolgte nach dem Gussplattenverfahren.

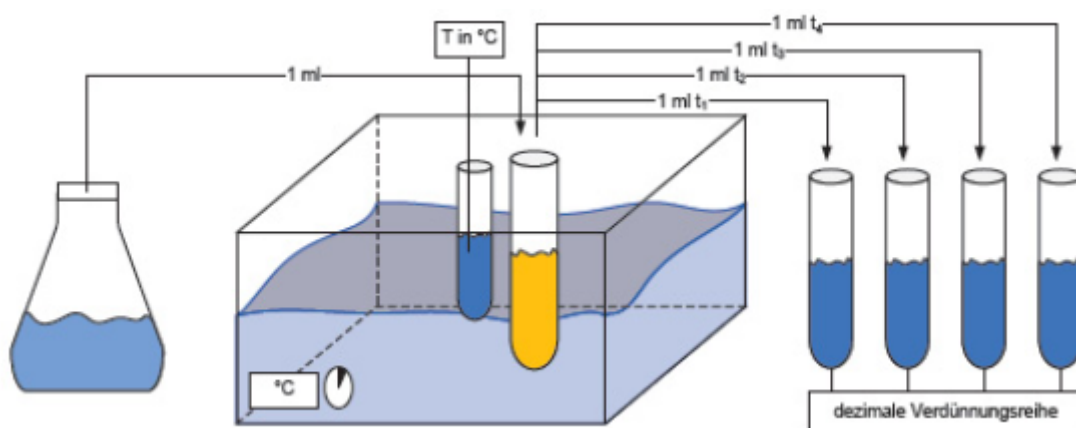


Abbildung 5: Versuchsaufbau

Ein Vergleich der Keimzahlbestimmungen zum Ausstrichverfahren wurde nicht vorgenommen. Die Untersuchungsproben wurden unter definierten Einwirkbedingungen behandelt. Der Bereich der Expositionen ist stets festgelegt und dokumentiert worden [134, 136].

3.3.5 Versuchsdurchführung

9 ml des nicht inokulierten Getränks werden in einem Reagenzglas im Wasserbad auf die definierte Temperatur gebracht. Diese wird kontrolliert, indem man die Temperatur in einem weiteren mit Wasser gefüllten Reagenzglas misst. Während des Aufheizens ist die Ausgangskeimzahl der Suspension zu bestimmen, indem man diese dezimal verdünnt und auf Gussplatten ausgießt. Außerdem ist die Ausgangskonzentration zu ermitteln. Dazu wird 1 ml der Organismen-Suspension in 9 ml Getränk überführt und die Keimzahl ermittelt. Vor jedem Entnehmen von Suspension ist diese, um eine homogene Verteilung der Mikroorganismen zu gewährleisten, mit einem Schüttelapparat zu homogenisieren.

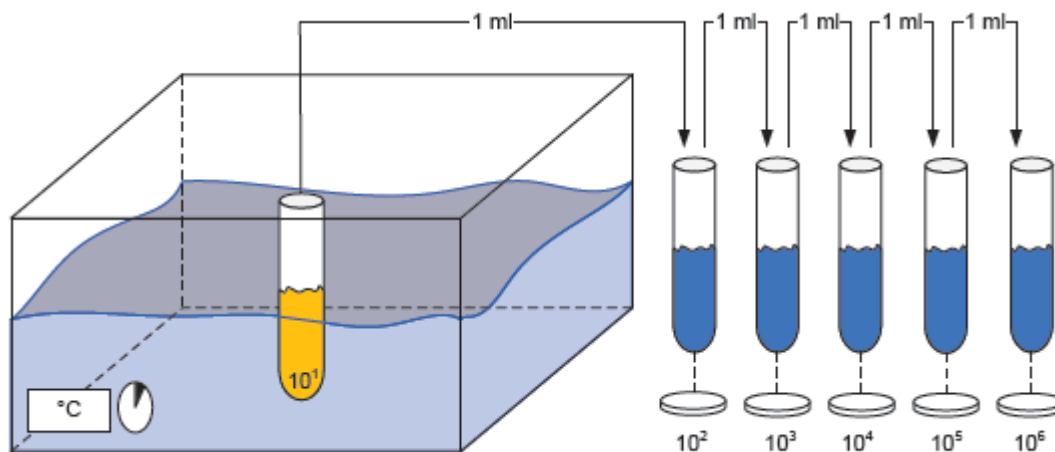


Abbildung 6: Dezimale Verdünnung

Ist die vorgegebene Temperatur erreicht, gibt man 1 ml der Suspension - nach vorherigem Homogenisieren - zu dem temperierten Getränk und homogenisiert sofort mittels Schüttler, um eine Temperaturschichtung und eine inhomogene Verteilung der Mikroorganismen zu vermeiden. Gleichzeitig wird die Zeit erfasst, da genau mit dem Zugeben das Zeitintervall beginnt. 10 Sekunden vor jedem Intervallende muss die Probe geschüttelt werden. Genau bei Intervallende entnimmt man 1 ml der Probe, gibt diese in 9 ml sterile kalte Ringerlösung und unterbricht damit durch sofortiges Schütteln die thermische Exposition. Mittels dezimaler Verdünnung und dem Gussplattenverfahren ermittelt man die koloniebildenden Einheiten (KBE). Die mikrobiologischen Probenvorbereitungen und Verarbeitungsmethoden zum Anlegen von Verdünnungsreihen sowie der Zellzahlbestimmungen sind bekannt und Stand der mikrobiologischen Untersuchungsmethoden [26, 35].

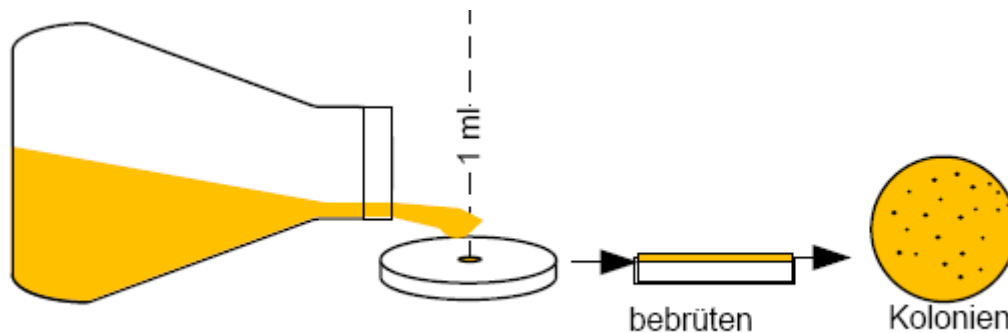


Abbildung 7: Plattengussverfahren

Die weiteren Details dieser Untersuchungsmethoden, die Erstellung der Versuchsprotokolle und Dokumentationen sind von BACK [24] sowie von BAUMGART [35] beschrieben.

3.3.6 Hitzeresistenzberechnungen nach DIN EN ISO 11138-1 und REUTER

Berechnung und grafische Darstellung der D- und z-Werte sind in Anlehnung an die DIN EN ISO 11138-1 nach Anlage C, sowie der Berechnungsgrundlage nach REUTER durchgeführt worden [27-30]:

Unter Verwendung aller gewonnenen Daten ist der dekadische Logarithmus der überlebenden Population gegen die Einwirkdauer in Minuten oder das Dosisniveau aufzutragen. Die Gerade der optimalen Übereinstimmung ist durch Regressionsanalyse nach dem Verfahren der kleinsten Quadrate zu ermitteln. Datenpunkte des Überlebens bei denen sich der dekadische Logarithmus des Werts von der Ausgangspopulation um weniger als 0,5 unterscheidet, dürfen nicht in die Regressionsanalyse einbezogen werden. Der negative Reziprokwert der Neigung der erhaltenen Geraden wird berechnet, der bei den festgelegten Einwirkbedingungen gleich dem D-Wert in Minuten ist.

Die Neigung der Gerade der optimalen Übereinstimmung wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$(1) \quad m = \frac{[nG] - [AB]}{[nC] - [A^2]}$$

Die für die Berechnung erforderlichen Daten sind in der nachstehenden Abbildung aufgeführt.

Rückgewonnene Population = y	Einwirkzeit (min) = t	log y	t ²	t(log y)	(log y) ²
y ₁	t ₁ = 0,0	log y ₁	(t ₁ ²) = 0	t ₁ (log y ₁) = 0	(log y ₁) ²
y ₂	t ₂	log y ₂	(t ₂ ²)	t ₂ (log y ₂)	(log y ₂) ²
y ₃	t ₃	log y ₃	(t ₃ ²)	t ₃ (log y ₃)	(log y ₃) ²
y ₄	t ₄	log y ₄	(t ₄ ²)	t ₄ (log y ₄)	(log y ₄) ²
y ₅	t ₅	log y ₅	(t ₅ ²)	t ₅ (log y ₅)	(log y ₅) ²
	$A = \sum_{i=1}^{i=5} t_i$	$B = \sum_{i=1}^{i=5} \log y_i$	$C = \sum_{i=1}^{i=5} (t_i^2)$	$G = \sum_{i=1}^{i=5} [t_i (\log y_i)]$	$E = \sum_{i=1}^{i=5} [t_i (\log y_i)]^2$
Zugeordnete Variable	A	B	C	G	E

Abbildung 8: Beispiele von für die Regressionsanalyse erfassten Daten

- m = die Neigung der geradlinigen Kurve der optimalen Übereinstimmung
 n = Anzahl der Datenpunkte [n]
 t = Einwirkungszeit [min]
 y = Rückgewonnene Population
 A = Summe der gesamten Einwirkungszeit
 B = Summe der logarithmierten rückgewonnenen Populationen
 C = Summe der Einwirkungszeiten
 G = Summe der logarithmierten Einwirkungszeiten
 E = Summe der quadrierten u. logarithmierten rückgewonnenen Populationen

Rückgewonnene Population = y	Einwirkzeit (min) = t	log y	t ²	t(log y)	(log y) ²
y ₁ = 2,5 x 10 ⁶	t ₁ = 0,0	log y ₁ = 6,3979	(t ₁ ²) = 0	t ₁ (log y ₁) = 0	(log y ₁) ² = 40,9331
y ₂ = 3,4 x 10 ⁵	t ₂ = 2,0	log y ₂ = 5,5315	(t ₂ ²) = 4	t ₂ (log y ₂) = 11,0630	(log y ₂) ² = 30,5975
y ₃ = 3,1 x 10 ⁴	t ₃ = 4,0	log y ₃ = 4,4914	(t ₃ ²) = 16	t ₃ (log y ₃) = 17,9656	(log y ₃) ² = 20,1727
y ₄ = 1,7 x 10 ³	t ₄ = 6,0	log y ₄ = 3,2304	(t ₄ ²) = 34	t ₄ (log y ₄) = 19,3824	(log y ₄) ² = 10,4355
y ₅ = 1,9 x 10 ²	t ₅ = 8,0	log y ₅ = 2,2788	(t ₅ ²) = 64	t ₅ (log y ₅) = 18,2304	(log y ₅) ² = 5,1929
	$A = \sum_{i=1}^{i=5} t_i$	$B = \sum_{i=1}^{i=5} \log y_i$	$C = \sum_{i=1}^{i=5} (t_i^2)$	$G = \sum_{i=1}^{i=5} [t_i (\log y_i)]$	$E = \sum_{i=1}^{i=5} [t_i (\log y_i)]^2$
Zugeordnete Variable	A = 20	B = 21,9830	C = 120	G = 66,6414	E = 107,3317

Abbildung 9: Beispiel zur Berechnung der Neigung

Der D-Wert ist gleich dem negativen Reziprokwert der erhaltenen Neigung und wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$(2) \quad D = -1 \left(\frac{1}{m} \right)$$

m = die Neigung der geradlinigen Kurve der optimalen Übereinstimmung

$$(3) \quad r^2 = \frac{[(G) - [(A)(B/n)]]^2}{[(C) - (A^2/n)][(E) - (B^2/n)]}$$

Der z-Wert errechnet sich demnach aus den beiden ermittelten D-Werten wie folgt:

$$(4) \quad z = \frac{T_1 - T_2}{\log D_2 - \log D_1}$$

Zur Auswertung wurden die erhaltenen Daten und die zugrunde liegenden Formeln in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel) übertragen, so dass die Ermittlung der D-Werte, der Regressionen sowie der z-Werte automatisiert durchgeführt werden konnte (vgl. Anhang 8.1).

3.4. Testmethode zur erzwungenen Sporulation von Hefen

In der Praxis wurden bei mikrobiologischen Verprobungen der Grundstoffe, im ausgemischten Fertigprodukt Eistee sowie bei den Abstrichproben an den Maschinenoberflächen neben der vegetativen Form auch ein hoher Anteil von Askosporen von *Pichia anomala* festgestellt. Daher wurde die These aufgestellt, dass äußere Umstände in Form von Stressfaktoren die Sporulation auslösen mussten. Um diese Phänomen der spontanen Sporulation abgesichert nachzuvollziehen, mussten daher Stressfaktoren für dieses Phänomen im Labor in Form von negativen Umfeldeinflüssen, d.h. Zellgifte und Dehydratisierungen, erzeugt werden.

Daher wurden zwei unterschiedlich neu entwickelte Methoden zur Simulation der Praxisbedingungen für die spontane Sporulation an den vegetativen Zellen von *Pichia anomala* angewendet:

- Simulation einer Auftrocknung der vegetativen Zellen von *Pichia anomala* an Toastbrot und auf Malzextrakt-Agar 5 % (Dehydrierung)
- Simulation einer erhöhten Konzentration der Zellgifte Teein und Koffein durch deren Kontamination mit den vegetativen Zellen von *Pichia anomala* in einem Fertigsirup zur Eisteeherstellung

Für beide Testverfahren ist eine Vorzucht der *Pichia anomala* in Würze-Bouillon bei 27°C über 24 Stunden im Schüttelkolben auf eine Konzentration von 10^6 bis 10^7 Keime / ml erforderlich.

Um den Stressfaktor der Dehydratisierung bzw. Auftrocknung zu simulieren, wurden zwei ml der Hefesuspension aus vegetativen Zellen auf in einer Petrischale platziertes Toastbrot sowie 1 ml auf einen Malzextrakt-Agar aufgebracht und anschließend 5 und 7 Tage bei 26°C bebrütet. Danach erfolgte eine Aufschlammung des Toastbrots mit 5 ml Ringerlösung und die der Kolonien auf der Petrischale mit dem Malzextrakt-Agar. Die visuelle prozentuale Ermittlung der Askosporen erfolgte durch die Auszählung in der Zählkammer nach THOMA.

Für die Labor-Simulation des Stressfaktors Zellgift, d.h. das vorliegende Teein in den Sirupen zur Eisteeausmischung, wurde der Anzucht mit vegetativen Zellen 2 % Tee oder Kaffee zugesetzt. Nach der weiteren Bebrütung des beimpften Würze-Bouillon bei 27°C über 24 Stunden im Schüttelkolben erfolgte die visuelle prozentuale Ermittlung der Askosporen durch die Auszählung mittels Thoma-Zählkammer.

3.5. Testmethoden zur Parametrierung von Kurzzeiterhitzern und Pasteuren

Um die Parametrierung von Kurzzeiterhitzungsanlagen und Pasteuren vornehmen zu können, wurde die aus den D- und z-Werten in separaten Untersuchungen ermittelte Hitzeresistenz der Getränkeschädlinge, in Abhängigkeit von der Keimvorbelastung und der Getränkesorte, der Berechnungsgrundlage zugrunde gelegt. Hierfür wurde die Pasteurisationsformel mit der Referenztemperatur 80 °C als Basis zur Bestimmung der letalen thermischen Inaktivierungsenergie für die jeweiligen logarithmischen Abtötungsraten zwischen log 1 und log 5 herangezogen und eine Übersichtstabelle erstellt.

Da in der Praxis Unsterilitäten festgestellt wurden, bei denen das zu pasteurisierende Produkt Gasblasen während der Sterilisationsphase aufwies, musste hier ein Zusammenhang bestehen, da der Wärmeübergang bei der Pasteurisation nur für flüssige Medien ausgelegt ist. Um die Funktionalität der Pasteure als "Thermische Firewall" sicher zu stellen, wurde die potentielle mikrobiologische Infektionsquelle der Gasblasen messtechnisch erfasst. Dies konnte mit einem speziell hierfür konzipierten Trübungsdetektor ermöglicht werden, der selbst Mikroblasen erfassen konnte. Mit diesen Messwerten konnte damit erstmalig mittels "Inline-Messtechnik" eine mikrobiologische Infektion indirekt bestimmt werden, da parallel hierzu die entsprechenden

mikrobiologischen Vergleichsuntersuchungen durchgeführt wurden. Basierend auf den bei Betriebsrevisionen durchgeführten separaten Untersuchungen wurden beispielhafte Konfigurationskriterien für Kurzzeiterhitzungsanlagen aufgestellt, um eine Getränkesterilität der zur kaltseptischen Abfüllung anstehenden Produkte sicher zu stellen.

3.6. Retentionstesttest u. Spritzschattentest

Der vom Verfasser eingeführte Spritzschattentest, auf Basis einer Suspension von Kieselgur bzw. auch eingefärbten Zuckerlösungen [137], hatte durch das abrasive Verhalten und den Nährstoffeintrag auf die Maschinenoberflächen sowie die Induzierung des Wachstums von Getränkeschädlingen eindeutige Nachteile. Um diese Mängel bzw. mikrobiologischen Risiken zu eliminieren, wurde daher ein nicht abrasives universell einsetzbares Medium entwickelt, das nicht von Mikroorganismen verstoffwechselt wird, rasch antrocknet und auch leicht abgespült bzw. abgespritzt werden kann. Hierzu mussten umfangreiche Testserien durchgeführt werden, um die Tauglichkeit für die Praxis zu erproben. Des Weiteren wurden wissenschaftlich abgesicherte Testserien zur Überprüfung auf ein potentiell mikrobiologisches Wachstum mit ausgesuchten Teststämmen durchgeführt [130].

3.7. ATP-Test

Der ATP-Test dient dem Nachweis von organischem Material an Maschinenoberflächen, demnach Getränke- bzw. Produktresten und auch Mikroorganismen. Für den ATP-Test wurden Vergleichswerte ermittelt, um die Messergebnisse in Form der Relative Light Units (gezählte Lichtblitze) zur mikrobiologischen Befundlage interpretieren zu können.

Richtwerte	RLU
Blindwert	< 25
kritisch	> 100
toleriert	50 - 100
akzeptabel	< 50

Bei einer Emission von unter 100 Relative Light Units (RLU) ist die Fläche, von der diese Probe mittels Abstrichupfer genommen wurde, als gereinigt anzusehen. Als Richtwerte für kritische Bereiche wurden die oben stehenden RLU-Werte nach der sog. "Ampelfunktion" herangezogen. Diese ATP-Werte wurden mit der Abstrichmethode nach BACK [24] und dem neu entwickelten Retentionstest verglichen.

3.8. Optimierungen im Hygienic Design und in der Verfahrenstechnik

Bei den Betriebsberatungen und Untersuchungen sowie bei Inbetriebnahmen, Abnahmen, Begutachtungen sowie Revalidierungen von aseptischen Abfüllanlagen wurden daher die vorliegenden diesbezüglichen Mängel bzw. Fehlerquellen aufgenommen, bewertet und Lösungsvorschläge ausgearbeitet. Zur Erkennung und Lokalisierung der konstruktiven Schwachstellen wurden mikrobiologische Abstrichproben und der neu entwickelte Retentionstest eingesetzt. Aus diesen Untersuchungsergebnissen wurden dann Lösungsvorschläge zur Verbesserung des hygienischen Designs erstellt.

3.9. Endpointtest - Überprüfung der Rehygienisierung im Reinraum

Zur Überprüfung der Entkeimungseffizienz im Sterilbereich der Verpackungs- und Abfüllmaschinen wird als Referenzmethode der Test nach der VDMA-Fachverbandsschrift 2003 Nr. 8 und 2008 Nr. 6 herangezogen [5, 116]. Hierbei wird überprüft, ob die lt. VDMA-Klassifizierung geforderten Keimreduktionsraten bei der Desinfektion und Sterilisation an den Maschinenoberflächen im Innenraum eingehalten werden. Für die Praxis ist dieser Test jedoch sehr umständlich und nicht für die Überprüfung kompletter Reinigungsprogramme auf alkalischer Basis geeignet, da die Aluminiumfolien teilweise angelöst werden und Wasserstoff (Knallgas) entstehen würde. Eine Lösung dieser Problematik wurde daher in der Weiterentwicklung dieser Überprüfungsmethodik gefunden, indem die Teststreifen aus einem zertifizierten Edelstahlblech gefertigt, diese mit nur einer Log-Stufe inokuliert und mit Saugnäpfen statt mit Klebebändern im Reinraum fixiert wurden. Als Transportmittel für die Teststreifen wurden nach dem Reinigungs- und Sterilisationsprozess transparente Preforms eingesetzt, die im Labor mit Nährbouillon aufgefüllt, bebrütet und ausgewertet wurden. Der modifizierte und weiter entwickelte Endpointtest wird wie folgt durchgeführt:

Verwendete Keimträger:

- Edelstahlplättchen (zertifiziertes VA-Blech, vgl. Tabelle 7)
- Teststamm *Bacillus subtilis* Sporen (DSM 4181)
- Beimpfung punktförmig (Inokulation)
- Keim-Konzentrationen $\log 10^3, 10^4$ und 10^5
- Transport in transparenten 1,5 Liter Preforms

Handling der Teststreifen im Maschineninnenraum

- Positionierung von Saugnapf-Klammern (Wolfcraft) im Innenraum
- Entnahme der Edelstahl-Teststreifen mittels steriler Pinzette
- Befestigung der Edelstahlplättchen an den Klammern
- Start Reinigung (alkalisch, sauer), Desinfektion bzw. Sterilisation

- Bereitstellung steriler, transparenter 1,5 Liter Preforms
- Öffnen der Klammern mit den fixierten Edelstahl-Teststreifen
- Abnahme der Teststreifen mittels steriler Pinzette
- Überführung in die Preforms und Verschließen der Transporteinheiten

Keimzahlbestimmung der Ausgangskonzentration (Transportkontrollen)

- Überführen der einzelnen Edelstahlbleche in 100 ml Ringerlösung mit 0,1 % Tween 80
- Ablösen der Keime durch Reagenzglas-Schüttler mit Glasperlen im Ultraschallbad
- Gussplattenverfahren, Caso-Agar, Bebrütung: 1 bis 2 Tage bei 30 °C

Prüfung der in der Anlage desinfizierten Edelstahlplättchen

- Auffüllen der Preforms und der einzelnen Bleche mit Glucose-Pepton-Lösung
- Ablösen der Keime durch Schütteln mit Glasperlen und Behandlung im Ultraschallbad
- Bebrütung: 3 bis 5 Tage bei 30 °C
- Ausstrich auf Caso-Agar zur Überprüfung der gefundenen Keime
- Mikroskopie

Auswertung und Berechnung

- gemäß VDMA-Merkblatt Nr. 8, Juli 2003: "Prüfung von Aseptikanlagen: Entkeimung des Sterilbereichs des Maschinenraums" [5]

3.10. Standtest / Challengetest

Vor der ersten Produktion sollte und muss ein Standtest durchgeführt werden, um das Verkeimungsrisiko innerhalb der Gesamtanlage zu bewerten. Des Weiteren muss sicher gestellt sein, dass die Reinigung und Sterilisation für die innere und äußere Hygiene aufeinander abgestimmt und ausreichend sind. Zur Überprüfung der Funktion des Gesamtsystems wird daher in der Regel der Sterilpuffertank mit sterilisiertem Produkt oder Nährmedium angefüllt und 48 bis 72 h stehen gelassen. Nach dieser Inkubationszeit werden mikrobiologische Proben entnommen und auf Wachstum, Gasbildung, Trübung und/oder Bodensatz untersucht. Zur Überprüfung wird unter normalen Produktionsbedingungen eine bestimmte Menge Verpackungen abgefüllt. Der Probenahmeumfang wird individuell festgelegt. Diese Methodik lässt jedoch keine Rückschlüsse auf die Integrität des gesamten Systems zu, da die Kurzzeiterhitzungsanlage nicht in Produktionsstatus ist und auch das nachgeschaltete Rohrleitungssystem inkl. Füllkessel nicht mit betrachtet wird.

Es wurde daher eine entsprechende neue mikrobiologische und verfahrenstechnische Untersuchungsmethode zur Überprüfung des Gesamtsystems entwickelt. Im Speziellen wurde die KZE-Anlage über 72 h im Produktionsprozess belassen (Kreislauf-Wasser). Das abzufüllende Getränk wurde unter Produktionsbedingungen vom KZE-Übergabeventil im Puffertank und dem Ventilknoten bis in den Füllerkessel stehen gelassen. Diese Inkubation stellt somit einen simulierten "GAU" einer Betriebsstörung dar und wird durch entsprechende Stufenkontrollen sowie die mikrobiologischen Verprobungen bzw. einer Standprobe von dann nur zu 50 % befüllten Flaschen bewertet (geringere Produktverluste und Erhöhung der mikrobiologischen Empfindlichkeit des abgefüllten Produktes).

3.11. Transportkontrollen

Die sog. Transportkontrollen dienen der Ausgangskeimzahlbestimmung bei der Durchführung der Keimreduktionstests (Count-Reduction-Test). Hierbei durchlaufen inokulierte Flaschen bzw. Verschlüsse als Vergleichsprobe den gesamten Probenversand, ohne jedoch den Entkeimungsprozess zu durchlaufen. Sie dienen dann zur Ermittlung der dem Keimreduktionstest zugrunde liegenden Ausgangsbelastung des Probenmaterials.

3.12. Keimreduktionstest

Beim Keimreduktionstest (CRT) durchlaufen die mit den Sporen des Testkeims künstlich verkeimten Packmittel (Inokulation) die Aseptik-Anlage. Dabei wird die Anzahl der lebensfähigen Mikroorganismen vor und nach dem Passieren der Entkeimungsvorrichtung bestimmt und aus der Differenz der Keimzahlen die Abtötungsrate ermittelt. Obwohl vorgegebene Keimreduktionsraten in üblichen Lieferverträgen zur Endabnahme der Abfüllanlagen als k.o.-Kriterium herangezogen werden, fehlen statistisch abgesicherte Toleranzbereiche für die mittlere logarithmische Keimreduktion (MLK). Die aus Abnahmen und Versuchen ermittelten Daten wurden daher statistisch aufbereitet, um die Streuungen zwischen den unterschiedlichen mikrobiologischen Laboratorien sowie innerhalb der einzelnen Messserien zu ermitteln [138, 139].

3.13. Medien zur Anreicherung und Validierung

Für die Inbetriebnahmen, Steriltests bzw. Validierungen aseptischer Abfülllinien werden unter Standard-Produktionsparametern entweder die mikrobiologisch empfindlichsten klaren Originalprodukte des Betriebes oder synthetische Medien zum Nachweis von Getränkeschädlingen eingesetzt. Unter anderem können nachstehende Medien verwendet werden:

- AVM – Aseptik-Validierungs-Medium, Fa. Döhler, zum Nachweis von Getränkeschädlingen im aseptischen Abfüllprozess bei Standard-Produktionsparametern [140]
- Linden-Grain-Medium mit Anpassung des pH-Werts nach BRÜCKLMEIER - Testmedium zur Überprüfung der aseptischen Leistungsfähigkeit [141]

Tabelle 7: Zertifikat für eingesetztes Edelstahlblech (Endpointtest)

acciai speciali termi
DIN 17441/97 ADHW2

05100 TERNI
V.LE BRUNA, 218
TEL. 0744/4901

1.2202025

ARTIFICATO DI COLLAUDO
INSPECTION CERTIFICATE
CERTIFICATE DE RECEPTION
ABNAHMEPRÜFZEUGNIS B'

EN 10204/3..1B

9923050

ACCIAI SPECIALI TERNI DEUTSCHLAND G

CURRERE
GRUNERSTRASSE, 133
CUSSELDORF
40239
GERMANIA

ORIGINE CLIENTE N°: K00581 K21
CLIENTE
GRUNERSTRASSE, 133
CUSSELDORF
40239
GERMANIA

COMUNE ART N°: 46990645
PANDPA LOGISTIK GMBH
AH OSTKAI 15-17
STUTTGART
70327
GERMANIA

COMUNE ART N°: CE07532B
70327
GERMANIA

AVV. B. FROST, N°:
AVV. VERPOTON N°:
VERANDERUNG N°:

PAG. 1

926/081278/01
1.4301

TÜV

DIN 50914

acciai speciali termi
926/081278/01
1.4301

acciai speciali termi s.p.a.
PENN-INDUSTRIE
INSPECTION SERVICE
UNTERBRODT 201 WEISSBACHSTRASSE

22-07-1999

STAINLESS STEEL COILS

VERWECHSLUNGSPRÜFUNG, OBERFLÄCHEN - UND MASSKONTROLLE : OHNE BEANSTANDUNG

INFORMAZIONE E / O ID + CC		MATERIALE E REAGENTI ALLA CONDIZIONE INTERMEDIARIA RECORD		MATERIALE E REAGENTI ALLA CONDIZIONE INTERMEDIARIA BILAN		DE OBSERVEANTE SCHIEDS ET RESUMEI BIJEN INTERMEDIARE KONTOREN DEZISE	
PROCESSO DI FABBRICAZIONE / MANUFACTURING PROCESS		MATERIALE / MATERIAL		MATERIALE / MATERIAL		MATERIALE / MATERIAL	
PROCEDURE D'ESAME / EXAMINATION PROCEDURE		MATERIALE / MATERIAL		MATERIALE / MATERIAL		MATERIALE / MATERIAL	
ERFOLGSKRITERIUM / SUCCESS CRITERIA		MATERIALE / MATERIAL		MATERIALE / MATERIAL		MATERIALE / MATERIAL	
511 CS INOX S.P.A.	511 CS INOX S.P.A.	511 CS INOX S.P.A.	511 CS INOX S.P.A.	511 CS INOX S.P.A.	511 CS INOX S.P.A.	511 CS INOX S.P.A.	511 CS INOX S.P.A.
HEAT TREATMENT - ANNEALING AIR - WATER COOLING	HEAT TREATMENT - ANNEALING AIR - WATER COOLING	HEAT TREATMENT - ANNEALING AIR - WATER COOLING	HEAT TREATMENT - ANNEALING AIR - WATER COOLING	HEAT TREATMENT - ANNEALING AIR - WATER COOLING	HEAT TREATMENT - ANNEALING AIR - WATER COOLING	HEAT TREATMENT - ANNEALING AIR - WATER COOLING	HEAT TREATMENT - ANNEALING AIR - WATER COOLING
WÄRMEBEHANDLUNG - ANNEALING LUFT - WASSERABKÜHLUNG	WÄRMEBEHANDLUNG - ANNEALING LUFT - WASSERABKÜHLUNG	WÄRMEBEHANDLUNG - ANNEALING LUFT - WASSERABKÜHLUNG	WÄRMEBEHANDLUNG - ANNEALING LUFT - WASSERABKÜHLUNG	WÄRMEBEHANDLUNG - ANNEALING LUFT - WASSERABKÜHLUNG	WÄRMEBEHANDLUNG - ANNEALING LUFT - WASSERABKÜHLUNG	WÄRMEBEHANDLUNG - ANNEALING LUFT - WASSERABKÜHLUNG	WÄRMEBEHANDLUNG - ANNEALING LUFT - WASSERABKÜHLUNG

RISULTATI DELLE PROVE / TEST RESULTS / RESULTATS DES ESSAIS / ERGEBNIS DER PRÜFUNGEN		TRACINGS / TRACES / ZÜHRSPUR		MATERIALE / MATERIAL		MATERIALE / MATERIAL	
DIMENSIONI / DIMENSIONS / DIMENSIONS		MATERIALE / MATERIAL		MATERIALE / MATERIAL		MATERIALE / MATERIAL	
MATERIALE / MATERIAL		MATERIALE / MATERIAL		MATERIALE / MATERIAL		MATERIALE / MATERIAL	
A50056	649518	1.00X1000	1.111C	4575	T	240	266
A50056	649518	1.00X1000	1.111C	4705	T	271	302
A50057	649518	1.00X1000	1.111C	4680	T	271	302
A50155	649922	1.00X1000	1.111C	4690	T	255	283
A50156	649922	1.00X1000	1.111C	4750	T	255	283
A50157	649922	1.00X1000	1.111C	4750	T	255	283

Qualität und Leistungsfähigkeit mit einer Nummer

HH HEUNERT

59484 Soest, Bielefeld 8
Tel. 02921/689-0 Fax 689-117

3.14. Inbetriebnahme- und Abnahmekriterien

Basierend auf durchgeführten Abnahmegutachten, Troubleshootingeinsätzen und Betriebsberatungen sowie der Mitwirkung des Verfassers in den Gremien des VDI-Richtlinienausschuss 4066 und im Arbeitskreis „Schnittstellenproblematik Aseptik“ im VDMA, sollte daher ein entsprechendes Dokument erstellt werden, das klare und verbindliche Abnahmekriterien definiert, um die Produktsicherheit bei UltraClean- und kaltseptischen Abfüllanlagen zu gewährleisten. Insbesondere sollte das Dokument nachstehende Aspekte berücksichtigen:

- Abnahmemodalitäten zur Aseptik, Mikrobiologie u. Hygiene
- Abnahmemodalitäten zur Technologie und Verfahrenstechnik
- Benetzungstests zur Oberflächenspannung / PET-Materialien
- Inbetriebnahme
- k.o.-Kriterien (definiert)
- Keimreduktionstest
- Kritische Kontrollpunkte (CCP)
- Mikrobiologische Verfahrenstechnik
- Pasteurisationskriterien
- Personalqualifikation und Personalschulungen
- Probenahmeplan
- Prozessüberwachung
- Rehygienisierungen
- Software zum Hygienestatus
- Spritzschatten- und Retentionstest
- Standtest / Challengetest
- Sterilttest
- Technische Dokumentation
- Validierungsabfüllung
- Verfahrenstechnische Beschreibung
- Verfügbarkeit und Ausnutzungsgrad der Abfüllanlage

3.15. Statistische Auswertungen

Bei der Durchführung von Versuchen, insbesondere wenn es sich um praxisorientierte Messergebnisse handelt, gibt es eine Reihe potentieller Fehler. Dabei handelt es sich zum einen um systematische Fehler, zum anderen um zufällige Fehler. Diese Fehler bei der Auswertung der Keimreduktionstests und der zugehörigen Transportkontrollen galt es zu erkennen und in der Auswertung der Versuchsergebnisse zu berücksichtigen. Für

Ereignisse mit einem kleinen Stichprobenumfang gibt daher die mathematische Statistik Lösungsmöglichkeiten über Wahrscheinlichkeitsaussagen in Form der Ermittlung von Konfidenzintervallen; z. B. der von 95,0 %. Dabei wird eine zufällige Stichprobe vom Umfang "n" aus der Grundgesamtheit aller theoretisch möglichen Ergebnisse, die bei identischen Voraussetzungen auftreten können, untersucht. [138, 139]. Die Messergebnisse und Auswertungen aus den durchgeführten Keimreduktionstests sowie der Transportkontrollen zur Bestimmung der mittleren logarithmischen Keimreduktion (MLK) wurden daher auf ihre Varianz bzw. Streuung hin untersucht. Im Falle eines Stichprobenumfangs von $n \rightarrow \infty$ würden sich für die Ergebnisse um den Mittelwert eine Normalverteilung mit genauer Standardabweichung ergeben. Ist dies der Fall, lässt sich integrativ die Wahrscheinlichkeit bestimmen, mit der ein Ergebnis im Vertrauensbereich des Ergebnisses liegt. Es wird von der Irrtumswahrscheinlichkeit α gesprochen.

(1)

$$P(|T| \leq \varepsilon) = \int_{\varepsilon^{-1}}^{\varepsilon} f_t(x) dx = P\left\{ \frac{|\bar{x} - \mu|}{s} \sqrt{n} \leq \varepsilon \right\} = 1 - \alpha$$

Vorstehende Gleichung beschreibt den Weg zu Berechnung der Wahrscheinlichkeit P, mit der ein Ergebnis im Rahmen des gewählten Vertrauensbereichs innerhalb der Dichteverteilung der Normalfunktion liegt. Dabei entspricht ε dem Quantil $t_{\alpha/2; n-1}$ der t-Verteilung nach Student mit n-1 Freiheitsgraden. Liegt eine unbekannte Streuung der Ergebnisse vor, muss der Vertrauensbereich, die Konfidenzintervalle, mathematisch ermittelt werden. Diese Vertrauensgrenzen geben die Werte an, die mit einer gewissen statistischen Sicherheit erreicht werden.

Zur Ermittlung dieser Grenzen diene daher nachstehende Gleichung. Es handelt sich dabei um die Vertrauensgrenzen $\hat{\mu}_{1,2}$ für den Mittelwert μ , die sogenannten Konfidenzintervalle für die statistischen Auswertungen der Keimreduktionstests.

(2)

$$\hat{\mu}_{1,2} = \bar{x} \pm \frac{s}{\sqrt{n}} t_{\alpha/2; n-1}$$

Das t ist dabei das Quantil der t-Verteilung nach STUDENT für die Freiheitsgrade $m = n-1$ und einer Irrtumswahrscheinlichkeit α [138, 139].

4. Ergebnisse und Diskussion – Teil 1: Thermische Inaktivierung

4.1. Ermittlung der Hitzeresistenz von Getränkeschädlingen (Isolate)

4.1.1 Betrieb R und J – *Pichia anomala*

In dem Fruchtsaftbetrieb R wurde eine kaltseptische Abfüllanlage in Betrieb genommen, die jedoch aufgrund von produzierten Schlechtflaschen nicht den hygienischen Anforderungen gerecht wurde [142]. Deshalb wurde veranlasst, dass der in der Anlage im Produkt Eistee-Pfirsich nachgewiesene Infektionskeim zur Bestätigung einer Identifizierung sowie eine Bestimmung der Hitzeresistenz vorgenommen wurde.

Als Infektionskeim wurde die Hefe *Pichia anomala* taxonomiert, die sowohl in der vegetativen Form wie auch in der sexuellen Form als Spore im betroffenen Produktionsbetrieb vorlag (vgl. Tabelle 8 u. Tabelle 9). Die ursprüngliche Bezeichnung von *Pichia anomala* war *Hansenula anomala*, so dass in den nachfolgenden Tabellen nur der z. Z. gültige Name aufgeführt ist. Im Betrieb J traten ebenfalls Infektionen durch eine Hefe auf, welche die Pasteurisation überlebten. Der Infektionskeim wurde wiederum als *Pichia anomala* taxonomiert (vgl. Tabelle 10 u. Tabelle 11).

Tabelle 8: Identifizierung von *Pichia anomala* (VLB-Berlin 02)

Analyse Nr.:67a/02 / VLB-Berlin Forschungsinstitut f. Mikrobiologie				
Isolation und Identifizierung von Infektionskeimen				Betrieb R
Probenverarbeitung vom 16.07.2002				
Probe 1	Sirup	Eistee Pfirsich	Tank 830	AN 88617
Probe 2	Grundstoff	Eistee Zitrone	Tank 822	Unfiltrat
Probe 3	Konzentrat	Apfelsaft	Tank 829	Zusatzwasser f. ASK
Probe 4	Zucker	Flüssigzucker	Tank 800	Zentralversorgung
Probe 5	Zucker	Flüssigzucker	Tank 801	Zentralversorgung
Identifizierung der Mikroorganismen				
Probe 1				
Probe 2				<i>Pichia anomala</i>
Probe 3				<i>Pichia anomala</i>
Probe 4				<i>Pichia anomala</i>
Probe 5				<i>Pichia anomala</i>
Voranreicherung: Schüttelkolben 100g in 500 ml Bouillon (2 % Lactat-Hefeextrakt-Lsg.) für 24 h bei 27 °C Je 50 ml membranfiltriert und den Filter als zweite Anreicherung im Schüttelkolben in 20 ml Bouillon(2 % Erythrit-Hefeextrakt-Lsg.) für 48 h bei 27 °C.				
Auswertung: Aus der Erythrit-Hefeextrakt Anreicherung wurden Ausstriche auf Würze-Agar angelegt; Bebrütung 72 h bei 27 °C				

Tabelle 9: Identifizierung von *Pichia anomala* (VLB-Berlin 02)

Analyse Nr.:42/00 / VLB-Berlin Forschungsinstitut f. Mikrobiologie				
Isolation und Identifizierung von Infektionskeimen				Betrieb R
Probenverarbeitung vom 29.04.2002				
Probe 1	0,5 L PET	Reklamation	Eistee Pfirsich	(MHD 09.09.2002/04:08)
Probe 2	0,5 L PET	Reklamation	Eistee Pfirsich	(MHD 09.09.2002/06:50)
Probe 3	0,5 L PET	Reklamation	Eistee Zitrone	(MHD 04.10.2002/18:28)
Probe 4	0,5 L PET	Reklamation	Eistee Holunder	(MHD 09.09.2002/06:50)
Gesamtkeimzahl (Thomakammer)			Identifizierung der Mikroorganismen	
Probe 1		2,1 · 10 ⁸ KBE/ml		
Probe 2		3,3 · 10 ⁸ KBE/ml	<i>Pichia anomala</i>	
Probe 3		3,3 · 10 ⁸ KBE/ml		
Probe 4		2,3 · 10 ⁸ KBE/ml		
Isolierte Hefen aus den vier Proben makroskopisch und mikroskopisch identisch. Cycloheximid sensitiv, Kahmhautbildung positiv, Wachstum im Vitamin freien Medium und auf 50% Glucose-Agar positiv. Komplettbestimmung aus Probe 2				

Tabelle 10: Identifizierung von *Pichia anomala* (Institut Romeis)

Analyse Nr.: 1497/M14222-1/06 / Institut Romeis				
Isolation und Identifizierung von Infektionskeimen				Betrieb J
Probenverarbeitung vom 28.12.2006				
Probe 1	0,5 L PET	Reklamation	Energydrink	(MHD 20.04.2007)
			Identifizierung des Mikroorganismus	
Probe 1			<i>Pichia anomala</i>	
Probe wies Fehlgeruch nach Lösemittel auf, Trübungspartikel als Kahmhaut identifiziert				

Tabelle 11: Identifizierung von *Pichia anomala* (TUM-WZW)

Analyse Nr.: EU 00033 – 07032 / TU München-Weihenstephan (WZW)				
Isolation und Identifizierung von Infektionskeimen				Betrieb J
Probenverarbeitung vom 31.01.2007				
Probe		Reklamation	Energydrink	(MHD 20.04.2007)
37				Petrischale (OFS-Agar)
38				Petrischale (OFS-Agar)
			Identifizierung des Mikroorganismus	
Probe				
37			<i>Pichia anomala</i>	
38			<i>Pichia anomala</i>	
Kolonien auf Petrischalen (OFS-Agar)				

4.1.2 Ermittlung der Hitzeresistenz von *Pichia anomala* (Askosporen)

Die Ermittlung der D- und z-Werte aus den Askosporen der Hefe (siehe 3.3.2) wurde sowohl im betroffenen Produkt Eistee im Betrieb "R" als auch als Referenz in einer Ringerlösung durchgeführt. Die ermittelten z-Werte von 18 °C in der Ringerlösung und 18,8 °C bzw. 22 °C im Eistee belegen wiederum die bisher nicht bekannte Hitzeresistenz der Askosporen von *Pichia anomala* (vgl. Tabelle 12 bis Tabelle 15).

Tabelle 12: Ermittlung z-Wert von *Pichia anomala* im Eistee (R-01)

Analyse Nr.: 2006/06 Institut für Lebensmittelhygiene Stroh						
Untersuchter Keim: <i>Pichia anomala</i> (Isolat) im Eistee-Pfirsich						Betrieb R
Bestimmung der z-Werte aus den ermittelten D-Werten						
Behandlungstemperaturen		D-Werte		log D-Werte		z-Wert
[T2]	65,0 °C	[D2]	17,0 min	[D2]	1,2304	22,0 °C
[T1]	87,0 °C	[D1]	1,7 min	[D1]	0,2304	

Tabelle 13: Ermittlung z-Wert von *Pichia anomala* in Ringerlösung (R-02)

Analyse Nr.: 2006/06 Institut für Lebensmittelhygiene Stroh						
Untersuchter Keim: <i>Pichia anomala</i> (Isolat) in Ringerlösung						Betrieb R
Bestimmung der z-Werte aus den ermittelten D-Werten						
Behandlungstemperaturen		D-Werte		log D-Werte		z-Wert
[T2]	65,0 °C	[D2]	20,0 min	[D2]	1,3010	18,0 °C
[T1]	75,0 °C	[D1]	5,5 min	[D1]	0,7443	

Damit wird auch erklärlich, dass bei den vorgegebenen Pasteurisationsparametern von 30 Sekunden bei 90 °C, respektive 30 PE (80 °C-Fruchtsaftformel), die letale thermische Dosis zur Sicherstellung einer getränkesterilen Abfüllung nicht gegeben ist. Anlässlich einer weiteren Untersuchung in dem Mineralwasserbetrieb "J" wurde als Reinfektionskeim ebenfalls die Hefe *Pichia anomala* nachgewiesen.

Tabelle 14: Ermittlung z-Wert von *Pichia anomala* im Eistee (R-03)

Analyse Nr.: 2006/06 VLB-Berlin						
Untersuchter Keim: <i>Pichia anomala</i> (Isolat) in Ringerlösung						Betrieb R
Bestimmung der z-Werte aus den ermittelten D-Werten						
Behandlungstemperaturen		D-Werte		log D-Werte		z-Wert
[T2]	85,0 °C	[D2]	12,8 min	[D2]	1,1072	18,8 °C
[T1]	95,0 °C	[D1]	3,8 min	[D1]	0,5763	

Tabelle 15: Ermittlung z-Wert von *Pichia anomala* im Eistee (J-04)

Analyse Nr.: 2006/06 VLB-Berlin					
Untersuchter Keim: <i>Pichia anomala</i> (Isolat) in Eistee					Betrieb R
Bestimmung der z-Werte aus den ermittelten D-Werten					
Behandlungstemperaturen		D-Werte		log D-Werte	
[T2]	53,0 °C	[D2]	1,51 min	[D2]	0,1790
[T1]	62,0 °C	[D1]	0,74 min	[D1]	0,1308
z-Wert					
29,1 °C					

Bei diesem Stamm wurde wiederum die Hitzeresistenz über die D- und z-Werte bestimmt. Der aus den D-Werten ermittelte z-Wert wurde mit 29,1 °C ermittelt. Auch hier wurden die zur sicheren Abtötung benötigten Pasteurisationseinheiten entsprechend angehoben.

4.1.3 Stimulationen zur Askosporenbildung von *Pichia anomala*

Die Ursache, wie und unter welchen Bedingungen die Hefe *Pichia anomala* Askosporenbildung induziert, konnte nur durch Stressphänomene erklärt werden. Aus diesem Grunde wurde die Situation "Eistee" simuliert, indem die Hefesuspension sowohl mit 2,0 %-vol sterilem Eistee-Sirup wie auch mit 2,0 %-vol Kaffee (800 ppm Coffein) beaufschlagt wurde. Das Coffein (auch Koffein, Teein oder Thein genannt) ist ein Alkaloid aus der Stoffgruppe der Xanthine und wird den psychoaktiven Drogen aus der Gruppe der Stimulanzen zugeordnet.

Hierbei wurde die Vorzucht von *Pichia anomala* in Eistee vorgenommen. Die Auslösung der spontanen Sporulation erfolgte durch mit üblichem tischfähigem Tee (ca. 480 ppm Coffein) und Kaffee (ca. 800 ppm Coffein) versetzten YPD-Agar sowie auch durch die Zugabe von Eistee-Sirup, demnach einer Erhöhung der Teein-Konzentration, in die Eistee-Lösung. Dabei zeigte sich, dass ca. 10 % der vegetativen Zellen spontan sporulierten, wie mikroskopisch ermittelt wurde. Im mikroskopischen Bild ließ sich im Versuchsansatz des mit einem Zusatz von 2,0 %-vol üblichen tischfähigem Tee (ca. 480 ppm Coffein) versehenen YPD-Agar eine Beeinträchtigung des Kolonienwachstums (Kleinkolonien) feststellen. Somit kann festgestellt werden, dass bereits minimale Mengen an Coffein eine Stresssituation für die Hefe darstellen und die Sporulation damit induziert werden kann (vgl. Tabelle 16).

Tabelle 16: Sporulation von *P. anomala* durch Zellgifte Teein und Koffein

Analyse Nr.:67B / 02 / VLB-Berlin Forschungsinstitut f. Mikrobiologie				
Untersuchungen zum Stressphänomen				Betrieb R
Probenverarbeitung vom 29.04.2002 /				
<i>Pichia anomala</i>				
Auslösung Sporulation / Askosporenbildung				
	Sirup	Tee	Kaffee	Eistee normal
	[2,0 %]	[2,0 %] ca. 480 ppm Coffein	[2,0 %] ca. 800 ppm Coffein	
Stamm 0119 (TUB)	+++	+	+++	+
Wildfang (Betrieb R)	+++	+	+++	+

Ein weiterer in der Praxis beobachteter Auslöser zur spontanen Askosporenbildung durch Dehydrierungen war das Antrocknen von Produkten in den Bereichen der Anlagenoberflächen, Ventilknoten und Tankdomen. Der Vermutung, dass sich *Pichia anomala* in den zur Untersuchung gesandten Proben lokalisieren lässt, bestätigte sich in den veranlassten Untersuchungsergebnissen [58]. Um dieses in der Praxis beobachtete Phänomen der Askosporenbildung durch Dehydratisierungen nachzustellen, wurde daher im Labormaßstab eine Stresssituation der *Pichia anomala* simuliert. Hierzu wurde eine Versuchsanordnung dahin gehend aufgebaut, dass die Dehydrierung durch ein Auftrocknen auf dem hierfür eingesetzten Dehydratisierungsmedium "Toastbrot" nachgestellt werden konnte (vgl. Tabelle 17)

Tabelle 17: Sporulation von *P. anomala* durch Dehydratisierung

Analyse Nr.:104 / 02 / VLB-Berlin Forschungsinstitut f. Mikrobiologie				
Untersuchungen zum Stressphänomen				Betrieb K
Probenverarbeitung vom 29.10.2002				
<i>Pichia anomala</i>				
Auslösung Sporulation / Askosporenbildung				
	Toastbrot		Malzextrakt-Agar (5 %)	
	(n. 2 Tage)	(n. 5 Tage)	(n. 7 Tage)	(n. 14 Tage)
Wildfang (Betrieb K)	negativ	positiv	negativ	positiv
Askosporenausbildung durch Dehydratisierung / Laborbestätigung Praxisbedingungen				

In diesem Versuchsaufbau wurde eindeutig nachgewiesen, dass *Pichia anomala* spontan sporulieren kann, wenn diese auf trockene Nährböden (Toastbrot und 5 % Malzextrakt-Agar) übergeimpft wird. Die Vorzucht von *Pichia anomala* erfolgte auf YPD-Bouillon und anschließender Aufbringung auf Toastbrot und 5 % Malzextrakt-Agar bei 26,0 °C. Die

Askosporen auf Toastbrot waren nach 5 Tagen und auf dem Malzextrakt-Agar nach 14 Tagen positiv im Sinne einer Sporulation. Damit ist der Beweis erbracht worden, dass eine stressbedingte Sporulation und damit Askosporenbildung der *Pichia anomala* durch Dehydratisierungen erfolgt. Dies wird dadurch erklärt, dass dieser Organismus in eine Stress-Situation gelangt, wenn z.B. ein Hungermedium vorliegt. Möglicherweise wird auch die Hitzeresistenz durch den resultierenden niedrigen a_w -Wert sogar erhöht [38, 40-43].

Bedingt durch die höhere Hitzeresistenz dieser Askosporen, können diese dann den Pasteurisationsprozess, aber auch wie bereits früher gezeigt wurde einen Backprozess, überstehen, auskeimen und das Fehl aroma Ethylacetat bilden [65]. Zwar finden sich in der Literatur Hinweise auf lösungsmittelartige Geschmacks-Beeinträchtigungen durch das von *Pichia anomala* gebildete Ethylacetat [65, 143], nicht jedoch Hinweise auf die durch Stress bedingten Auslösefaktoren für die gebildeten hitzeresistenten Askosporen [143, 144]. Die Askosporen der *Pichia anomala* können somit nachweislich und durch Laborversuche bestätigt, bedingt durch die nun vorliegende und erstmals festgestellte erhöhte Hitzeresistenz die Kurzzeiterhitzungsanlage lebend passieren, die Kohlenstoffquellen verwerten und Ethylacetat bilden [59, 65, 143, 144].

4.1.4 Betrieb W – *Saccharomyces diastaticus*

Bei in der Brauerei "W" durchgeführten Untersuchungen zur Infektionsursache [145] wurde als Kontaminationskeim im pasteurisierten Bier *Saccharomyces diastaticus* identifiziert und taxonomiert (vgl. Tabelle 18). Dieser Mikroorganismus bildet u. a. aus Ferulasäure 4-Vinylguajakol, das als typisches Weizenbieraroma (nelkenartig) bekannt ist [24, 25]. Die Fremdhefe wurde u. a. aus Beprobungen der Umkehrosmose-Anlage zur Entalkoholisierung des Diätbiers und aus einer Diätbier-Abfüllung isoliert.

Tabelle 18: Taxonomierung von *Saccharomyces diastaticus*

Analyse Nr.:32/00 / VLB-Berlin Forschungsinstitut f. Mikrobiologie				
Isolation und Identifizierung von Infektionskeimen				Betrieb W
Probenverarbeitung vom 23.03.2000				
Probe A	0,5 NRW	Reklamation	Bier (alkoholfrei)	(Rückstellproben)
Probe B	0,5 NRW	Reklamation	Bier (alkoholfrei)	(Rückstellproben)
Gesamtkeimzahl (Thomakammer)			Identifizierung der Mikroorganismen	
Probe A		1,1 · 10 ⁵ KBE/ml	<i>Saccharomyces diastaticus</i>	
Probe B		1,9 · 10 ⁵ KBE/ml	<i>Saccharomyces diastaticus</i>	
Die Stärke-Vergärung und Stärke-Assimilation war nach 5 Tagen negativ, Die Vergärung im endvergorenem Bier mit Zusatz von 2 % Dextrin war nach 5 Tagen positiv				
Die Identifizierung erfolgte mittels morphologischer Untersuchungen, Auxonogramm, Fermentationen und Assimilationen in verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen Literatur: Lodder, J. - The Yeasts (1970) [63], N.J.W. Kreger-van Rij - The Yeasts (1984) [64], Barnett, Payne and Yarrow - Yeasts (2000) [65]				

Auch hier war wiederum im mikroskopischen Bild ein Anteil von 5 bis 10 % an Askosporen zu erkennen. Um weitere Hinweise zur vermuteten Hitzeresistenz des isolierten Hefestammes *Saccharomyces diastaticus* zu erhalten, wurde daher zur Bestätigung eine D- und z-Wert-Bestimmung der Askosporen und vegetativen Zellen von *Saccharomyces diastaticus* durchgeführt. Dabei wurden die von Natrium-Acetat-Agar abgeschwemmten Askosporen und vegetativen Hefezellen (Würze-Agar) 30 min bei 60° C erhitzt, um die vegetativen Zellen abzutöten.

Die ermittelten D_{60} -Werte betragen bei den Askosporen *Saccharomyces diastaticus* 8,69 min und bei den vegetativen Zellen 6,4 min. Wie aus den Ergebnissen des durchgeführten Erhitzungstests ermittelt, sind die Askosporen hitzeresistenter als die vegetativen Zellen.

Demnach reichten die eingestellten Pasteurisationseinheiten im Betrieb von 28,0 PE (60 °C-Formel) zu deren Abtötung nicht aus, um ein getränkesteriles Produkt sicher zu stellen. Erst nach entsprechender Anhebung der Pasteurisationseinheiten konnte die KZE-Anlage als "Mikrobiologische Firewall" ihrer Aufgabe gerecht werden und ein getränkesteriles Produkt zur Abfüllung bereit stellen.

4.1.5 Betrieb E, D und C – *Alicyclobacillus* sp.

Der bereits in der Literatur als sporenbildender, säuretoleranter und hitzeresistenter Mikroorganismus unter der Bezeichnung *Alicyclobacillus* sp. beschriebene Getränkeschädling [48, 60, 61, 146, 147] wurde mehrfach bei Untersuchungen in Mineralwasser- und Fruchtsaftbetrieben [54, 55, 148] lokalisiert.

Tabelle 19: Identifizierung von *Alicyclobacillus* sp. (01)

Analyse Nr.144 - 01 / VLB-Berlin Forschungsinstitut f. Mikrobiologie				
Isolation und Identifizierung von Infektionskeimen				Betrieb D / C
Probenverarbeitung vom 04.10.2001				
Probe 14		Becher	AS-Konzentrat	(Rückstellproben)
Probe 15		Becher	AS-Konzentrat	(Rückstellproben)
Probe 17		Becher	AS-Konzentrat	(Rückstellproben)
Verdünnung mit NaCl-Lösung (1:10)				
			Identifizierung der Mikroorganismen	
Probe 14		40 / 44 KBE / g	<i>Alicyclobacillus</i> sp.	
Probe 15		26 / 25KBE / g	<i>Alicyclobacillus</i> sp.	
Probe 17		28 / 31KBE / g	<i>Alicyclobacillus</i> sp.	

Zur Bestätigung der Vor-Ort-Ergebnisse wurden jedoch noch weitere Vergleichsuntersuchungen im Labor vorgenommen (vgl. Tabelle 19 bis Tabelle 22). Insbesondere bei Apfelschorlen und auch in stillen Apfel-Pfirsich-Rhabarber-Getränken tritt der Getränkeschädling *Alicyclobacillus sp.* auf [48, 149-152].

Tabelle 20: Identifizierung von *Alicyclobacillus sp.* (02)

Analyse Nr.0009-772 (PN 190903) / Chelab – Chemisches Laboratorium				
Isolation und Identifizierung von Infektionskeimen				Betrieb D
Probenverarbeitung vom 26.09.2000				
Probe 1		Flasche	AS-Konzentrat	(Rückstellprobe)
Identifizierung der Mikroorganismen				
Gesamtzellen		0,965 / ml	<i>Alicyclobacillus sp.</i>	
Lebende Zellen		0,092 / ml		
davon Zellen		0,000 / ml		
davon Sporen		0,920 / ml		
Tote Zellen		0,893 / m		
Die Untersuchung auf <i>Alicyclobacillus sp.</i> erfolgte durch die FCM-Methode zur Quantifizierung und Differenzierung				

Tabelle 21: Identifizierung von *Alicyclobacillus sp.* (03)

Analyse Nr. P 0800611 / Institut f. Lebensmittelhygiene Stroh				
Isolation und Identifizierung von Infektionskeimen				Betrieb G
Probenverarbeitung vom 16.10.2008				
Probe 1	1,5 Liter	PET-Flasche	Naturel Apfel	(Schlechtflasche 088145)
Probe 2	1,5 Liter	PET-Flasche	Naturel Apfel	(Schlechtflasche 005529)
Probe 3	1,5 Liter	PET-Flasche	Naturel Apfel	(Vergleich MHD 05.04.09)
Identifizierung der Mikroorganismen				
P 08/00611-1	pH 3,7 / klar, keine Ausfällung		<i>Alicyclobacillus sp.</i>	
P 08/00611-2	pH 3,7 / klar, fransige Partikel		<i>Alicyclobacillus sp.</i>	
P 08/00611-3	pH 3,9 / klar, Sensorik o. B.		ohne Befund	
Mikroskopische Prüfung der Partikel: Geflecht aus in langen Ketten gewachsenen, stäbchenförmigen Bakterien, durchsetzt von amorphen Partikeln.				
Die Wachstumsprüfung auf <i>Alicyclobacillus sp.</i> der in dem Spezialmedium BAT-Bouillon (3 Tage / 42°C) angewachsenen Keime auf BAT-Agar wurde bei 42°C / 3 Tage sowie bei 50°C, 55°C und 60°C durchgeführt. Die Untersuchung wurde in Anlehnung der Methode No. 12 der International Federation of Fruit Producers (IFU) durchgeführt [131, 132].				

Tabelle 22: Lokalisierung von *Alicyclobacillus sp.* (01)

Analyse Nr. PET II v. 21.08.2008 / Betriebslaboratorium Betrieb "C"				
Isolation und Identifizierung von Infektionskeimen				Betrieb C
Probenverarbeitung vom 25.08.2008				
Probe 234 / 00:00	1,5 PET-Flasche	Apfel-Pfirsich-Rhabarber	(Tank 5 – Ende Abfüllung)	
Probe 334 / 02:02	1,5 PET-Flasche	Apfel-Pfirsich-Rhabarber	(Tank 5 – Ende Abfüllung)	
Identifizierung der Mikroorganismen				
Probe 234 / 00:00			<i>Alicyclobacillus spec.</i>	
Probe 334 / 02:02			<i>Alicyclobacillus spec.</i>	
Füllerrunden				
Produkt bei 46°C 4 Tage inkubiert.				
Plattengussverfahren (OSA 2,5 ml + BAT-A 1,0 ml). Bebrütung 2 Tage bei 46°C				

Bestimmungen zur Hitzeresistenz beim *Alicyclobacillus sp.* wurden bei diesem Wildfang aus dem Betrieb C nicht durchgeführt. Zur Beurteilung und Prozessoptimierung wurde daher auf Literaturhinweise zurückgegriffen [12, 35, 36].

4.1.6 Schlussfolgerung

Die aus den eigenen Laboruntersuchungen sowie den Bestätigungsanalysen ermittelten D- und z-Werte auf Basis 65 °C und 95 °C belegen, dass die in der Literatur vorliegenden Daten zur Hitzeresistenz zu niedrig angesetzt sind [51, 52]. Auch wurde bisher in der Praxis nicht genügend berücksichtigt, dass unter bestimmten Umfeldbedingungen Stressfaktoren ausgelöst werden können (Dehydratisierung, Zellgifte).

Unter diesen Umständen tritt bei einigen Hefestämmen eine nachgewiesene spontane Sporulation ein, so dass diese dann auch in der hitzeresistenteren Form als Askosporen vorliegen können. Nachdem unter optimalen Wachstumsbedingungen kaum eine Askosporenbildung zu verzeichnen ist, treten diese wohl nur in geringen Konzentrationen unter den kontaminierenden vegetativen Zellen auf, so dass eine Hitzeresistenz unter normalen Umständen statistisch kaum ins Gewicht fällt.

4.2. Ermittlung der Hitzeresistenz von ausgesuchten Teststämmen

Um eine wissenschaftlich abgesicherte Erklärung für das in der Praxis bei den Untersuchungen ermittelte Passieren von *Pichia anomala*, *Saccharomyces diastaticus* und *Alicyclobacillus sp.* durch Kurzzeiterhitzungsanlagen zu ermitteln, mussten von ausgesuchten Mikroorganismen deren Hitzeresistenzen ermittelt werden. Insbesondere aufgrund der Tatsache, dass *Pichia anomala*, *Saccharomyces diastaticus* und *Alicyclobacillus acidoterrestris* vor und nach den regulär mit 10,0 bis 19,0 PE betriebenen KZE-Anlagen in der Praxis nachgewiesen werden konnte, mussten entsprechende Untersuchungsserien durchgeführt werden, da sowohl die vegetative und sexuelle Form dieser Mikroorganismen in den Getränken vorlagen.

Mittels der in der Untersuchungsmethode vorgeschriebenen Korrelationsanalyse konnte eine Plausibilitätsüberprüfung der bei den Untersuchungen zur Hitzeresistenz an den ausgesuchten Teststämmen ermittelten D-Werte durchgeführt werden [27-30]. D-Wert-Bestimmungen mit einem Korrelationskoeffizient von $r^2 > 0,8$ wurden von der weiteren Betrachtung ausgenommen; siehe Markierungen (vgl. Tabelle 23 u. Tabelle 24).

Tabelle 23: Auflistung ermittelter Regressionen D- und z-Werte (1)

	[°C]	[D-Wert]	[r ²]	[°C]	[D-Wert]	[r ²]	[z-Wert]
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> (DSM 3922)							
alkoholfreies Bier	85,0 °C	11,2 min	0,9534	95,0 °C	4,0 min	0,9426	22,3
Eistee	86,5 °C	16,6 min	0,9633	95,0 °C	7,1 min	0,9777	23,1
O-Saft	86,5 °C	13,6 min			4,8 min	0,8462	19,9
Ringerlösung	86,0 °C	18,5 min	0,9788	95,0 °C	7,5 min	0,9320	23,0
<i>Lactobacillus lindneri</i> (Stamm-Nr. L 2)							
alkoholfreies Bier	59,0 °C	0,7 min	0,9624	69,0 °C	0,5 min	0,9756	54,8
Eistee	60,5 °C	1,1 min	0,9140	69,0 °C	0,7 min	0,9541	52,4
O-Saft	59,0 °C	0,8 min	0,9264	69,0 °C	0,4 min	0,9288	32,6
Ringerlösung	59,0 °C	1,2 min	0,9635	68,0 °C	0,7 min	0,9422	37,2
<i>Pichia anomala</i> (Stamm-Nr. P 27)							
alkoholfreies Bier	58,0 °C	0,4 min			0,1 min	0,9965	12,3
Eistee	57,0 °C	0,8 min	0,9584	68,0 °C	0,2 min	0,9963	14,7
O-Saft	58,5 °C	0,6 min	0,8468	67,0 °C	0,2 min	0,9238	17,8
Ringerlösung	58,0 °C	0,5 min	0,8588	67,0 °C	0,1 min	0,9758	15,2
<i>Saccharomyces diastaticus</i> (Stamm-Nr. S 22)							
alkoholfreies Bier	62,0 °C	1,3 min		67,5 °C	0,2 min	0,7959	7,4
Eistee	62,0 °C	1,5 min	0,7838	67,5 °C	0,3 min	0,8708	8,4
O-Saft	61,5 °C	1,2 min		67,5 °C	0,3 min	0,9464	10,3
Ringerlösung	62,0 °C	1,4 min		67,5 °C	0,2 min	0,9801	7,2

Tabelle 24: Auflistung ermittelter Regressionen D- und z-Werte (2)

	[°C]	[D-Wert]	[r ²]	[°C]	[D-Wert]	[r ²]	[z-Wert]
<i>Bacillus subtilis</i> (DSM 4181)							
alkoholfreies Bier	80,0 °C	50,3 min	0,8053	90,0 °C	10,7 min	0,8894	14,9
Eistee	80,0 °C	51,3 min	0,8246	90,0 °C	11,4 min	0,8781	15,3
O-Saft	80,0 °C	42,4 min	0,8822	90,0 °C	13,8 min	0,9269	20,5
Ringerlösung	80,0 °C	13,7 min	0,8316	90,0 °C	6,6 min	0,8251	31,3
<i>Lactobacillus frigidus</i> (Stamm-Nr. L 150)							
alkoholfreies Bier	50,0 °C	3,3 min	0,9472	60,0 °C	1,4 min	0,8209	27,9
Eistee	50,0 °C	5,6 min	0,9147	60,0 °C	1,0 min	0,8701	13,1
O-Saft	50,0 °C	11,9 min	0,8000	60,0 °C	2,3 min	0,8500	14,2
Ringerlösung	60,0 °C	3,9 min		60,0 °C	1,8 min	0,1389	35,5
<i>Lactobacillus lindneri</i> (Stamm-Nr. L 2)							
alkoholfreies Bier	59,0 °C	10,5 min	0,8186	69,0 °C	1,4 min	0,9590	11,2
Eistee	59,0 °C	3,5 min	0,9243	69,0 °C	1,4 min	0,9326	24,6
O-Saft	59,0 °C	22,3 min	0,8315	69,0 °C	3,0 min	0,8699	11,5
Ringerlösung	59,0 °C	15,3 min	0,9229	69,0 °C	1,8 min	0,8247	10,9
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404)							
alkoholfreies Bier	55,0 °C	8,9 min	0,8929	65,0 °C	1,0 min	0,7959	10,6
Eistee	55,0 °C	8,8 min	0,8836	65,0 °C	1,3 min	0,8708	11,9
O-Saft	55,0 °C	14,8 min	0,8662	65,0 °C	1,3 min	0,9464	9,5
Ringerlösung	55,0 °C	9,9 min	0,8615	65,0 °C	1,0 min	0,9801	10,1

Hierzu wurden die Teststämme sowohl bei zwei unterschiedlichen Temperaturen wie auch in den Medien alkoholfreies Bier, Eistee, Orangensaft und dem Referenzmedium Ringerlösung erhitzt, um den Einfluss auf verschiedene Getränkespezifikationen mit zu betrachten.

Für jeden untersuchten Keim wurde für die Betrachtungen zur Hitzeresistenz eine Tabelle mit den ermittelten D- und z Werten erstellt. Die erhaltenen z-Werte sind zum besseren Vergleich als Balkendiagramm aufgeführt.

4.2.1 Überlebenskurven der ausgesuchten Labor-Teststämme

Eine Überlebenskurve ist die grafische Darstellung der Sterberate (Mortalität) einer Population über die Zeit. Aus den Expositionsbedingungen der Versuchsserien bzw. den aus den beiden Temperaturen ermittelten spezifischen D-Werten, wurden die Abtötungskurven berechnet [49].

Die Abtötungskinetiken der eingesetzten Teststämme (vgl. Tabelle 6) wurden in Form von Diagrammen mittels linearer Trendberechnung für jedes Erhitzungsmedium – alkoholfreies Bier, Eistee, Orangensaft und Ringerlösung dargestellt.

4.2.2 *Bacillus subtilis* (DSM 4181)

Diese Mikroorganismen sind in ihrem pH-Optimum auch üblicherweise am hitzeresistentesten. In Ringerlösung zeigen die Sporen von *Bacillus subtilis* aufgrund des hohen pH-Wertes von 7,0 die höchste Hitzeresistenz.

Im Vergleich mit den anderen Testgetränken beeinflusst bei der Ringerlösung nur der pH-Wert die Hitzeresistenz. Orangensaft weist einen niedrigeren pH-Wert als Ringerlösung auf, der die Hitzeresistenz schwächt.

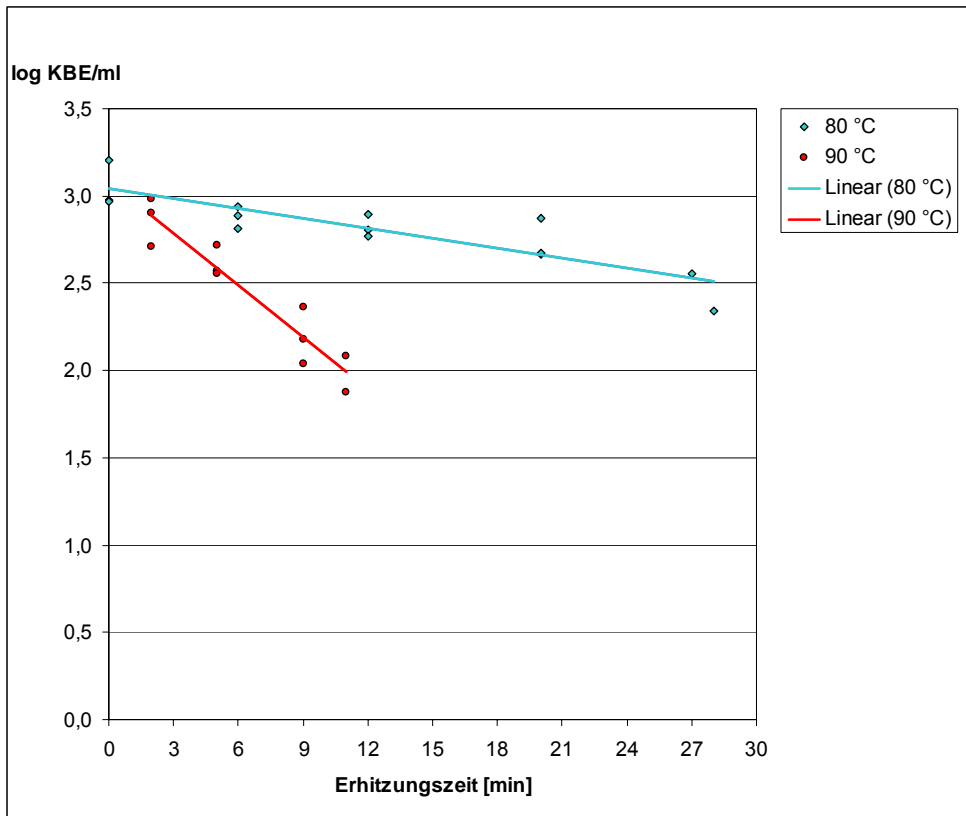


Abbildung 10: Überlebenskurve *Bacillus subtilis* in alkoholfreiem Bier

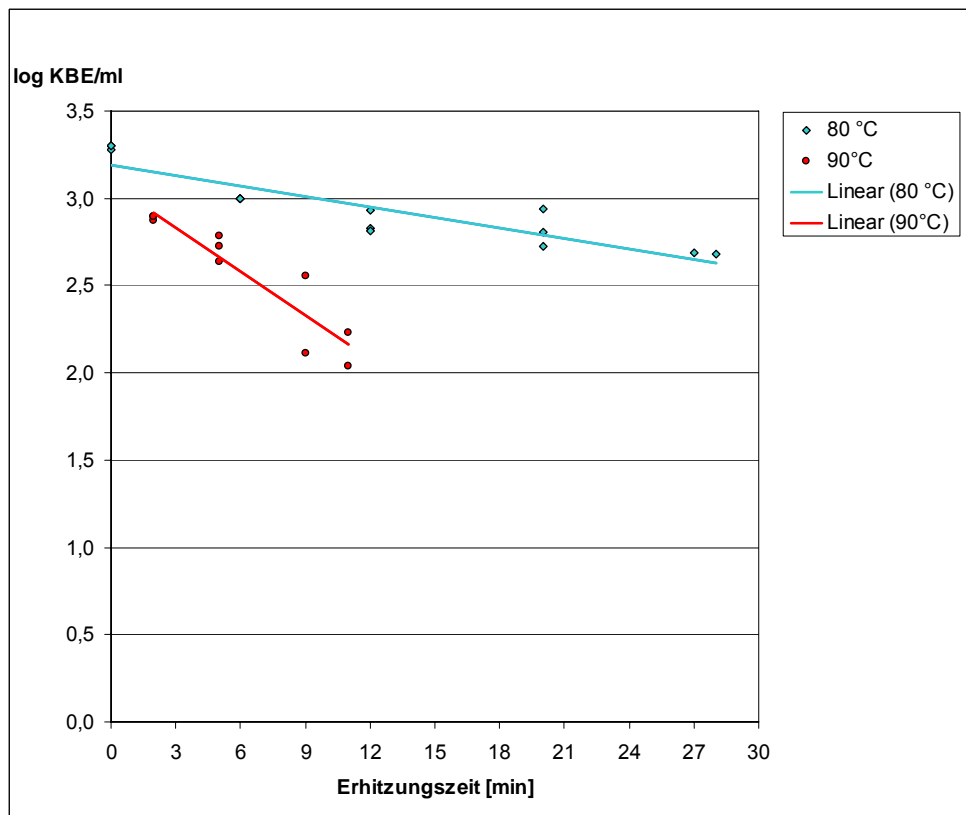


Abbildung 11: Überlebenskurve *Bacillus subtilis* in Eistee

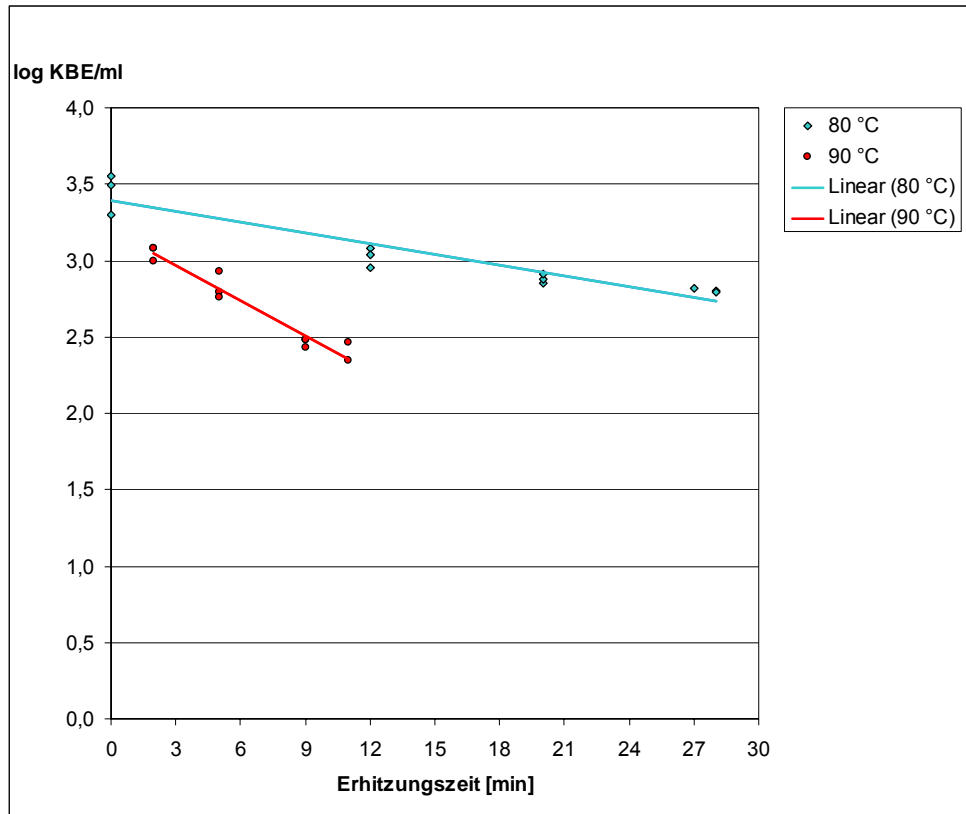


Abbildung 12: Überlebenskurve *Bacillus subtilis* in Orangensaft

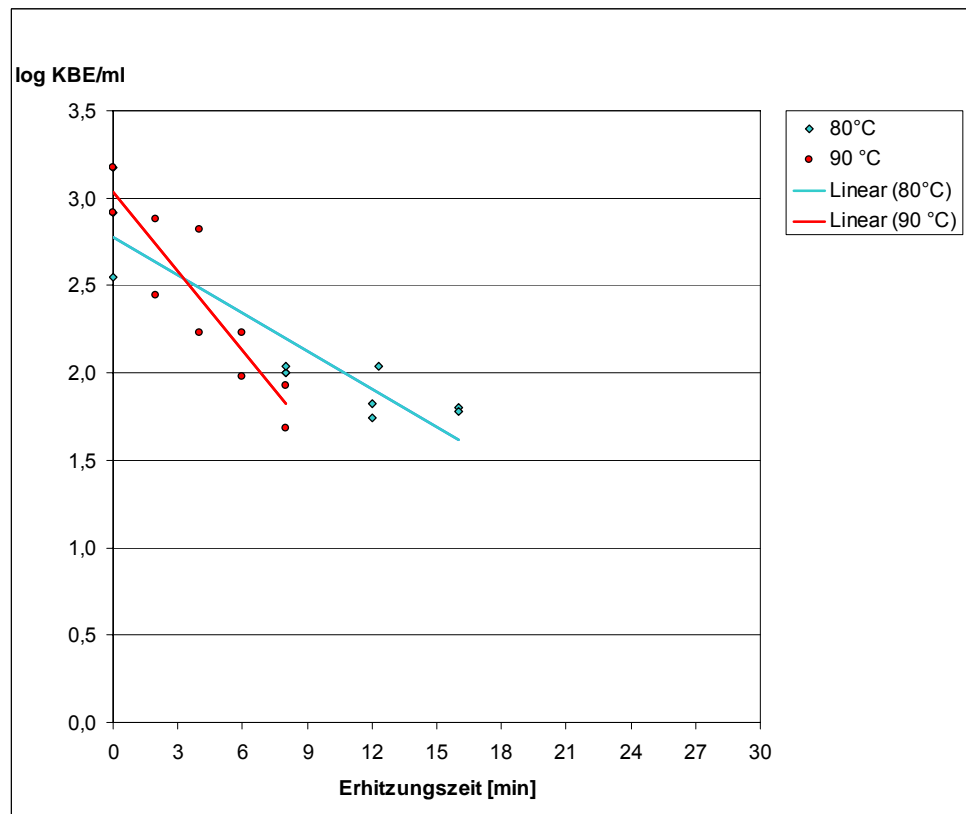


Abbildung 13: Überlebenskurve *Bacillus subtilis* in Ringerlösung

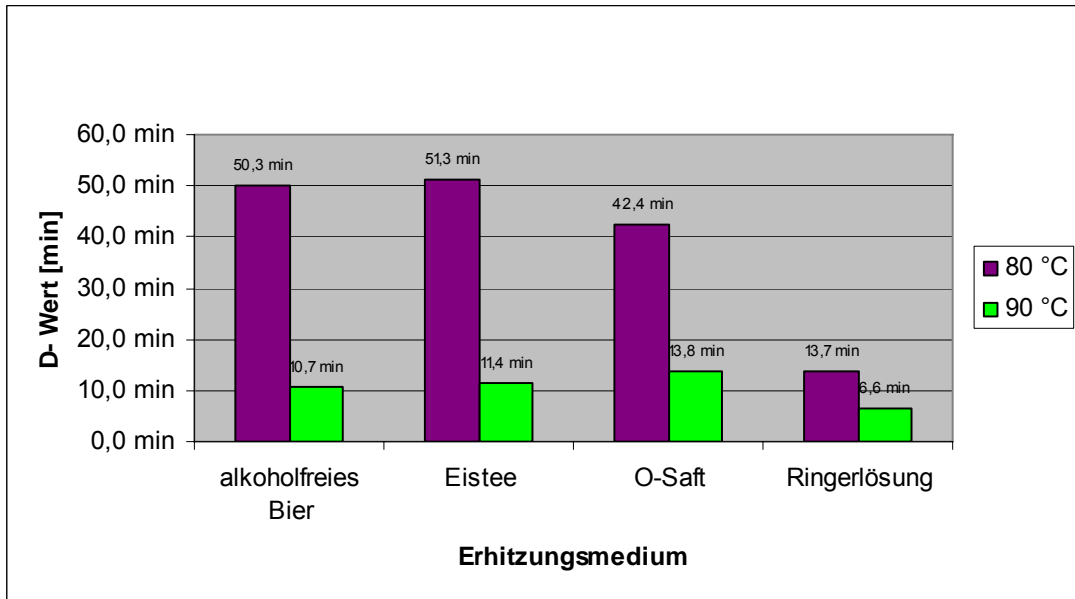


Abbildung 14: D₈₀ und D₉₀-Werte von *Bacillus subtilis*

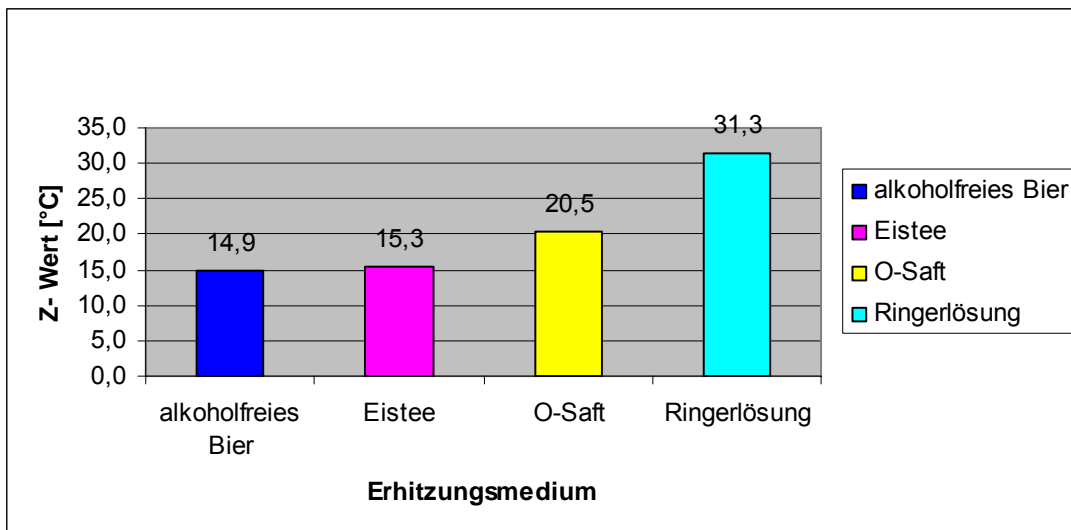


Abbildung 15: z-Werte von *Bacillus subtilis*

Die erhöhten Gehalte an Kohlenhydraten, Lipiden bzw. Proteinen bewirken jedoch höhere Hitzeresistenzen, als sie bei alkoholfreien Bieren oder Eistee gemessen wurden. Eistee besitzt im Vergleich zu den anderen Getränken einen mittleren pH-Wert von 4,65, so dass dadurch bedingt eine bessere Hitzeresistenz resultiert.

Hierbei bietet sich folgende Erklärungsmöglichkeit an, da Eistee zudem Kohlenhydrate und Lipide beinhaltet, welche wiederum die Hitzeresistenz erhöhen. Die Konzentration der Inhaltsstoffe reicht offensichtlich nicht aus, um eine vergleichbare Hitzeresistenz wie beim trübstoffhaltigen Orangensaft aufzubauen. Alkoholfreies Bier besitzt im Vergleich der untersuchten Getränke mit einem z-Wert von 14,9 °C die niedrigste Hitzeresistenz, da

sowohl ein niedriger Wert von pH 3,7 als auch wenig Resistenz erhöhende Inhaltsstoffe wie Kohlenhydrate oder Eiweiße vorliegen. Zudem enthält alkoholfreies Bier keine Lipide als Schutzfaktor gegen die Hitze (vgl. Abbildung 10 bis Abbildung 15.).

4.2.3 *Lactobacillus brevis* var. *frigidus* (L 150)

Die Hitzeresistenz von *Lactobacillus brevis* var. *frigidus* ist in alkoholfreiem Bier mit einem z-Wert von 27,9 °C sehr hoch. Durch das vorliegende Biermilieu findet der Keim offensichtlich die Bedingungen vor, die er bevorzugt. Der pH-Wert und die Inhaltsstoffe wie Eiweiße oder Kohlenhydrate liefern ein Umfeld, welches die Hitzeresistenz erhöht. Bei Orangensaft und Eistee sind die z-Werte mit 13,1 °C und 14,2 °C nahezu identisch.

Da *Lactobacillus brevis* var. *frigidus* Schleimkapseln ausbildet, erklären sich die hohen z-Werte durch deren Schutzfunktion. Im Vergleich mit Eistee hat Orangensaft zwar mehr Schutzkolloide, aber durch den tieferen pH-Wert von 3,0 °C gegenüber dem mittleren pH-Wert von Eistee von 4,65 °C können die Unterschiede ausgeglichen werden.

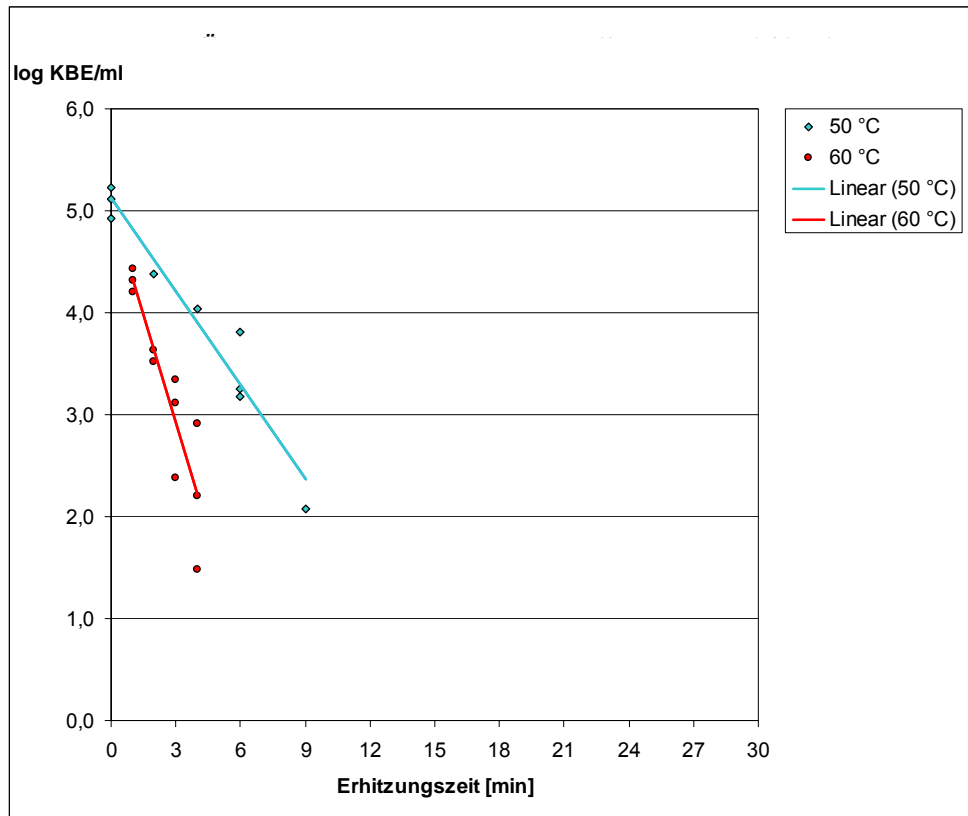


Abbildung 16: Überlebenskurve *Lactobacillus frigidus* in alkoholfreiem Bier

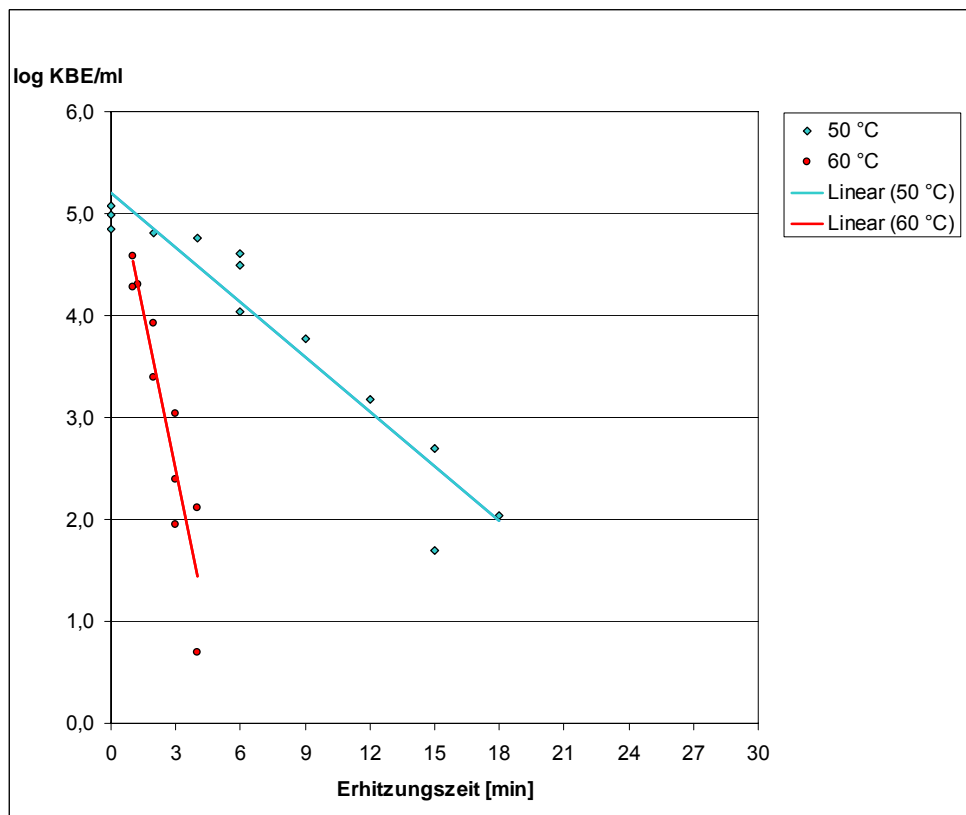


Abbildung 17: Überlebenskurve *Lactobacillus frigidus* in Eistee

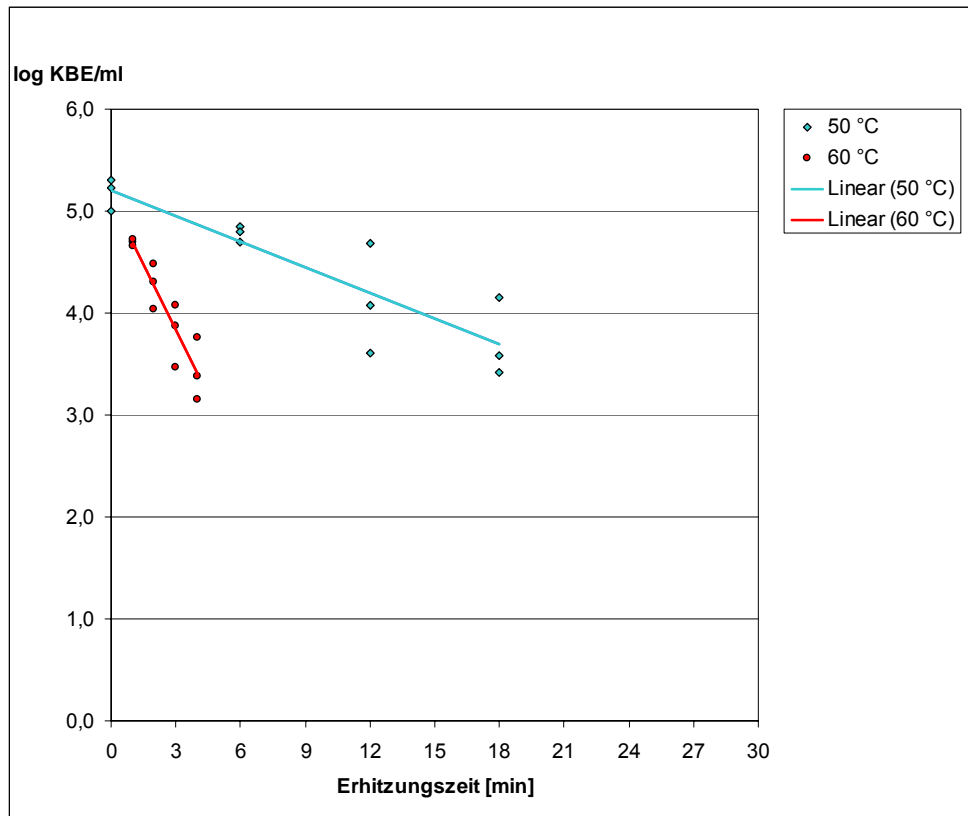


Abbildung 18: Überlebenskurve *Lactobacillus frigidus* in Orangensaft

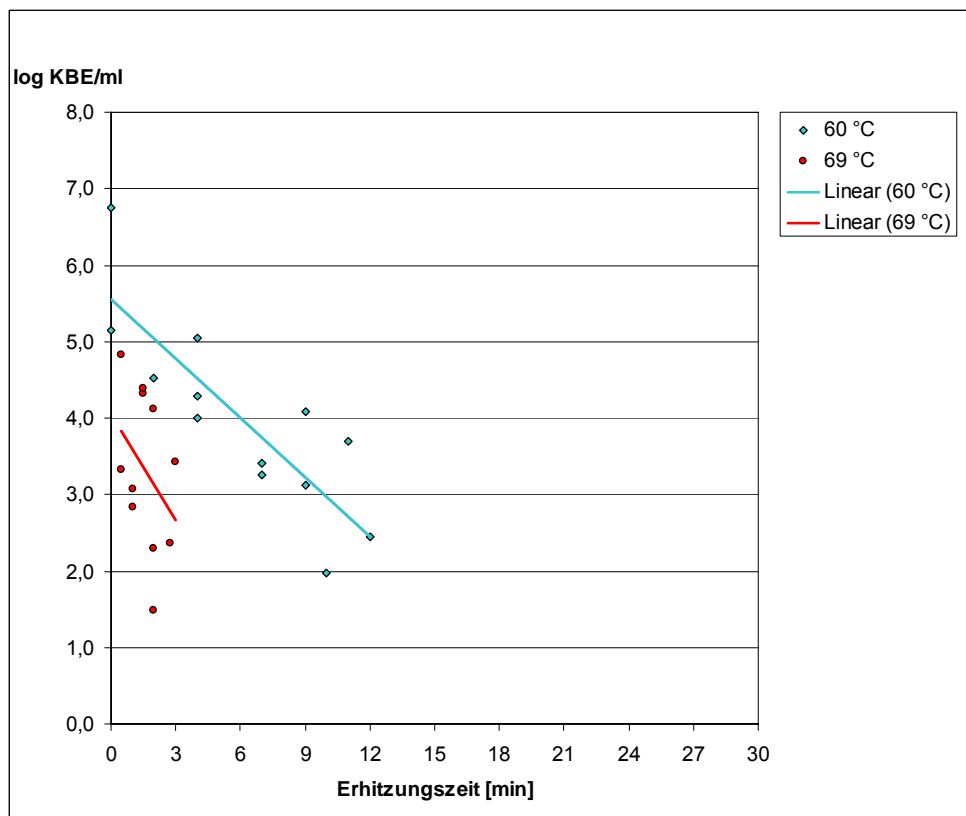


Abbildung 19: Überlebenskurve *Lactobacillus frigidus* in Ringerlösung

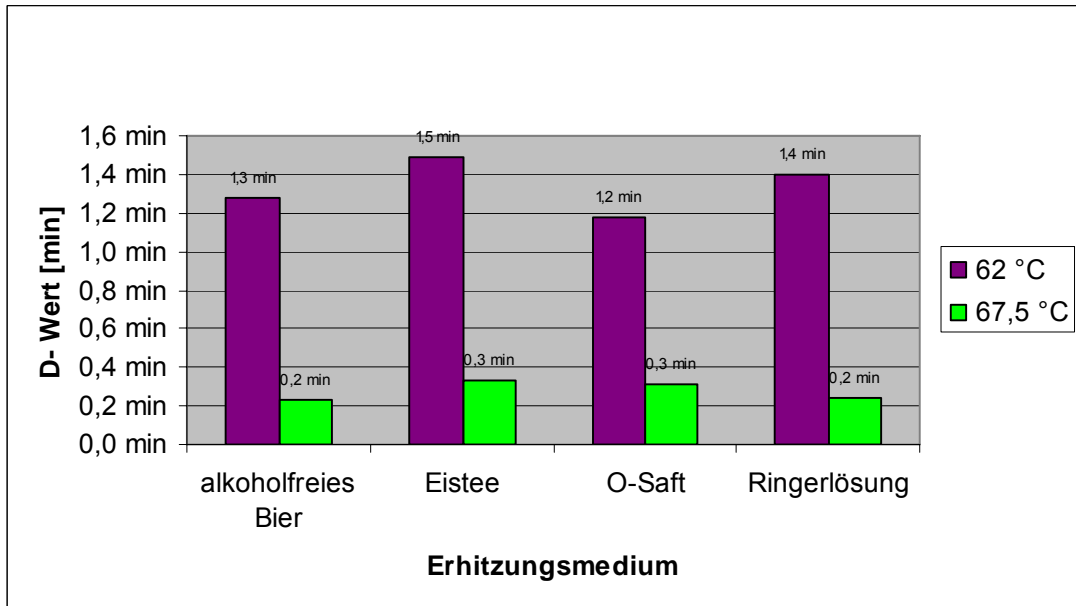


Abbildung 20: D_{62} und $D_{67,5}$ -Werte von *Lactobacillus brevis var. frigidus*

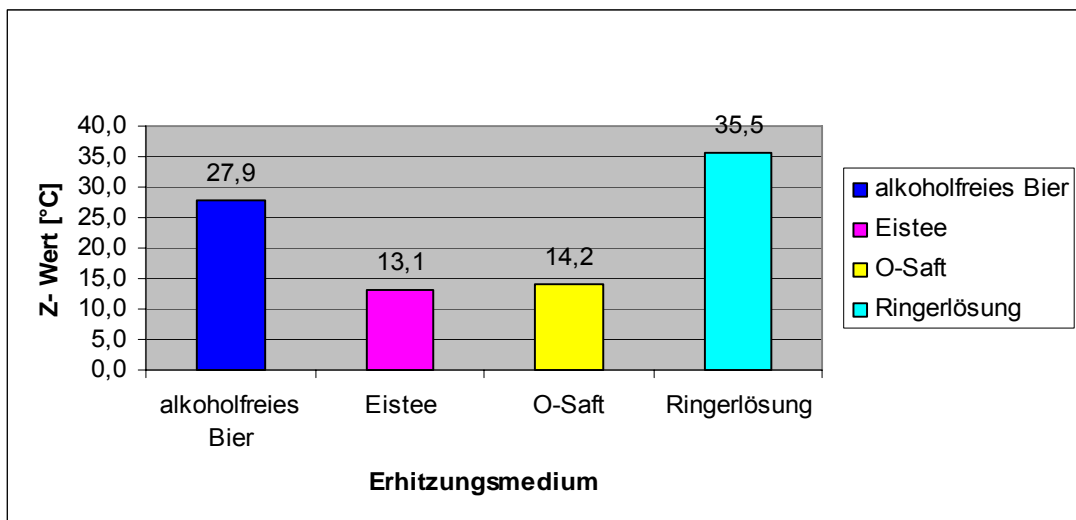


Abbildung 21: z-Werte von *Lactobacillus brevis var. frigidus*

In der Ringerlösung wurde zwar die höchste Hitzeresistenz nachgewiesen, dies ist aber ausschließlich auf den erhöhten pH-Wert von 7,0 bei der Ringerlösung zurückzuführen (vgl. Abbildung 16 bis Abbildung 21).

4.2.4 *Lactobacillus lindneri* (L 2)

Lactobacillus lindneri ist stark an ein spezielles Biermilieu angepasst. Im alkoholfreien Bier wurde jedoch nur ein z-Wert von 11,2 °C ermittelt, der damit deutlich unter dem z-Wert von *Lactobacillus brevis var. frigidus* liegt.

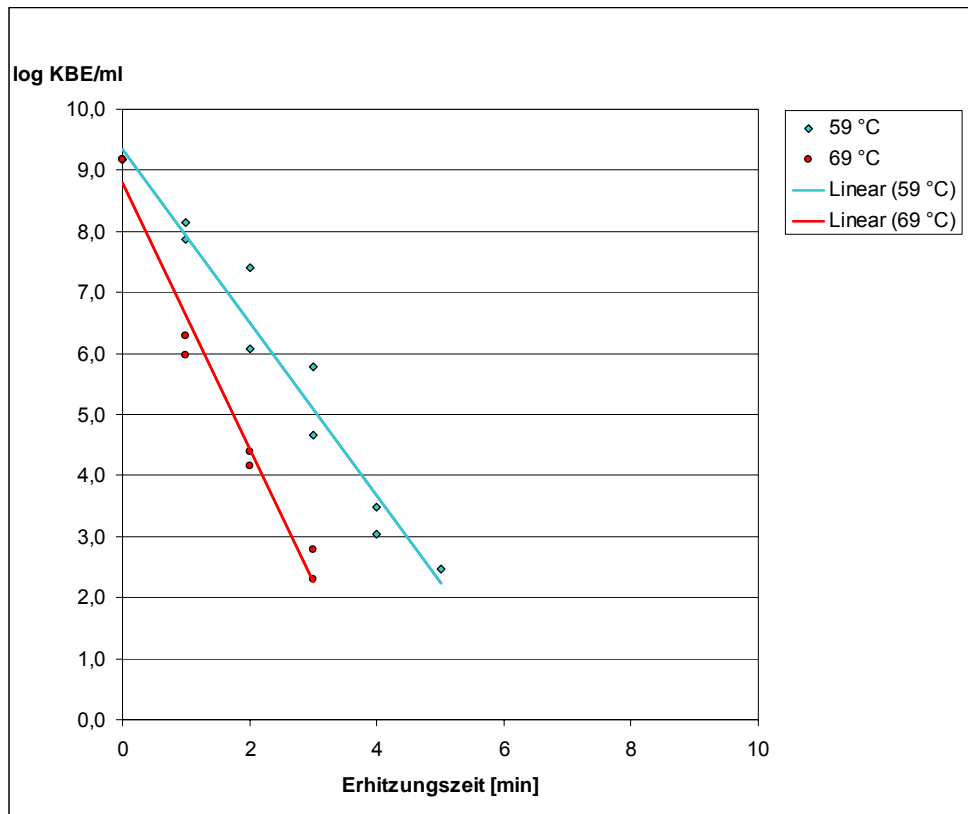


Abbildung 22: Überlebenskurven von *Lactobacillus lindneri* in alkoholfreiem Bier

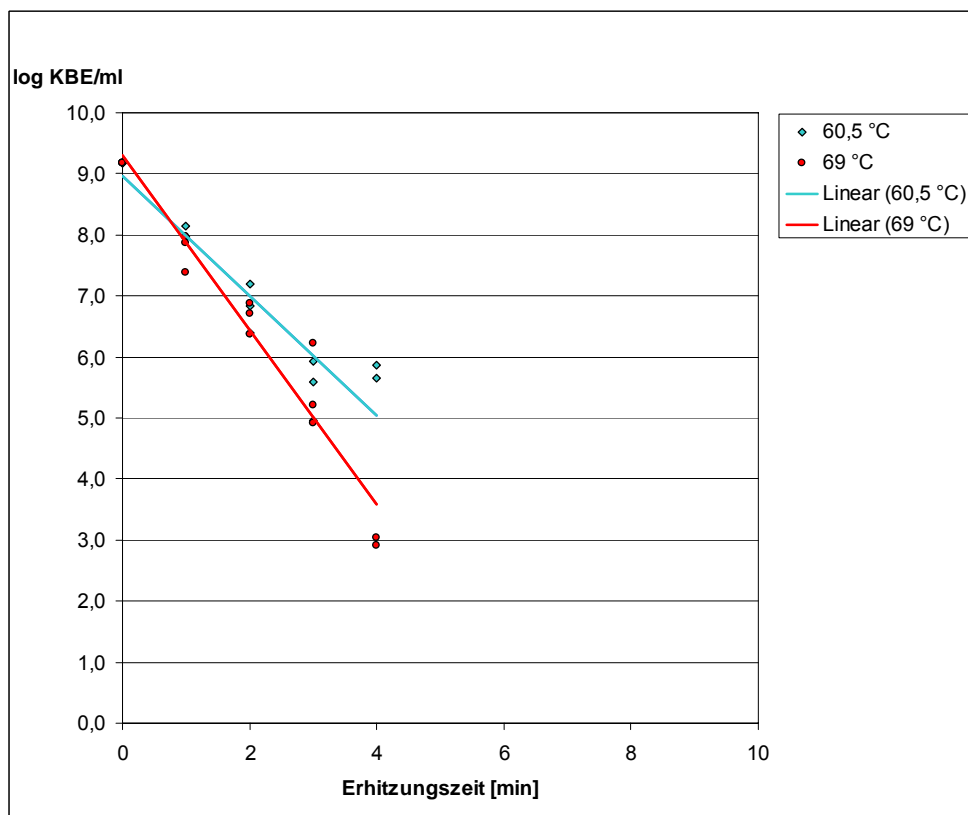


Abbildung 23: Überlebenskurven von *Lactobacillus lindneri* in Eistee

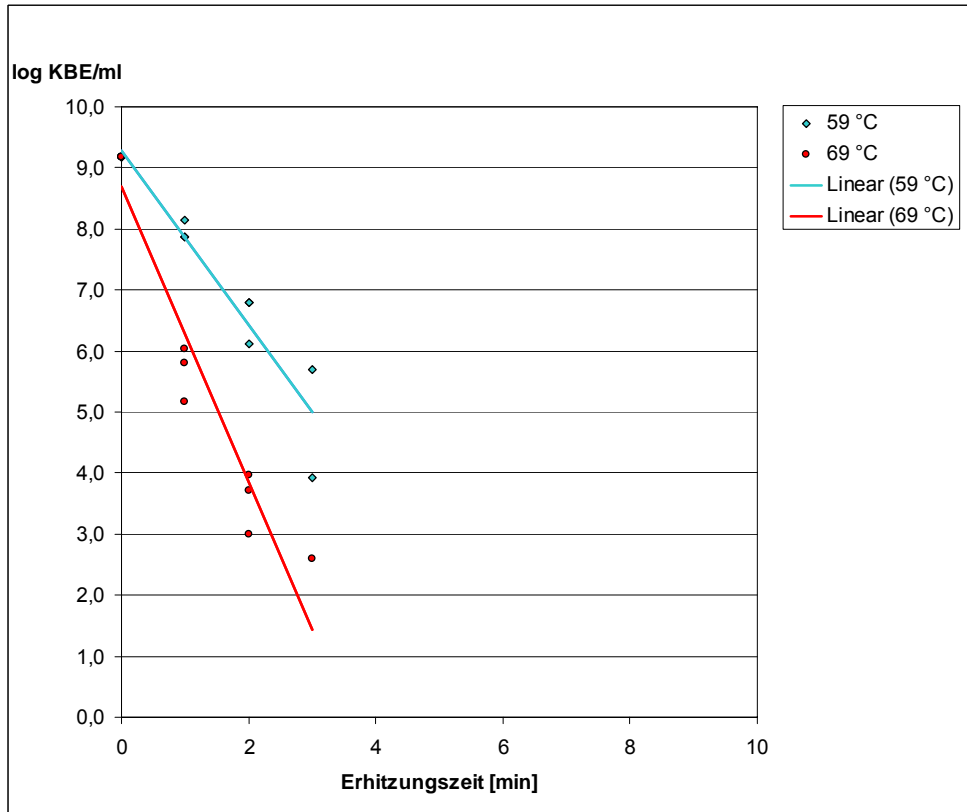


Abbildung 24: Überlebenskurven von *Lactobacillus lindneri* in Orangensaft

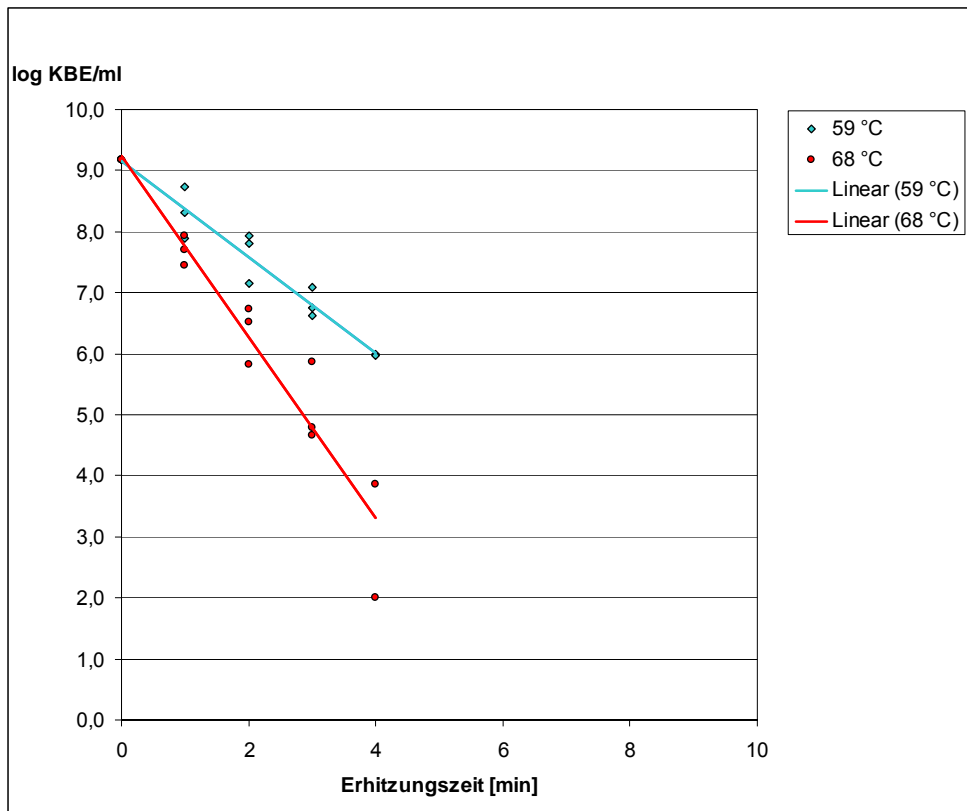


Abbildung 25: Überlebenskurven von *Lactobacillus lindneri* in Ringerlösung

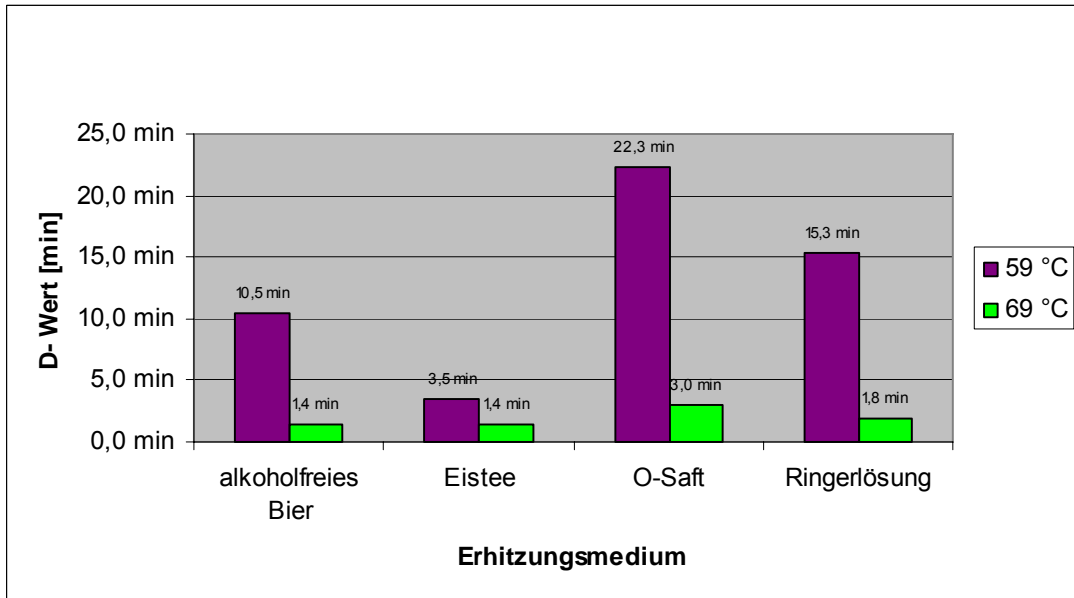


Abbildung 26: D₅₉ und D₆₉-Werte von *Lactobacillus lindneri*

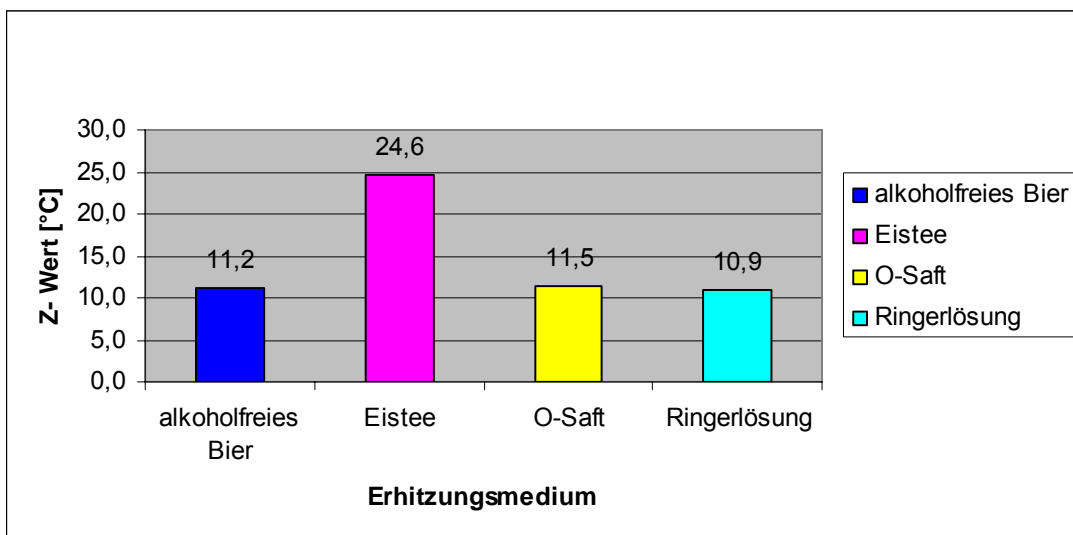


Abbildung 27: z-Werte von *Lactobacillus lindneri*

Die niedrigere Hitzestabilität zu *Lactobacillus brevis var. frigidus* lässt sich damit erklären, dass beim *Lactobacillus lindneri* die schützende Schleimhülle fehlt. Im Eistee wurden jedoch die Hitzeresistenzen mit einem z-Wert von 24,6 °C ermittelt (vgl. Abbildung 22 bis Abbildung 27).

4.2.5 *Aspergillus niger* (ATCC 16404)

Aufgrund des für *Aspergillus niger* typischen weiten pH-Bereichs von pH 1,5 bis 9,8 und den ähnlichen z-Werten zwischen ermittelten 9,5 und 11,9 in den verschiedenen sauren und neutralen Testmedien liegen demnach keine externen Einflüsse auf die Hitzeresistenz vor (vgl. Abbildung 28 bis Abbildung 33).

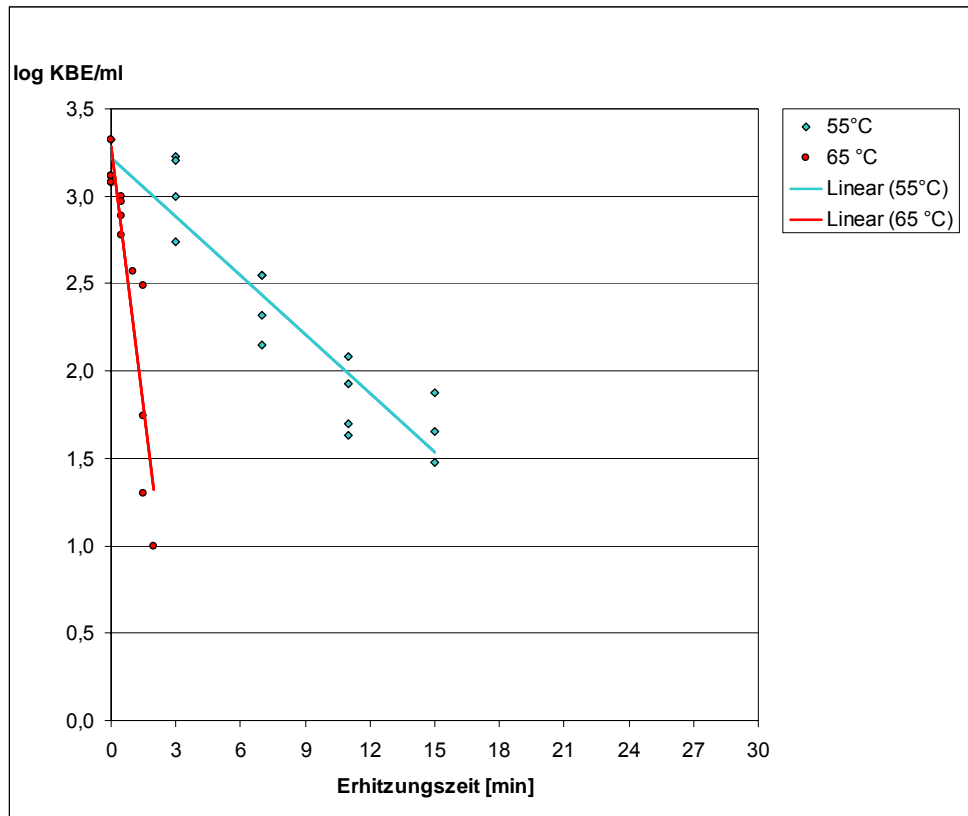


Abbildung 28: Überlebenskurven von *Aspergillus niger* in alkoholfreiem Bier

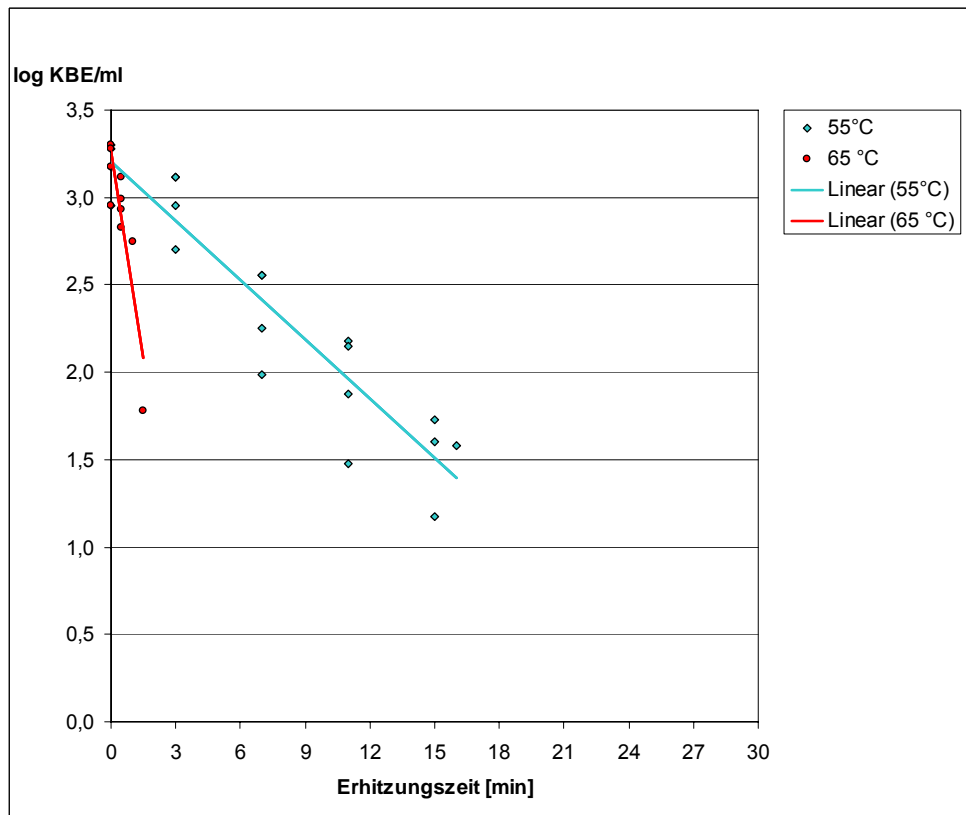


Abbildung 29: Überlebenskurven von *Aspergillus niger* in Eistee

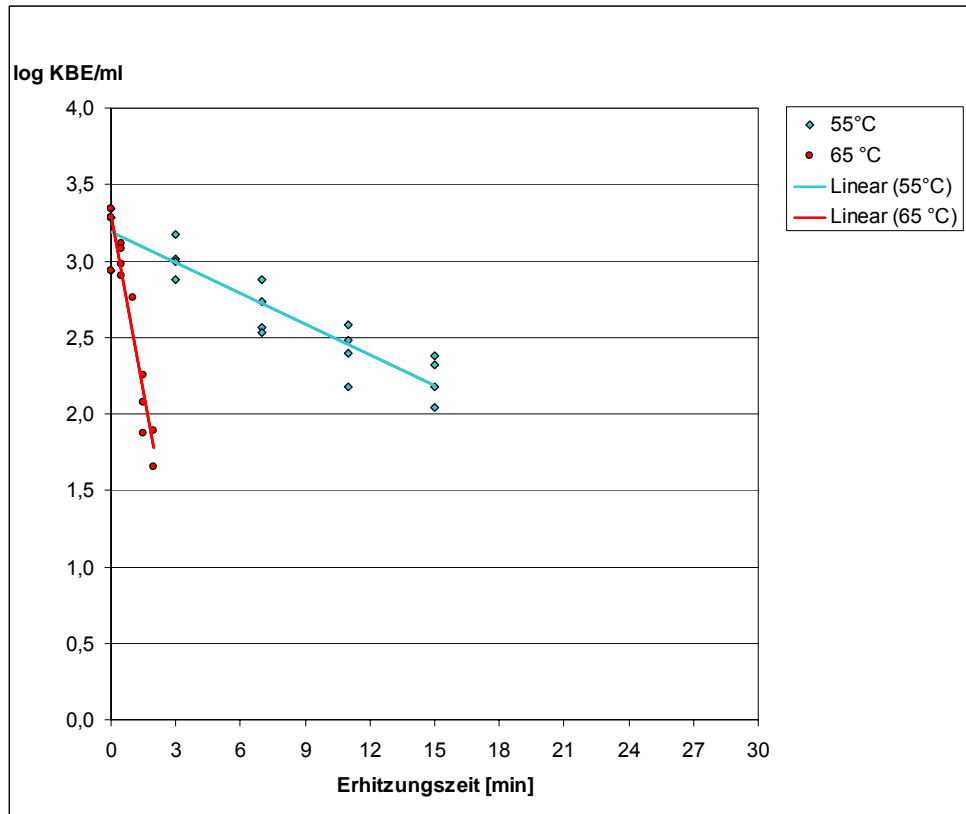


Abbildung 30: Überlebenskurven von *Aspergillus niger* in Orangensaft

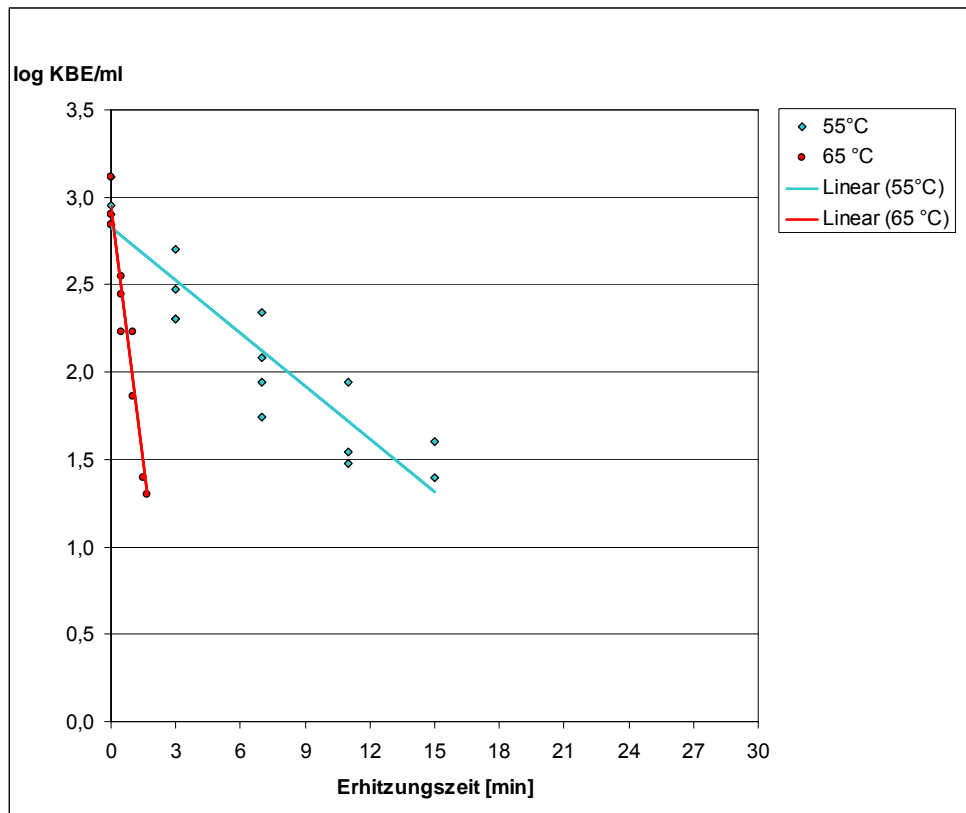
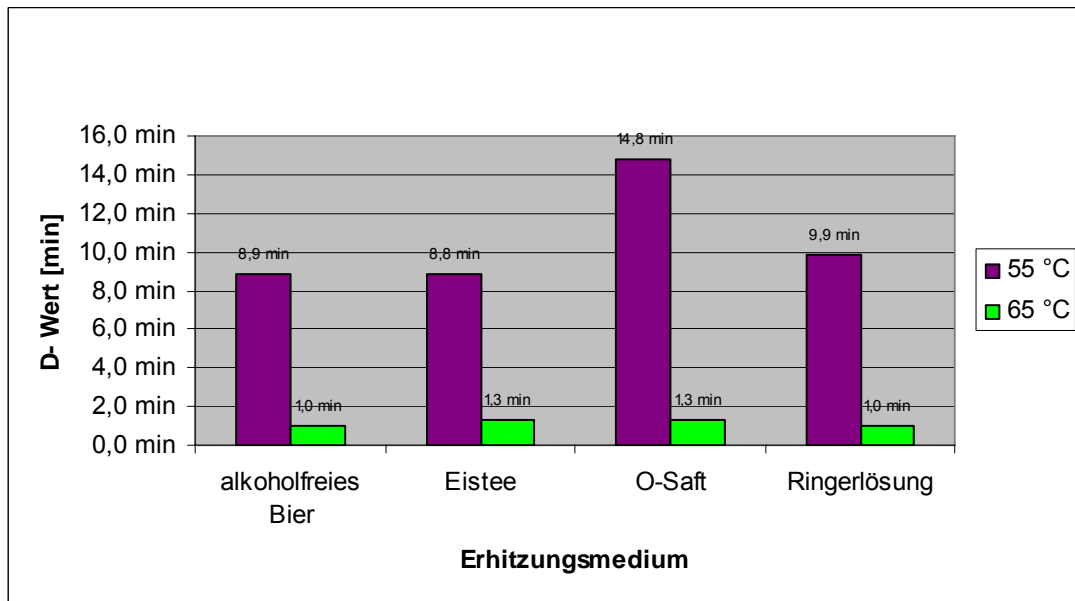
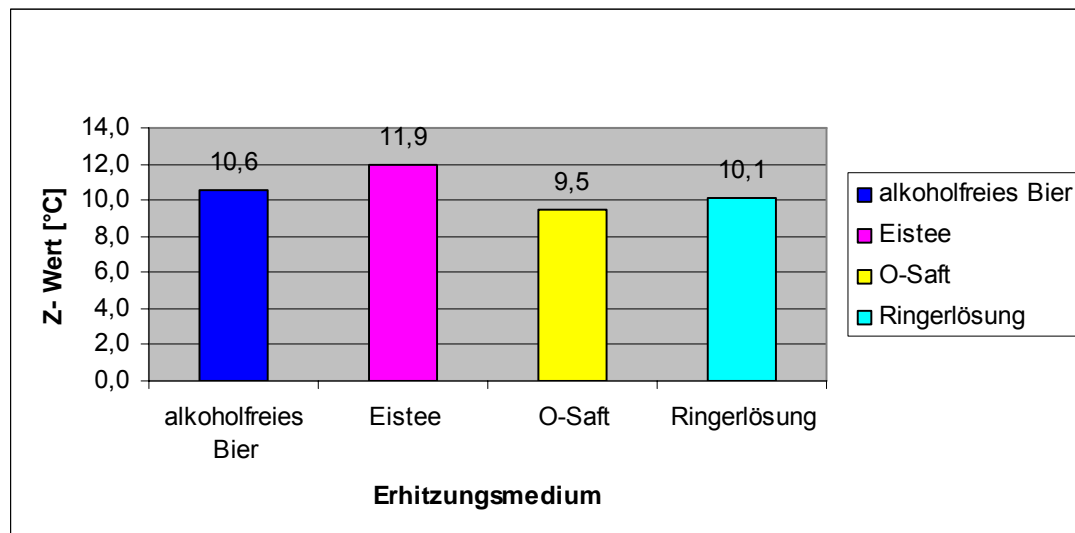


Abbildung 31: Überlebenskurven von *Aspergillus niger* in Ringerlösung

Abbildung 32: D₅₅ und D₆₅-Werte von *Aspergillus niger*Abbildung 33: z-Werte von *Aspergillus niger*

4.2.6 *Alicyclobacillus acidoterrestris* / Sporen (DSM 3922)

Bei Eistee scheint die schützende Wirkung der Kohlenhydrate, in diesem Fall Zucker, den leicht sauren pH-Wert aufzuheben. Die Hitzeresistenz in diesem Medium wurde trotz fehlender Pektine, Proteine und Fette mit einem z-Wert von 23,1 °C ermittelt. Die Sporen scheinen bei dem niedrigeren pH-Wert im Orangensaft sensibler auf Hitze zu reagieren, wie das Messergebnis belegt. Insgesamt betrachtet liegen jedoch alle ermittelten z-Werte auf hohem Niveau, so dass die zur Pasteurisation benötigte thermische Energie entsprechend angepasst werden muss. Bei *Alicyclobacillus acidoterrestris* lagen demnach ebenfalls keine nennenswerten Unterschiede bei den ermittelten z-Werten in den Medien alkoholfreies Bier (22,0 °C), Eistee (23,1 °C), Orangensaft (19,9 °C) und Ringerlösung (23,0 °C) vor. (vgl. Abbildung 34 bis Abbildung 39).

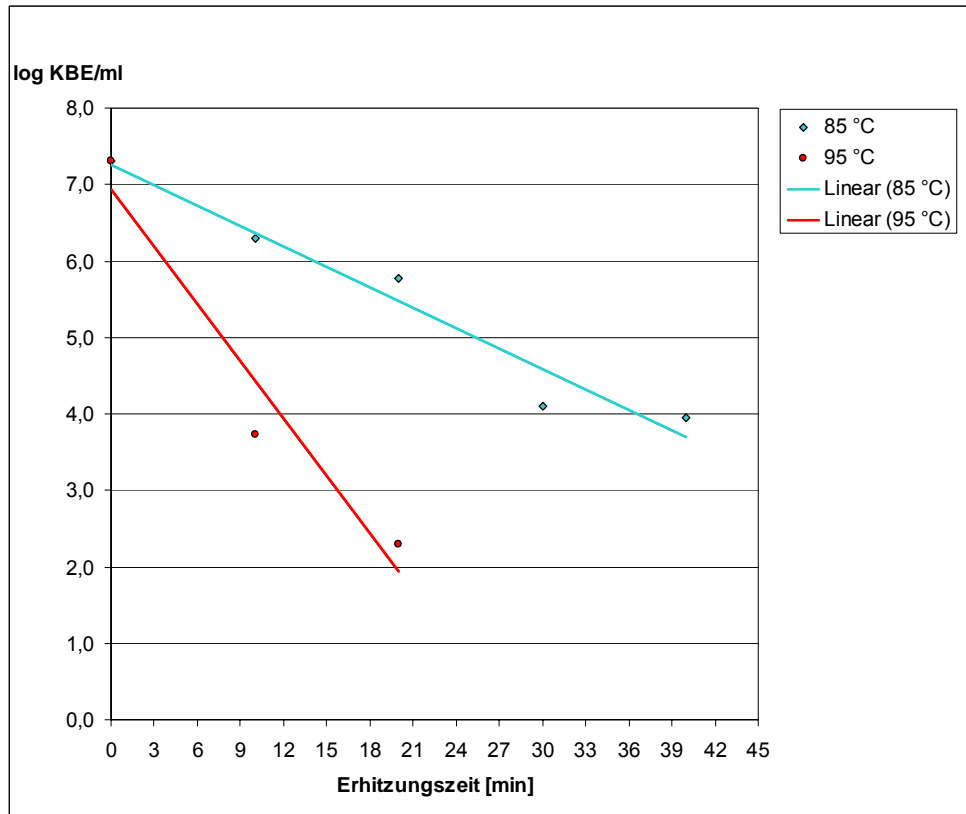


Abbildung 34: Überlebenskurven von *Alicyclob. acidoterrestis* (Sporen) in alkoholfreiem Bier

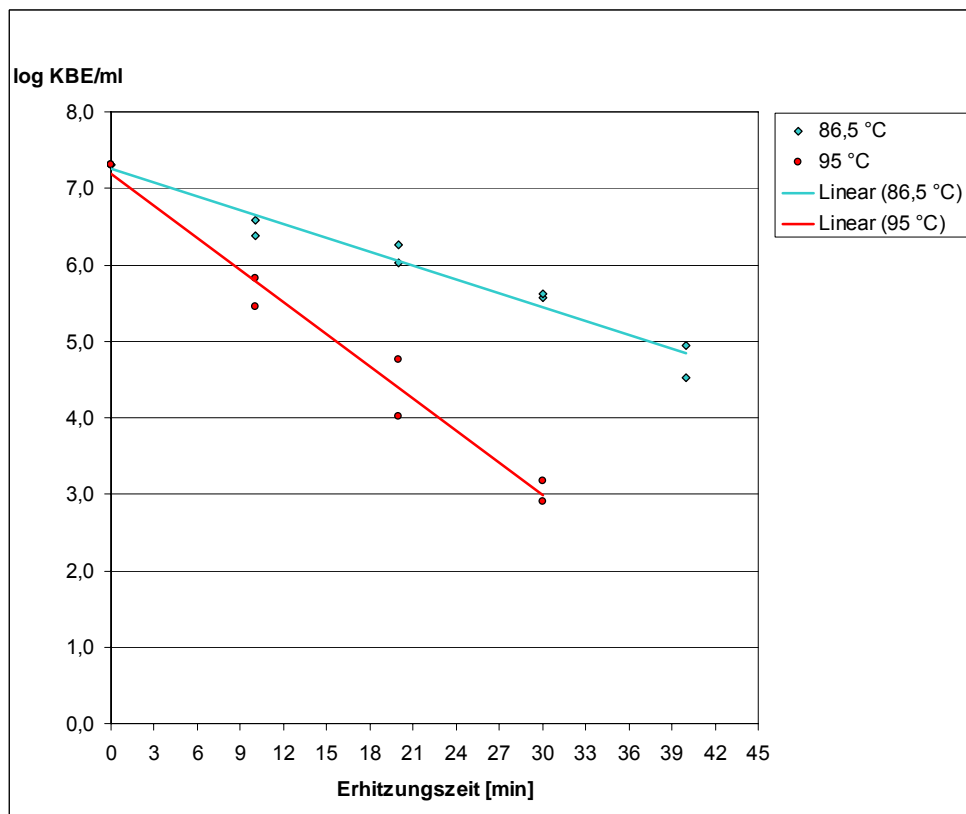


Abbildung 35: Überlebenskurven von *Alicyclob. acidoterrestis* (Sporen) in Eistee

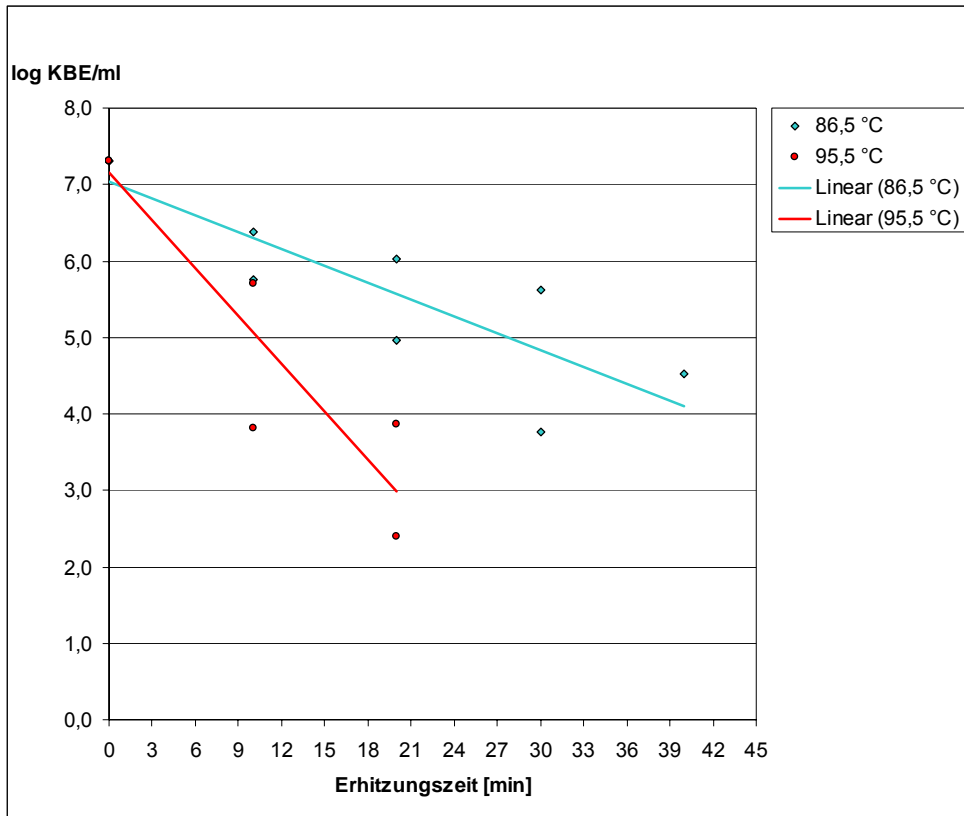


Abbildung 36: Überlebenskurven von *Alicyclob. acidoterrestris* (Sporen) in Orangensaft

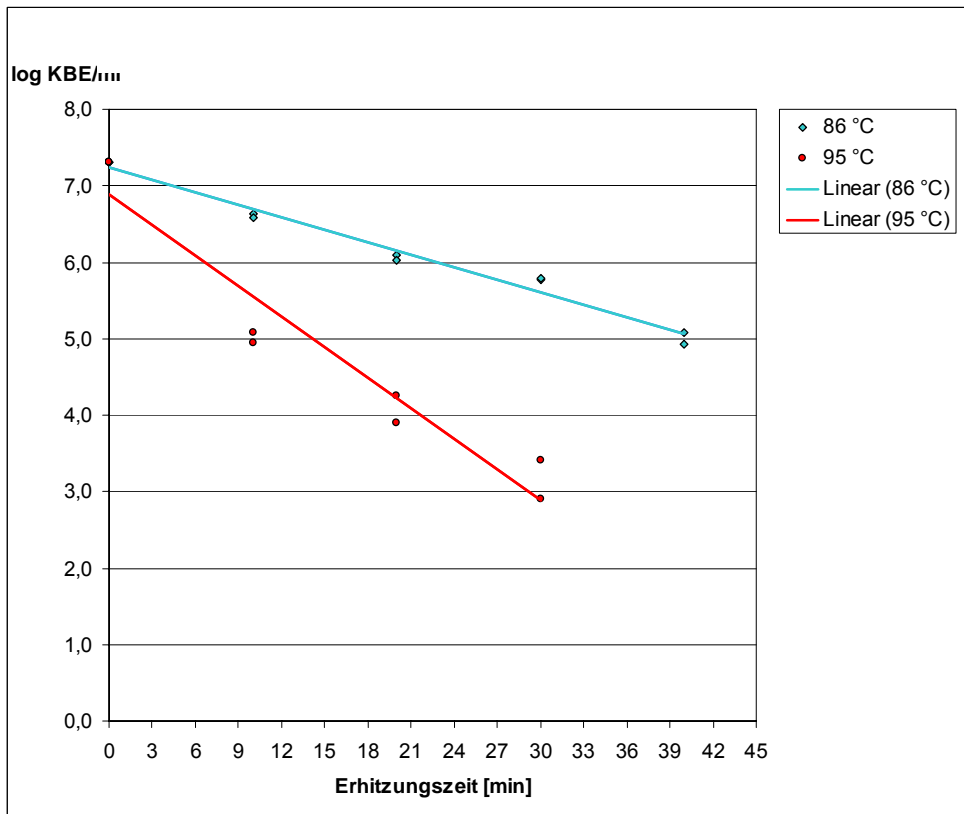


Abbildung 37: Überlebenskurven von *Alicyclob. acidoterrestris* (Sporen) in Ringerlösung

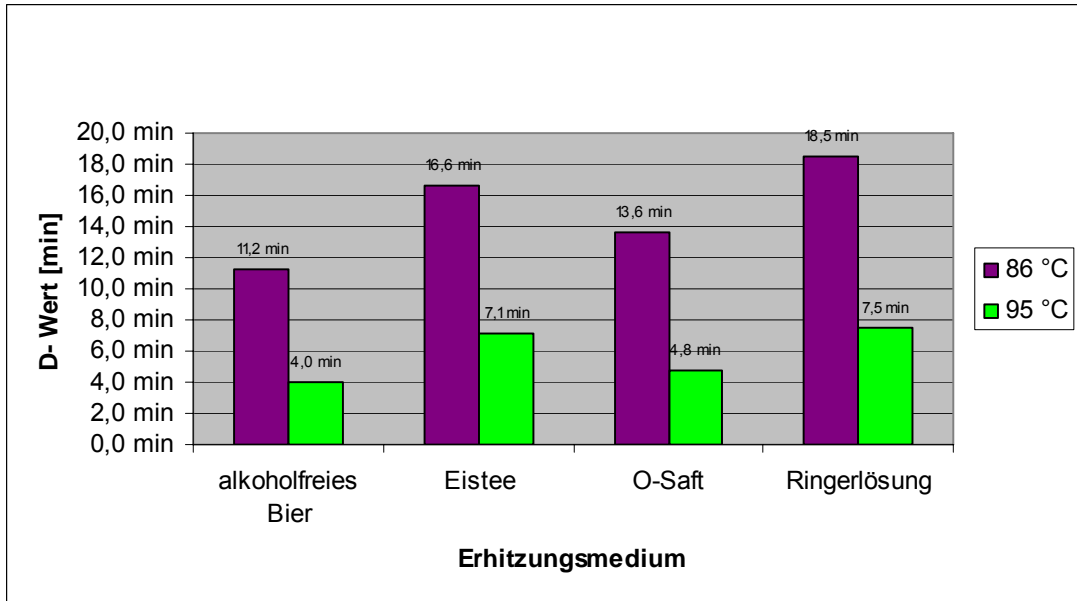


Abbildung 38: D₈₆ und D₉₅-Werte von *Alicyclobacillus acidoterrestris* / Sporen

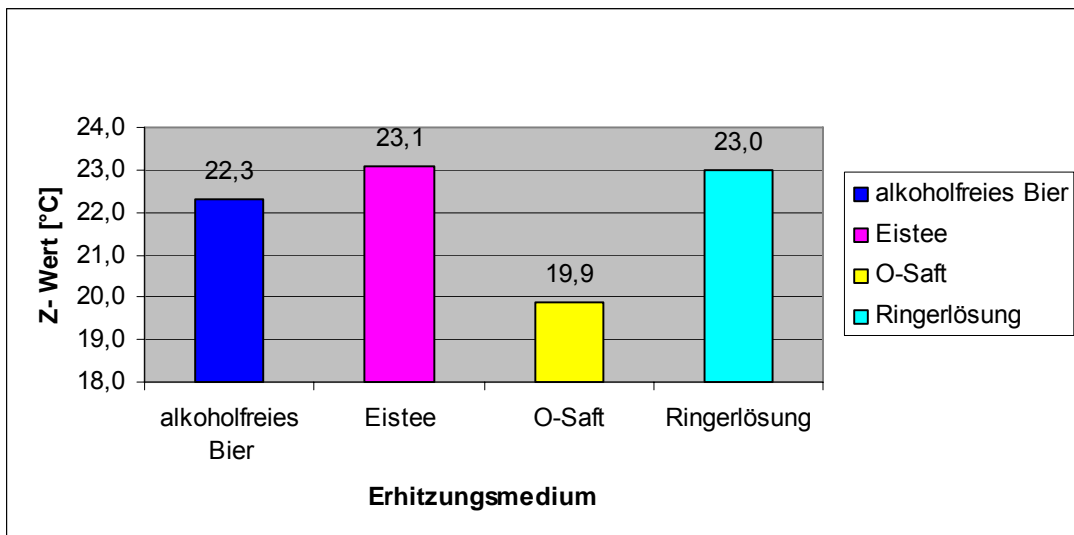


Abbildung 39: z-Werte von *Alicyclobacillus acidoterrestris* / Sporen

4.2.7 *Pichia anomala* / Askosporen (P 27)

Bei den Sporen von *Pichia anomala* wurden ebenfalls relativ hohe z-Werte ermittelt. Die z-Werte lagen in den Medien alkoholfreies Bier bei 22,0 °C, Eistee bei 23,1 °C, Orangensaft bei 19,9 °C und Ringerlösung bei 23,0 °C. Auch hier bestätigt sich das Phänomen der erhöhten Hitzeresistenz der sexuellen Formen bzw. der Askosporen gegenüber den vegetativen Zellen. Damit konnte erstmals bewiesen werden, dass, unabhängig von der Getränkesorte, beim Vorliegen von Askosporen der *Pichia anomala* deutlich höhere Pasteurisationseinheiten anzuwenden sind, um ein kommerziell steriles Produkt zu erhalten (vgl. Abbildung 40 bis Abbildung 45).

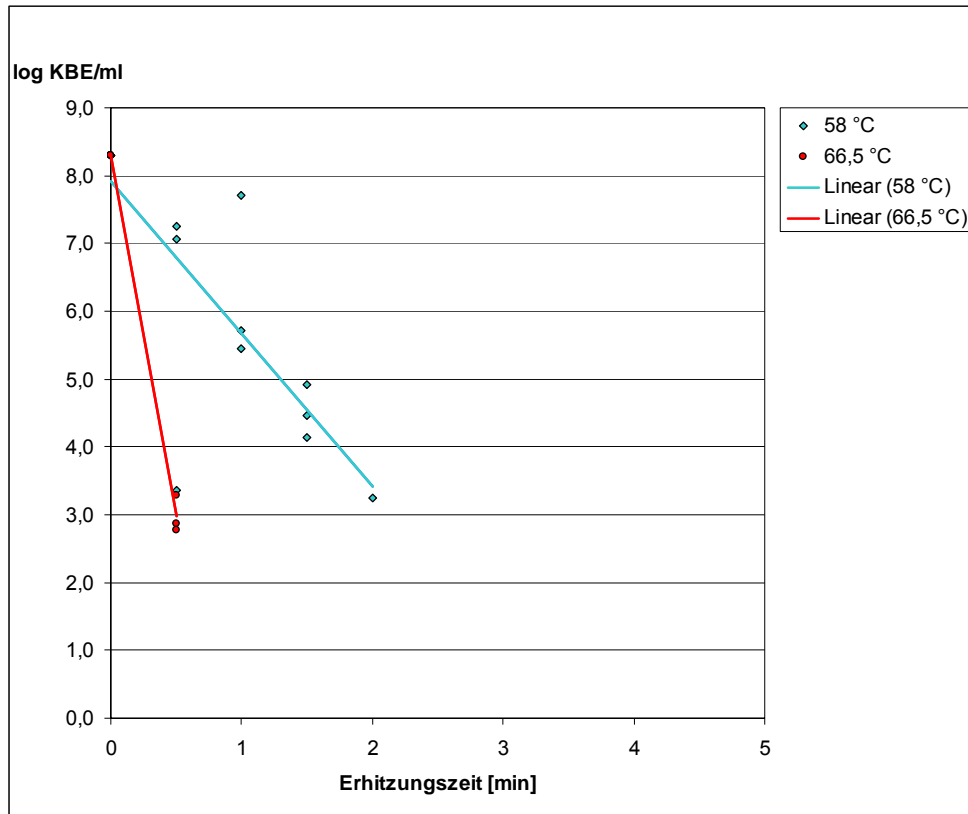


Abbildung 40: Überlebenskurven von *Pichia anomala* (Askosporen) in alkoholfreiem Bier

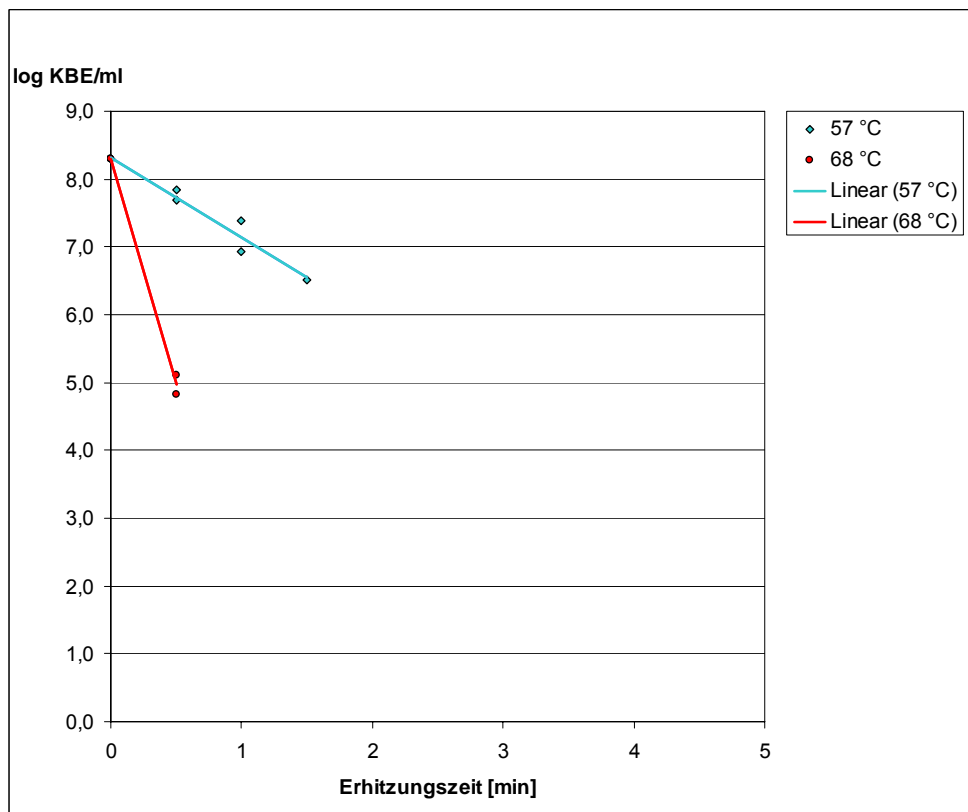


Abbildung 41: Überlebenskurven von *Pichia anomala* (Askosporen) in Eistee

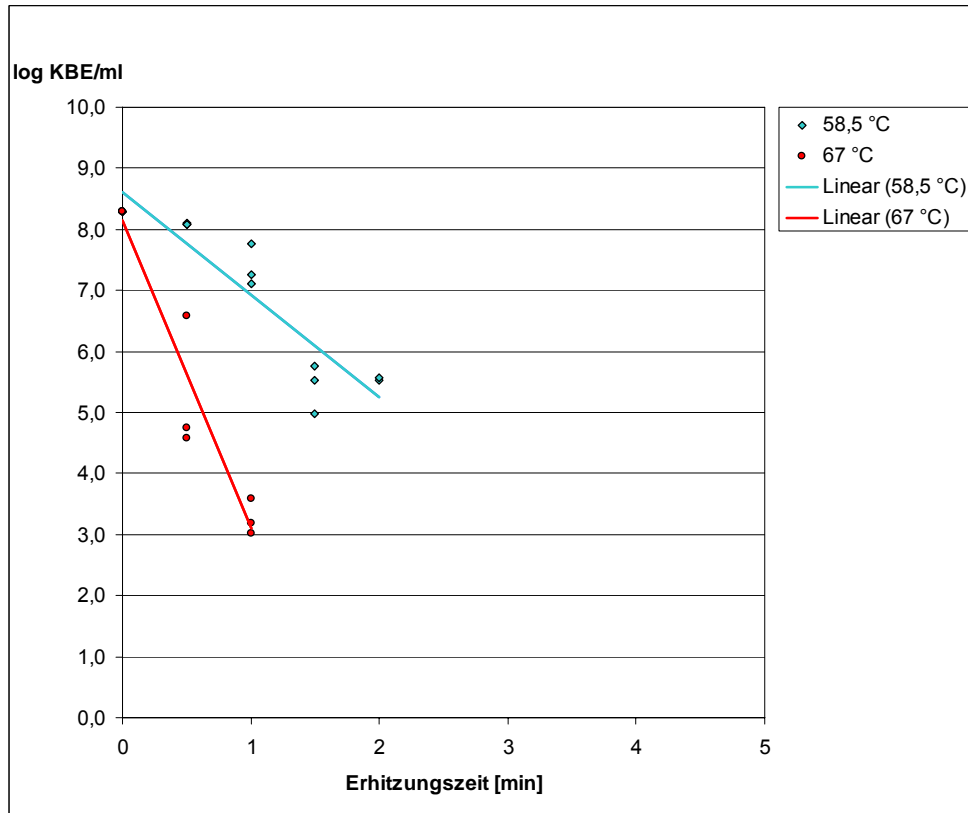


Abbildung 42: Überlebenskurven von *Pichia anomala* (Askosporen) in Orangensaft

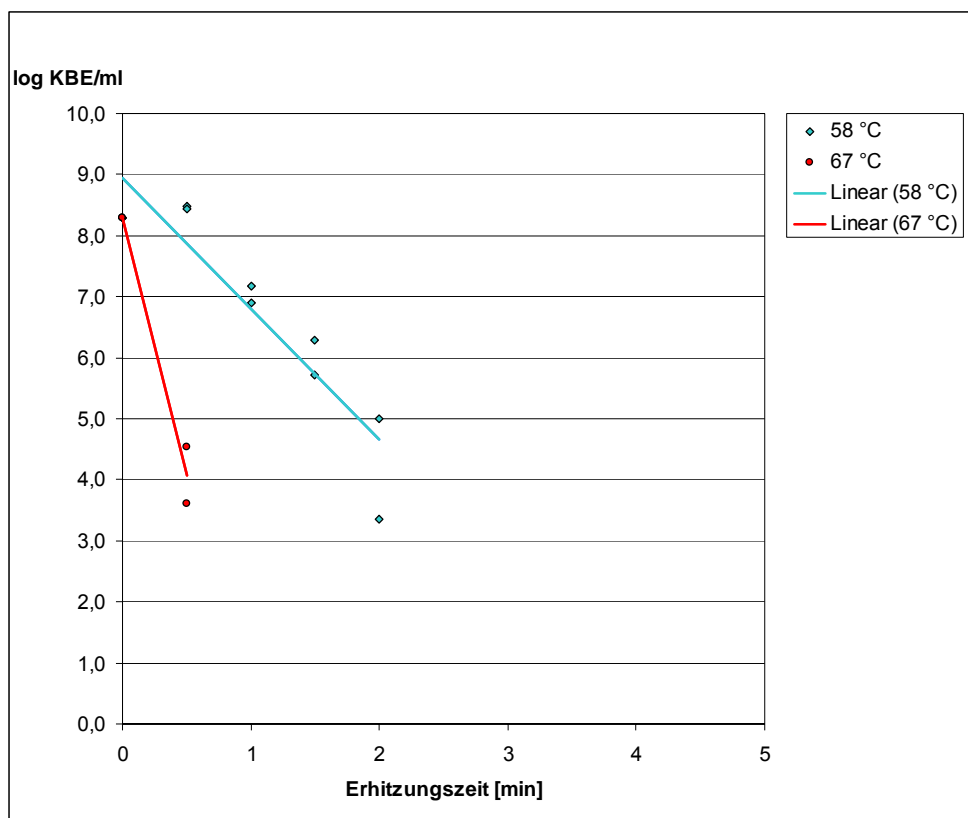


Abbildung 43: Überlebenskurven von *Pichia anomala* (Askosporen) in Ringerlösung

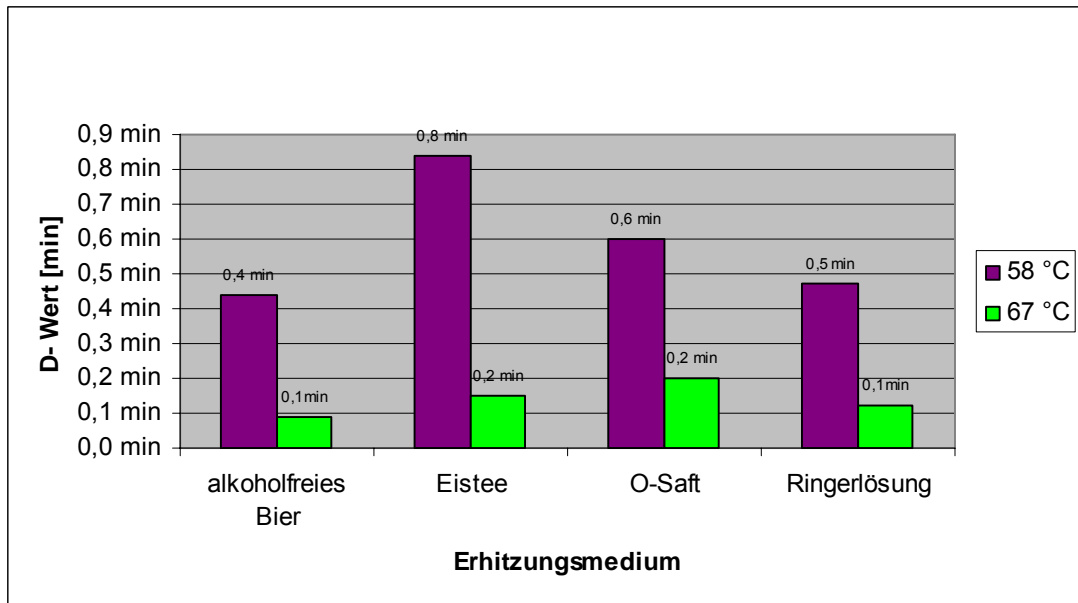


Abbildung 44: D₅₈ und D₆₇-Werte von *Pichia anomala* / Askosporen

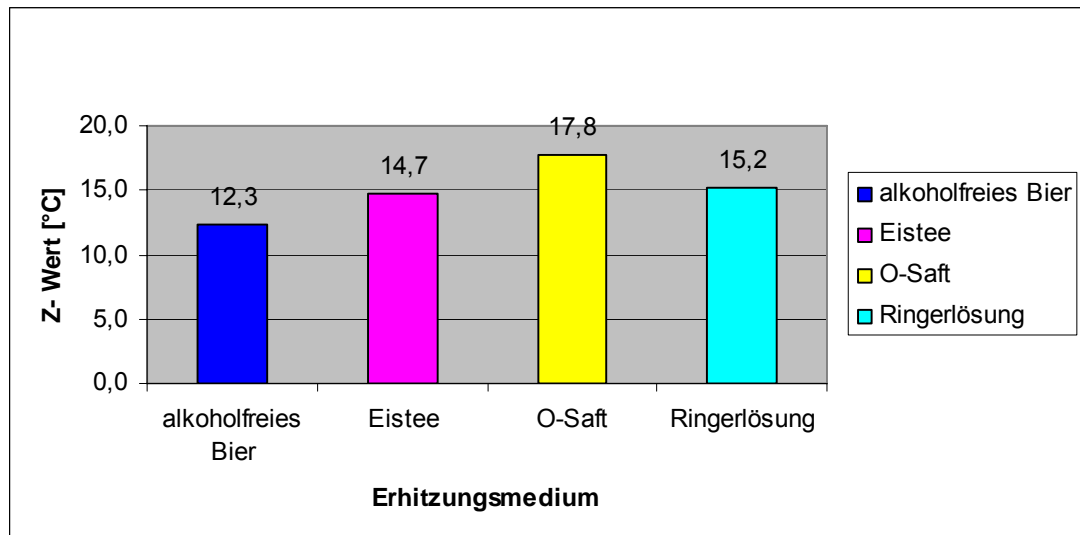


Abbildung 45: z-Werte von *Pichia anomala* / Askosporen

4.2.8 *Saccharomyces diastaticus* / Askosporen (S 2)

Mit einem z-Wert von 10,3 °C, gemessen im Medium Orangensaft, wird auch hier die höhere Hitzeresistenz der Askosporen deutlich.

Auch die z-Werte aus den übrigen angesetzten Versuchsreihen lagen mit 7,4 °C beim alkoholfreien Bier, 8,4 °C beim Eistee und mit 7,2 °C in der Ringerlösung noch über den niedrigeren Werten bei der vegetativen Form von *Saccharomyces diastaticus* (vgl. Abbildung 46 bis Abbildung 51).

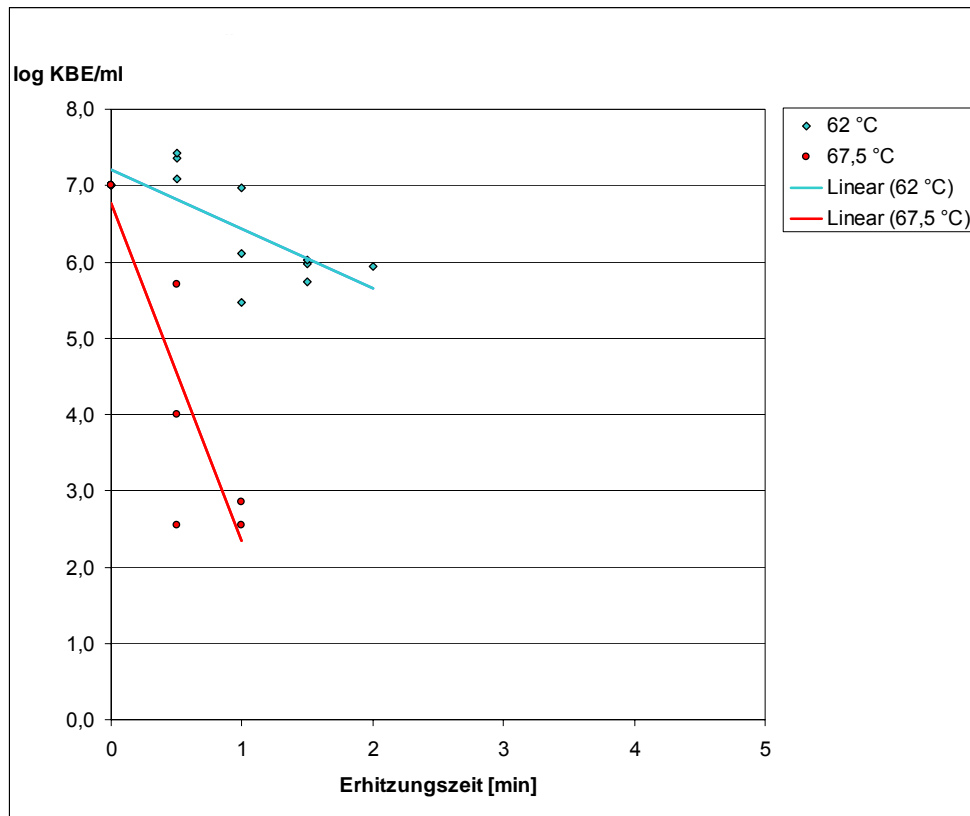


Abbildung 46: Überlebenskurven von *Sacch. diastaticus* (Askosporen) in alkoholfreiem Bier

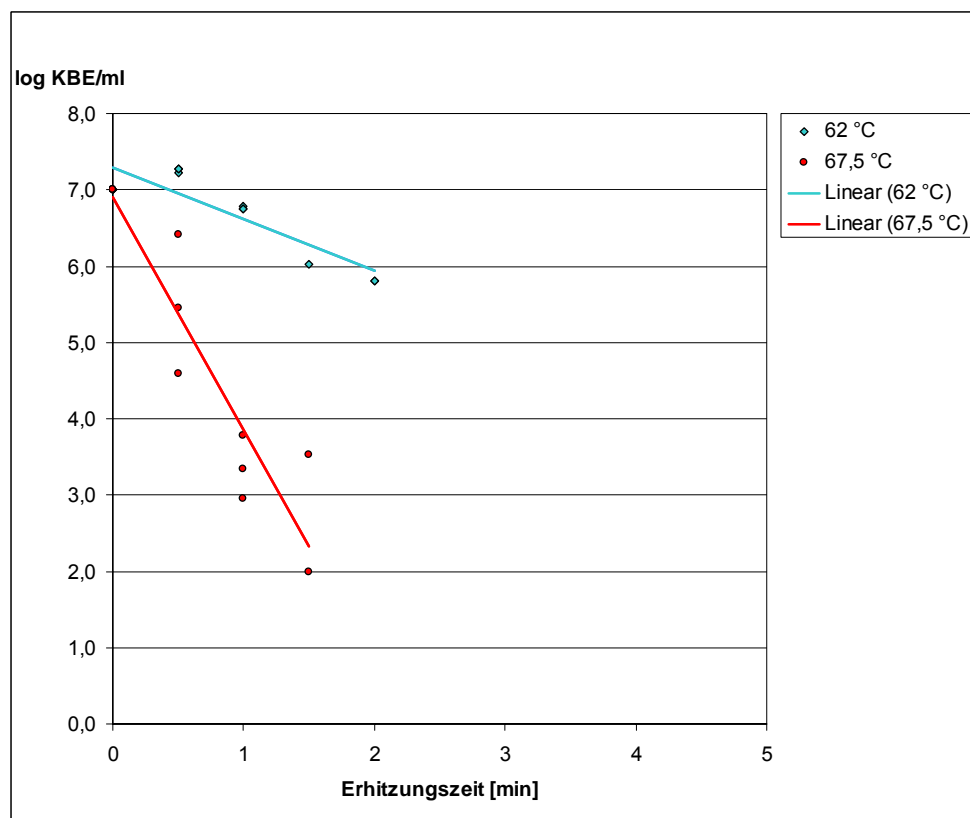


Abbildung 47: Überlebenskurven von *Sacch. diastaticus* (Askosporen) in Eistee

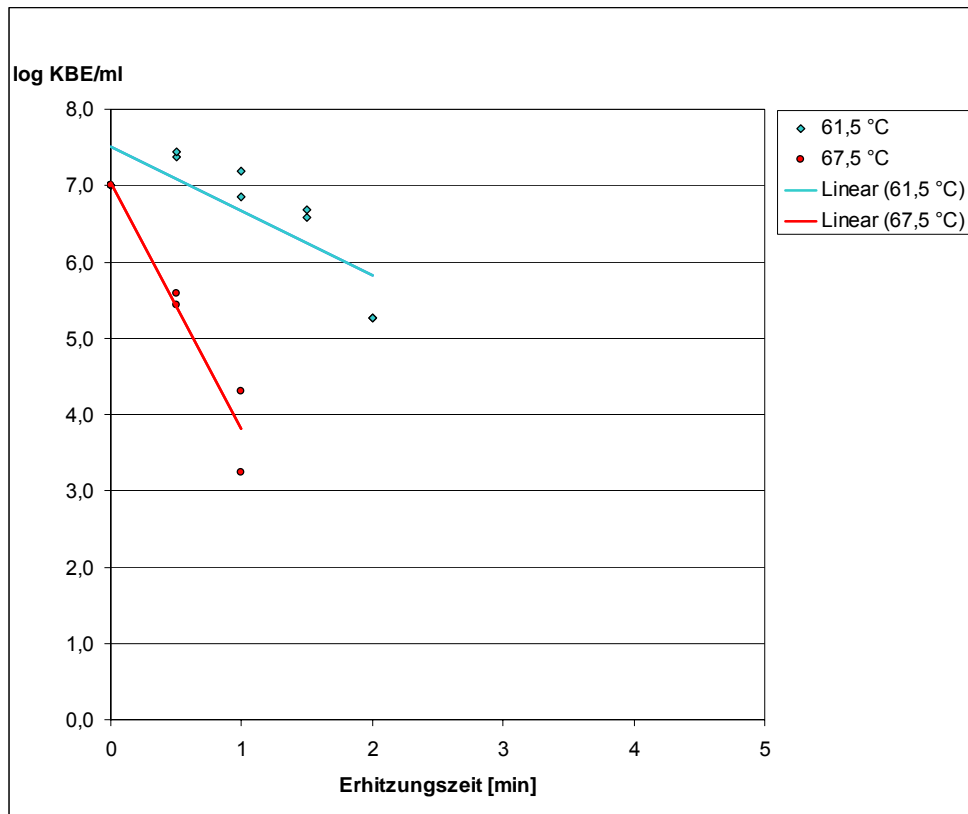


Abbildung 48: Überlebenskurven von *Sacch. diastaticus* (Askosporen) in Orangensaft

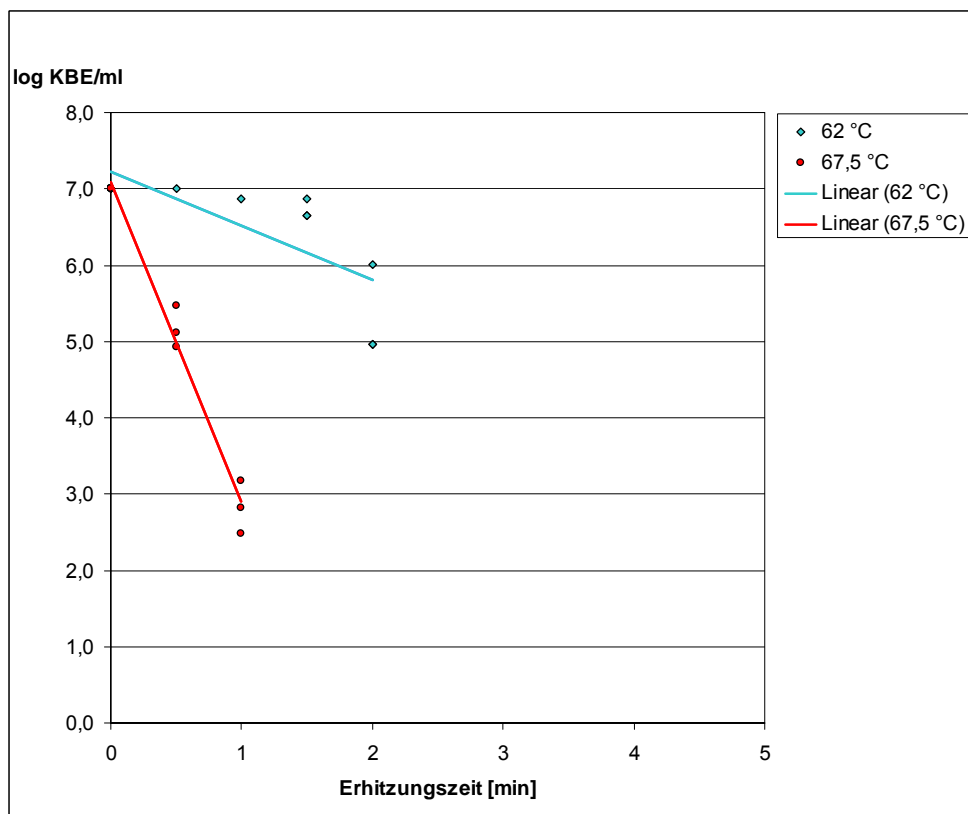


Abbildung 49: Überlebenskurven von *Sacch. diastaticus* (Askosporen) in Ringerlösung

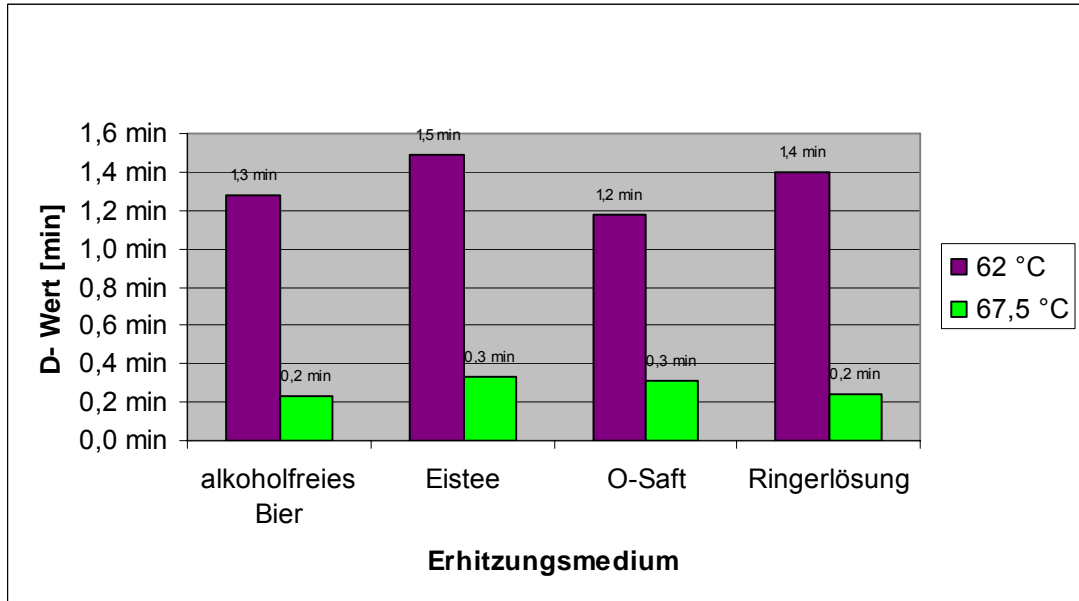


Abbildung 50: D_{62} und $D_{67,5}$ -Werte von *Saccharomyces diastaticus* / Askosporen

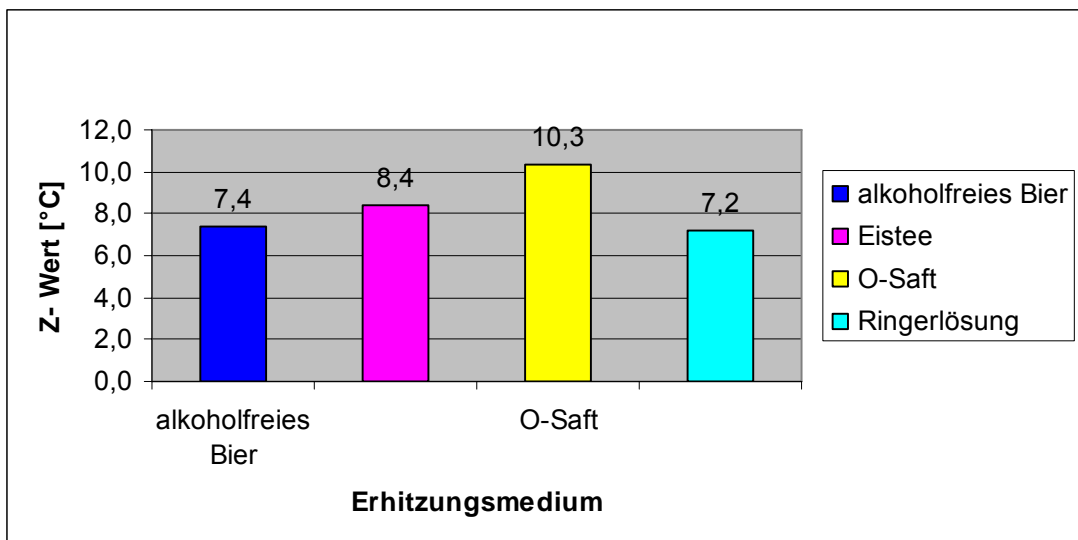


Abbildung 51: z-Werte von *Saccharomyces diastaticus* / Askosporen

4.3. Diskussion / Hitzeresistenzen und Überlebenskurven

Erstmalig wurde die Hitzeresistenz von ausgesuchten getränkeschädlichen Mikroorganismen durch die Ermittlung der D- und z-Werte in typischen Getränkesorten, wie alkoholfreies Bier, Eistee und Orangensaft, erfasst. Insbesondere wurden die in der sexuellen Form von *Pichia anomala* und *Saccharomyces diastaticus* vorliegenden Askosporen, wie auch die Sporen von *Alicyclobacillus acidoterrestris*, einer statistisch abgesicherten Ermittlung der Hitzeresistenz unterzogen.

Die Überlebenskurven von *Bacillus subtilis* (DSM 4181) weisen in den Getränkemedien ähnliche Charakteristika auf. Bei den Sporen von *Bacillus subtilis* scheint der pH-Wert keinen speziellen Einfluss auf die Hitzresistenz auszuüben. Die z-Werte wurden mit 14,9 °C im alkoholfreien Bier, 15,3 °C im Eistee sowie 20,5 °C im Orangensaft ermittelt. Offensichtlich üben die Trübungspartikel im Orangensaft eine Schutzfunktion aus, so dass die Hitzeresistenz in diesem Medium deutlich erhöht ist. Aus dem Diagramm Orangensaft-Medium ist eindeutig ersichtlich, dass hier die Hitzeresistenz um 25 % erhöht ist (vgl. Abbildung 10 bis Abbildung 13).

Aus den Überlebenskurven von *Lactobacillus frigidus* (L 150) ist die Adaption an eine kühlere Umgebung, so wie sie in den Lagerräumen der Brauereien und Konzentratlagern der Getränkeindustrie vorliegt, deutlich erkennbar. *Lactobacillus brevis var. frigidus* weist als Schleimbildner mit den ermittelten z-Werten von 27,9 im alkoholfreien Bier, 13,1 im Eistee sowie 14,2 im Orangensaft eine Affinität zum Biermilieu auf, so dass hier ebenfalls erhöhte Hitzeresistenzen vorliegen. So ist die Keimabtötung im Vergleich zu den anderen Teststämmen bei der zweiten, höheren Temperatur deutlich intensiver. Im Diagramm vom Testmedium alkoholfreies Bier zeigt sich die produktspezifische höhere Hitzeresistenz mit dem ermittelten z-Wert von 27,9 °C recht deutlich (vgl. Abbildung 16 bis Abbildung 19).

Bei *Lactobacillus lindneri* (L 2) ist aus den Überlebenskurven ersichtlich, dass mit einem z-Wert von 24,6 °C im Testmedium Eistee eine deutlich höhere Hitzeresistenz vorliegt, als in den Medien alkoholfreies Bier und Orangensaft (vgl. Abbildung 22 bis Abbildung 244). Bei diesem Teststamm wurden z-Werte zwischen 11,2 °C und 11,5 °C im alkoholfreien Bier und bei Orangensaft ermittelt. Damit wird auch ersichtlich, dass *Lactobacillus lindneri* sich an das Biermilieu angepasst hat und ebenfalls als Getränkeschädling die Pasteurisation bei "normalen" Pasteurisationsbedingungen von 25 bis 28 PE überstehen kann.

An ein spezielles Biermilieu ist stark *Lactobacillus lindneri* angepasst. Im alkoholfreien Bier wurde jedoch nur ein z-Wert von 11,2 °C ermittelt, der damit deutlich unter dem z-Wert von *Lactobacillus brevis var. frigidus* liegt. Möglicherweise liegt die niedrigere Hitzestabilität zu *Lactobacillus brevis var. frigidus* darin begründet und lässt sich damit erklären, dass beim *Lactobacillus lindneri* die schützende Schleimhülle fehlt. Im Eistee konnte jedoch die Hitzeresistenz mit einem z-Wert von 24,6 °C ermittelt werden (vgl. Abbildung 22 bis Abbildung 25).

Aspergillus niger (ATCC 16404) weist bei den Überlebenskurven innerhalb der Testmedien keine nennenswerten Unterschiede auf, wie auch die ermittelten

z-Werte zwischen 9,5 °C bis 11,9 °C belegen. Dies ist aufgrund seiner weiten Toleranz im pH-Bereich zurückzuführen (vgl. Abbildung 28 bis Abbildung 31).

Aus den dargestellten Überlebenskurven von *Alicyclob. acidoterrestris* (Sporen) / (DSM 3922) ist die erhöhte Hitzeresistenz in allen Testmedien zu erkennen. Auch verhält sich die Abtötungskinetik bei den beiden angewandten Temperaturen von 85,5 °C bis 86,0 °C und 95,0 °C bis 95,5 °C ähnlich. Anhand der höheren Hitzeresistenz, sind z-Werte von 19,9 °C bis 23,1 °C ermittelt worden. In der bisherigen Literatur finden sich keine diesbezüglichen Hinweise. Die Passagen bzw. der Schlupf des *Alicyclobacillus acidoterrestris* durch KZE-Anlagen bzw. Pasteure lassen sich jetzt erstmalig mit der hohen Hitzeresistenz der Sporen erklären. Es ist auch ersichtlich, dass keine Unterschiede in der Mikroorganismen spezifischen hohen Hitzeresistenz bei den eingesetzten Getränkesorten festzustellen war (vgl. Abbildung 34 bis Abbildung 37).

Die Überlebenskurven von *Pichia anomala* (Askosporen) / (P 27) belegen ebenfalls die erstmals bewiesene hohe Hitzeresistenz, dokumentiert anhand der ermittelten z-Werte von 12,3 °C bis 17,8 °C in den eingesetzten Testmedien. Aus den Kurvendarstellungen ist ebenfalls ersichtlich, dass die Askosporen eine deutlich höhere Hitzeresistenz aufweisen als die vegetative Form von *Pichia anomala* (vgl. Abbildung 40 bis Abbildung 43).

Aus den erstellten Überlebenskurven für die Askosporen von *Saccharomyces diastaticus* (S 2) ist die höhere Hitzeresistenz gegenüber der vegetativen Form klar erkennbar. Dies wird durch die erstmals ermittelten z-Werte mit 7,4 °C bis 10,3 C belegt (vgl. Abbildung 46 bis Abbildung 49).

Eine allgemein gültige Eigenschaft der Getränke zur Förderung oder Minderung der Hitzeresistenz, auf die alle Bakterien und Schimmelpilze dieser Versuchsreihe ansprechen, konnte nicht festgestellt werden. Vielmehr zeigen die Ergebnisse, wie komplex die Beeinflussung der Hitzeresistenz von Mikroorganismen in den verschiedensten Getränkesorten ist. Oft summieren oder egalisieren sich die Hitzeresistenz beeinflussenden Eigenschaften der Getränke, so dass immer die Gesamtheit an Inhaltsstoffen und deren Auswirkung auf die Hitzeempfindlichkeit und nicht nur einzelne spezifische Inhaltsstoffe betrachtet werden dürfen. Demzufolge müssen die benötigten Pasteurisationseinheiten auf die spezifische Hitzeresistenz sowie das Vorliegen der vegetativen bzw. sexuellen Lebensform der Mikroorganismen abgestimmt sein.

Somit konnte erstmalig bewiesen werden, dass die Hitzeresistenzen von *Lactobacillus lindneri* und *Lactobacillus brevis var. frigidus* bisher zu niedrig angesetzt waren. Mit den

in Getränken ermittelten z-Werten der Askosporen von *Pichia anomala* und *Saccharomyces diastaticus* wird ebenfalls erstmalig belegt, dass die Hitzeresistenzen bisher zu niedrig angesetzt waren. Die Inaktivierungseffizienz, sowohl vegetative Zellen als auch Sporen durch Hitze abzutöten, ist demnach von vielen Faktoren, u. a. von der Textur der Getränke, das heißt der natürlichen und zugesetzten sowie anderen gelösten Substanzen, abhängig.

Mit diesen durchgeführten Messserien konnten erstmals wissenschaftlich abgesicherte Hitzeresistenzen und Überlebenskurven aufgestellt werden, die in der Praxis eine Parametrierung der Pasteure zur Sicherstellung der erforderlichen Getränkesterilität ermöglichen und auch die Grenzen der thermischen Inaktivierung im "Normalbetrieb" aufzeigen.

5. Ergebnisse und Diskussion – Teil 2: Funktionsfähige Kaltseptik

5.1. Berechnungen und Parametrierungen zur Pasteurisation

5.1.1 KZE-Anlagen und Pasteure

Im Folgenden wird gezeigt, dass mit einem geeigneten Trübungsdetektor sich bei klaren Produkten das sogenannte "Over-Range-Signal" als Störmeldung verarbeiten und damit eine KZE-Anlage absichern lässt. Hierbei nutzt man den Effekt, dass Mikrobläschen die Trübungsmessung verfälschen und damit höhere Werte angezeigt werden, der Messwert schlägt bis zum Maximum aus.

Selbst moderne KZE-Anlagen werden nur auf den Durchfluss, die Verweilzeit und die Heißhaltetemperatur ausgelegt [24, 25, 62]. Die Art der zu inaktivierenden Keime, unter dem Aspekt einer eventuellen Askosporenbildung der Hefen und potentielle Hitzeresistenzen werden dabei nicht berücksichtigt. Auch werden bekannte D- und z-Werte der vorliegenden Mikroorganismen nicht berücksichtigt bzw. bestimmt.

5.1.2 Störeinflüsse zur Funktionalität

5.1.2.1 Eintrag von Gasblasen

Um ein getränkesteriles Produkt für die aseptische Abfüllung bereitzustellen, steigen die Sicherheitsanforderungen an KZE-Anlagen und Pasteure [153, 154]. Außer der Luft- und Gasblasenbildung bzw. Gasblaseneintragung bei Getränken tauchen noch weitere Aspekte z.B. bei der Problemstellung "Pasteurisation eines Xanthan-, CMC-, Zucker- und Öl-haltigen Premixes" auf [155]. Hier bewirkt die Absenkung des a_w -Wertes und die damit verbundene Erhöhung der Hitzeresistenz der Mikroorganismen lt. KESSLER [39] gleichzeitig nachstehende negative Einflussgrößen:

- kolloidale Einschlüsse von Mikroorganismen in hydratisierten Bindemitteln, ebenfalls mit Schutzeffekt für die Mikroorganismen durch verringerte Wasseraktivität und schlechtere Wärmeaufnahme in diesen "Mikro-Bereichen"
- Bildung von Micellen aus ölhaltigen und hydratisierten Bindemitteln mit den gleichen Schutzeffekten für die darin enthaltenen Mikroorganismen.

In der Praxis wurden die Ursachen für Infektionen bzw. nicht getränkesterile Herstellung auf die nicht korrekte Funktionalität der Kurzzeiterhitzungsanlagen zurückgeführt. Der Zusammenhang zwischen Gasblaseneintragung, erhöhten Trübungsanzeigen und mikrobiologischer Befundlage wurde daher untersucht.

5.1.2.2 Lösungsvorschläge (Trübungsdetektoren als Inline-Überwachung)

In Gasblasen und Mikrobläschen können Mikroorganismen wie in Überlebenskapseln eine Kurzzeiterhitzungsanlage passieren, da Gase nur einen Wärmeleitkoeffizienten von ca. $30 \text{ W/m}^2\text{K}$ gegenüber Wasser von ca. $800 \text{ W/m}^2\text{K}$ aufweisen [156]. In der Heißhaltezone ist daher beim Auftreten von Gasblasen die vorgegebene thermische Einwirkungszeit zur Abtötung der Mikroorganismen nicht mehr gegeben, so dass es zum Keimdurchbruch kommt. Da es z. Z. keine Inline-Detektion für Mikroorganismen gibt, bietet sich als Überwachungskriterium bezüglich störender Gasblasen (in Form von eingetragener Luft oder entbundener Kohlensäure) das "Over-Range-Signal" einer Trübungsmessung an. Das bei den Untersuchungen und Messserien eingesetzte Trübungsmessgerät, basierend auf der 2-Kanal-11°-Vorwärtsstreuung des Typs Optek Controll 4000, konnte in zwei Betrieben in der Filtration und in einem Betrieb während der Inbetriebnahme einer kaltseptischen PET-Abfüllanlage erfolgreich zur verfahrenstechnischen Optimierung eingesetzt werden.

5.1.2.3 Untersuchungsergebnisse aus Betriebsdaten (Betriebe G, W u. R)

Gasblasen können u. a. über unsachgemäßes Handling mit Gelenkschwenkbögen und Schläuchen, nicht ausreichende Entlüftung der unsterilen Getränke im Entlüfter und über undichte Verschraubungen, Armaturen und Pumpen eingetragen werden. Entbindungen des gelösten Kohlendioxids entstehen immer dann, wenn der Sättigungsdruck innerhalb des Rohrleitungssystems bzw. in der Heißhaltezone der KZE-Anlage unterschritten wird. Dies war in den Brauereien "G" und "W" der Fall.

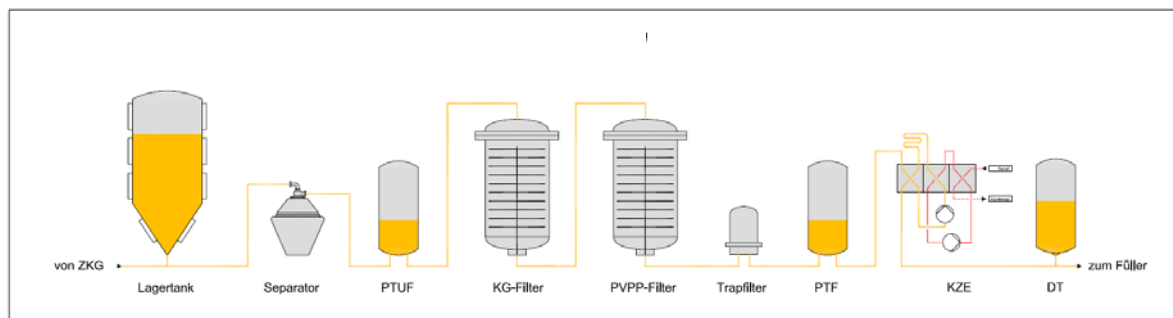


Abbildung 52: Filtration Betrieb "G"

Dort war in der Filtration kein Puffertank nach den Filtern installiert, so dass die nachgeschalteten Förderpumpen den Kieselgurfilter "leer saugten", da keine untere Grenze für den Durchfluss vorgesehen war. Insbesondere bei den letzten Filtratmengen konnte dieses Phänomen beobachtet und registriert werden (vgl. Abbildung 54 u. Abbildung 55). Die Lösung dieser mikrobiologischen Problematik bestand in der Installation eines korrekt ausgelegten Druckhalteventils sowie in der Festlegung einer

Mindest-Strömungsgeschwindigkeit mit Optimierungsmaßnahmen in der peripheren Anlagen-Konstellation und der Strömungstechnik.

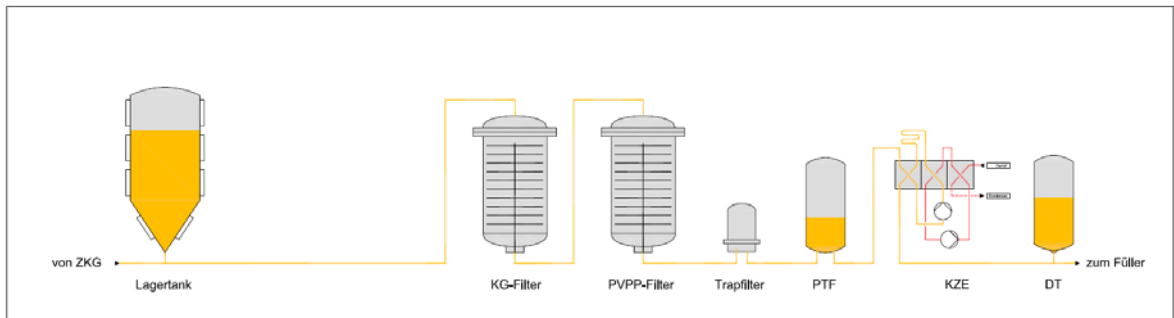


Abbildung 53: Filtration Betrieb "W"

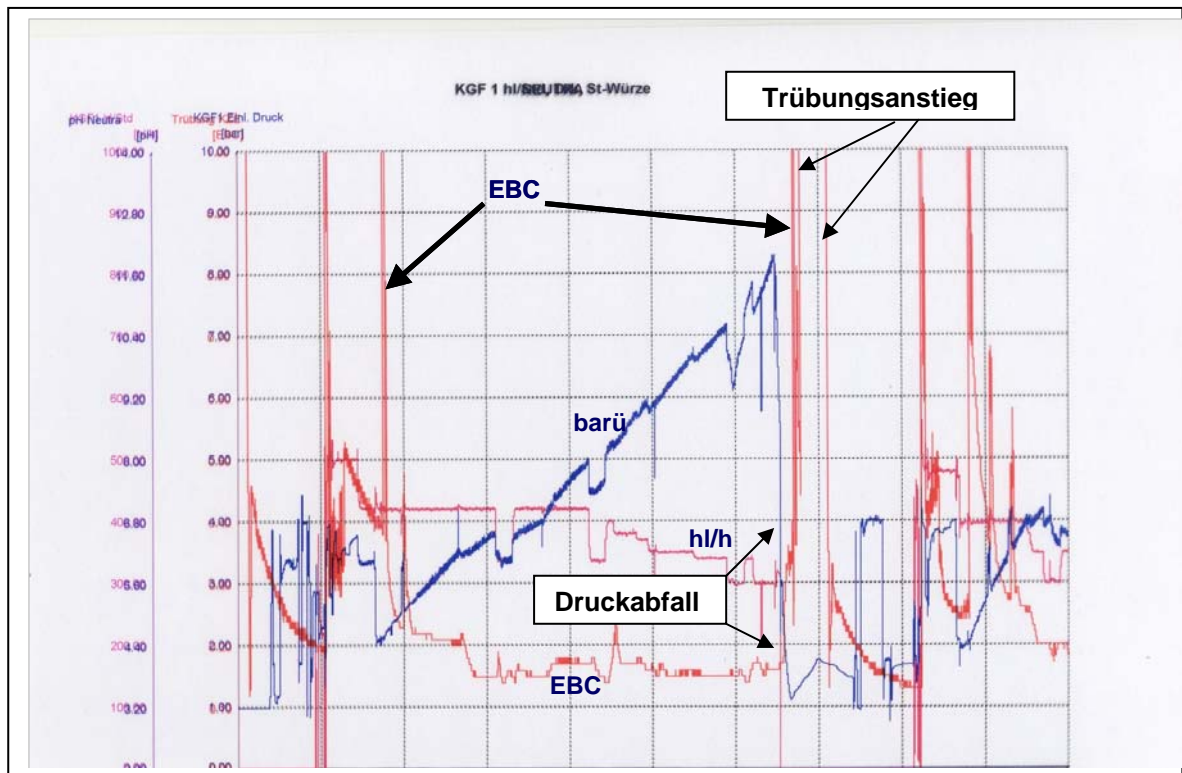


Abbildung 54: Aufzeichnung eines Filtrationsprotokolls aus Betrieb G

Aus den Filtrationsaufzeichnungen (vgl. Abbildung 54 und Abbildung 55) ist eindeutig erkennbar, dass bei einem Druckabfall im System die Entbindung der gelösten Kohlensäure eine Gasblasenbildung induziert, welche die Trübungsanzeige auf das Maximum der Anzeigeskala schnellen lässt (Fehlfunktion des Messgerätes).

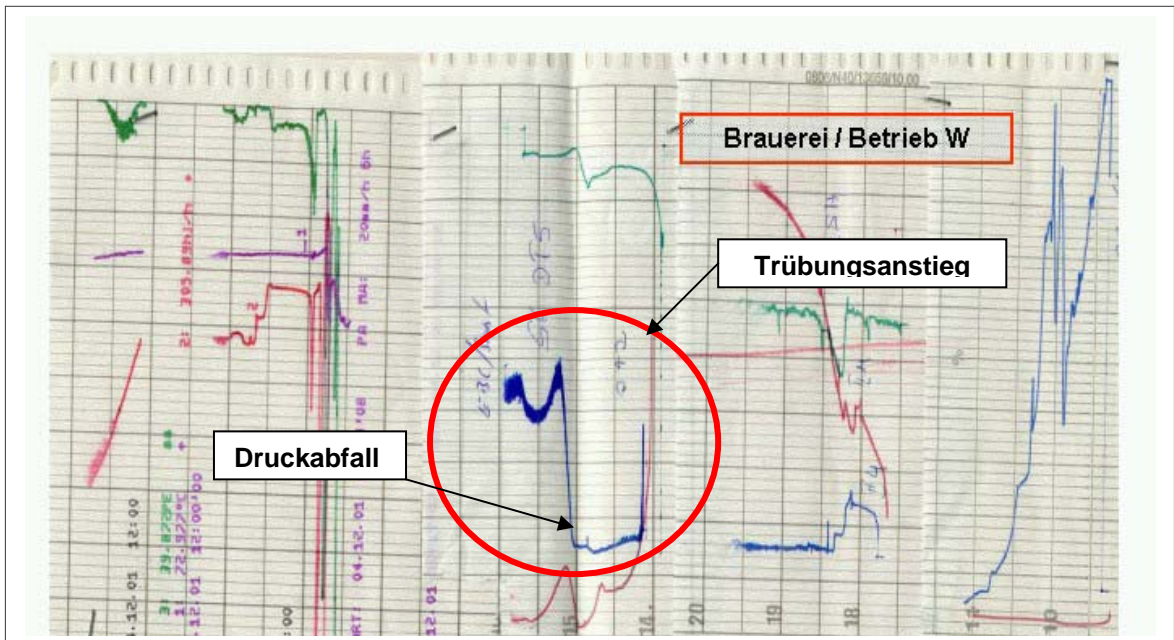


Abbildung 55: Aufzeichnung eines Filtrationsprotokolls aus Betrieb W

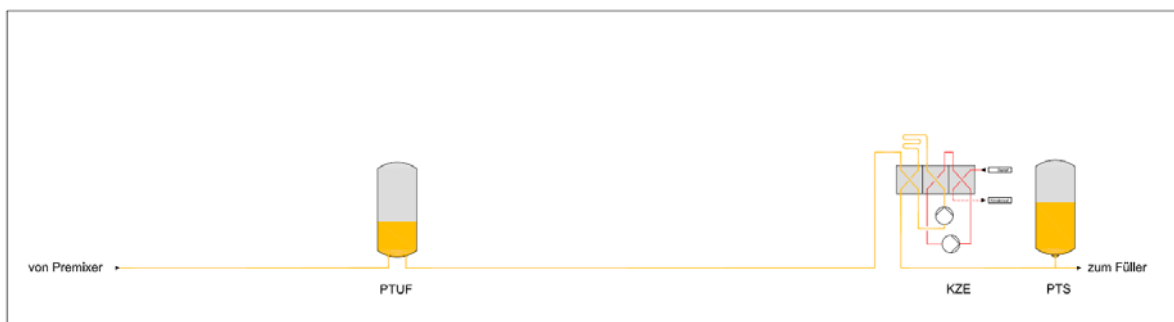


Abbildung 56: Abfüllung Kaltseptik Betrieb "R"

In einer weiteren Untersuchung, während der Inbetriebnahme einer aseptischen Anlage zur Abfüllung von Eistee und Schorlen in 0,5 und 1,5 Liter PET-Flaschen, musste die KZE-Technologie der dort installierten Anlage an die speziellen Anforderungen der aseptischen Verfahrenstechnik angepasst werden. So wurden bei den Prozessbedingungen die "Fadenrisse" bei den einzelnen Umschaltphasen durch intelligente Ventilschaltungen eliminiert, um Gasentbindungen zu vermeiden. Dies kann u. a. dadurch erreicht werden, dass bei der Umschaltphase von Kreislauf auf Produktion die stehende Flüssigkeitssäule erst einmal beschleunigt wird, um dann eine druckstoß- und kavitationsfreie Statusänderung der Anlage sicherzustellen (vgl. Abbildung 57 und Abbildung 58).

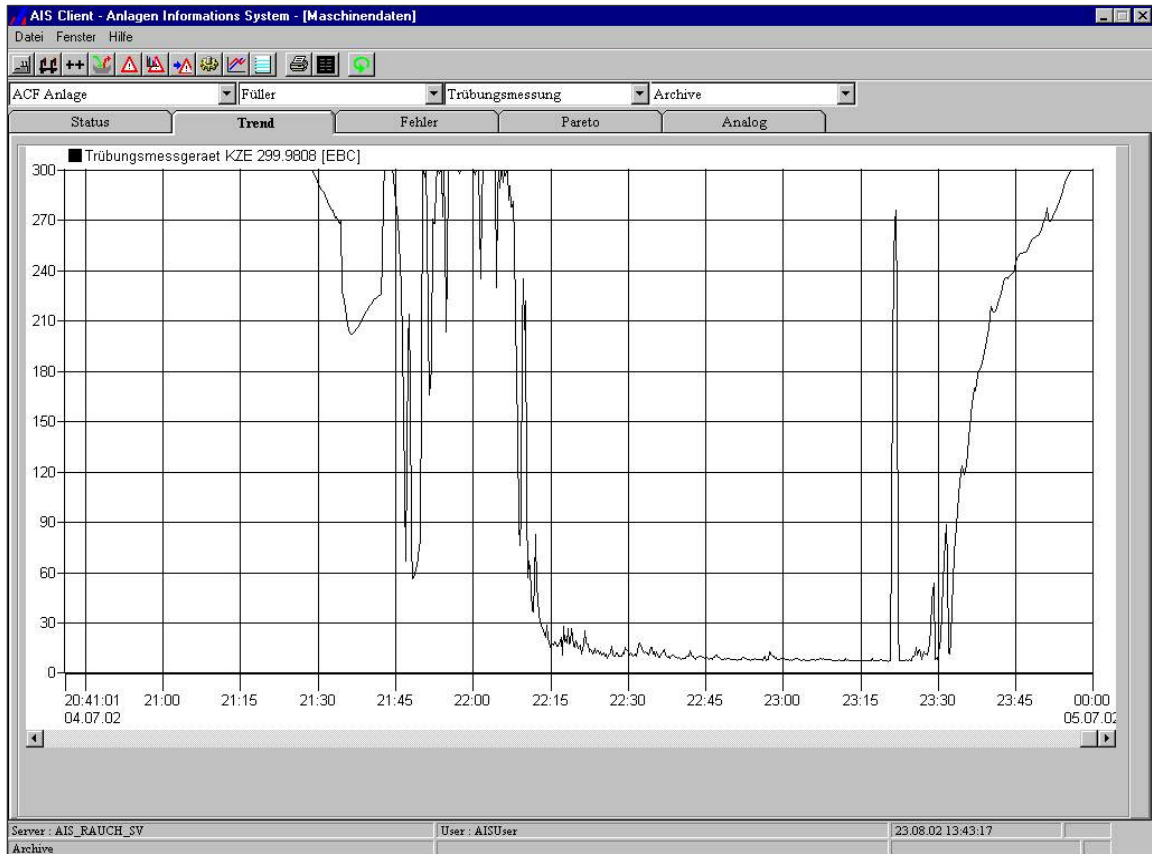


Abbildung 57: Aufzeichnung von Trübungswerten aus Betrieb R

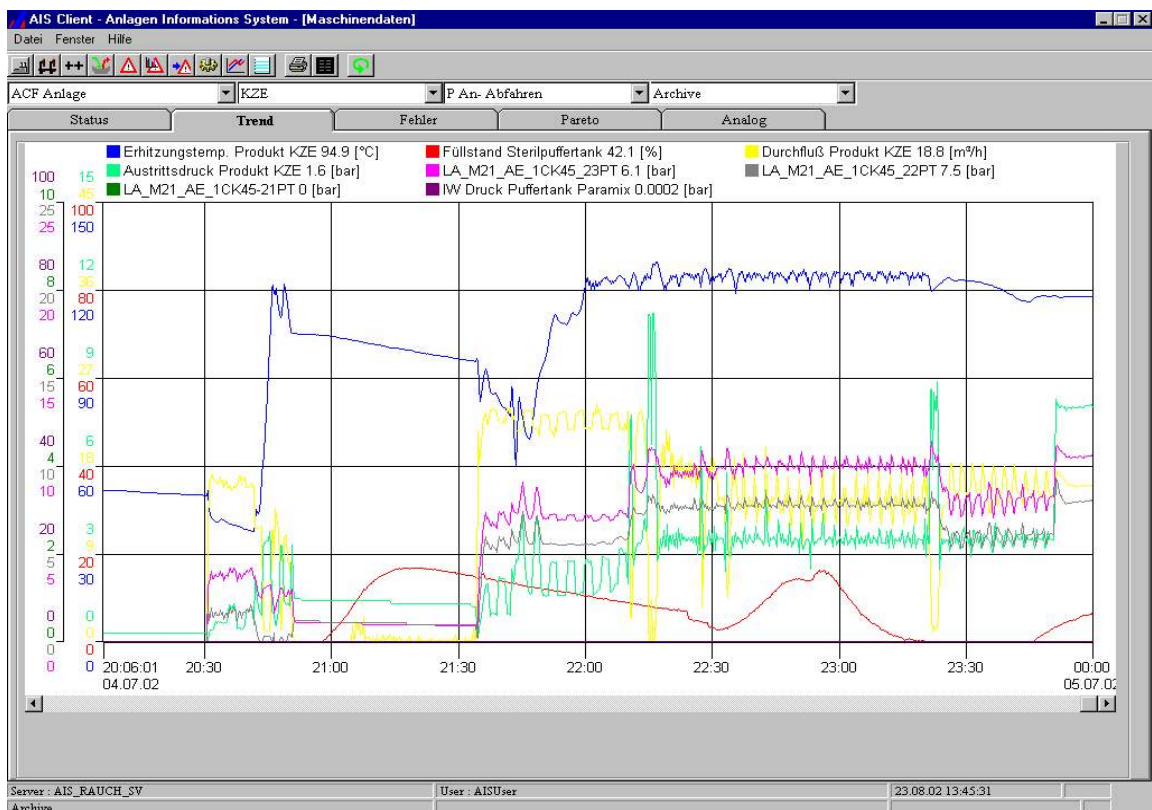


Abbildung 58: Aufzeichnung von Messwerten aus Betrieb R

Des Weiteren muss sicher gestellt sein, dass die gesamte Strömungskinetik druckstoßfrei abläuft und Druckschwankungen im System bei der CIP, der Sterilisation, der Abkühlphase, der Produktion, den Kreislaufphasen sowie beim An- und Abfahren nicht auftreten. Neben einem positiven Druckgefälle in der KZE-Anlage sowie den aseptischen Ventilen und Pumpen ist darauf zu achten, dass alle Messwertaufnehmer und Inline-Probenahmeventile im Variventgehäuse oder ähnlich konzipierten Bauteilen integriert sind. Auch muss sicher gestellt sein, dass nach erfolgter Sterilisation der Komplettanlage bei z.B. 125 °C sich durch die Volumenkontraktion in der Abkühlphase kein Vakuum bildet. Entsprechende Ausgleichs- und Entlüftungssysteme wurden nachträglich in die Gesamtanlage eingebaut. Es wurde vorgeschlagen, die Anlage unter Druck zu halten (positives Druckgefälle) bzw. einen Steril-Schnüffelfilter zu installieren. Des Weiteren müssen in der Prozessteuerung für die anstehenden Messwerte für Temperatur, Durchfluss, Leitwert und Druck die entsprechenden Sollwertvorgaben permanent überwacht, visualisiert, dokumentiert und mit oberen und unteren Grenzwerten abgesichert werden. Aus den Aufzeichnungen ist ersichtlich, dass sich mit falschen bzw. verzögerten Ventilschaltungen die Druckverhältnisse negativ verändern. Die Trübungswerte steigen an, bedingt durch das von den entstandenen Mikroblasen induzierte "Over-Range-Signal" (vgl. Abbildung 54 und Abbildung 55). Parallel dazu wurde der Nachweis erbracht, dass in diesen Situationen eine mikrobiologische Befundlage entsteht und die KZE-Anlage nicht mehr als sogenannte "*Mikrobiologische Firewall*" wirkt; de facto liegt ein "Durchbruch" vor (vgl. Tabelle 25 u. Tabelle 26).

Tabelle 25: Mikrobiologische Ergebnisse zum KZE-Durchbruch Betrieb G (1)

Analyse Nr.: 01010-168 u. 230 / Betriebslaboratorium Betrieb "G"			
Isolation und Identifizierung von Infektionskeimen			Betrieb G
Probenverarbeitung vom 21.06.2001 (kontinuierliche Probennahme)			
Probe	Produkt	Probenahmestelle	Bemerkung
01010-168	Bier	G/FKDTEK	Filtration 141 bis 23:00 Uhr
01010-230	Bier	G/FKDTEK	Filtration 142
		Identifizierung des Mikroorganismus	
Probe		NBB-Agar	Würze-Agar
01010-168		o. B.	10 Hefen
01010-230		o. B.	o. B.
Kolonien auf Petrischalen nach Filtrationsproblematik "Gasblasen" durch KZE-Anlage			

Tabelle 26: Mikrobiologische Ergebnisse zum KZE-Durchbruch Betrieb G (2)

Analyse Nr.: 01010-168 u. 230 / Betriebslaboratorium Betrieb "G"			
Isolation und Identifizierung von Infektionskeimen			Betrieb G
Probenverarbeitung vom 21.06.2001 (kontinuierliche Probennahme)			
Probe	Produkt	Probenahmestelle	Bemerkung
01010-228	Bier	G/FKKZEEK	Filtration 142 bis 12:05 Uhr
01010-229	Bier	G/FKKZEEK	Filtration 143 bis Ende
		Identifizierung des Mikroorganismus	
Probe		NBB-Agar	Würze-Agar
01010-228		o. B.	4 Hefen
01010-229		o. B.	100 Hefen / Stäbchen
Kolonien auf Petrischalen nach Filtrationsproblematik "Gasblasen" durch KZE-Anlage			

5.1.3 Auslegung von Pasteurisationsanlagen

5.1.3.1 Einflussgrößen

Während der Inbetriebnahme einer kaltaseptischen Anlage trat das bis dato unbekannte Phänomen auf, dass Askosporen der Hefe *Pichia anomala*, mit einer Pasteurisation von 95 °C über 60s (30 PE – 80 °C-Formel), die Kurzzeiterhitzung überlebten und damit zu hygienisch instabilen Verhältnissen führten. Gleiches gilt für *Alicyclobacillus sp.*, der die angesetzte Pasteurisation eines Fruchtsaftkonzentrates von 99 °C über 60 s (77 PE – 80°-Formel) überleben konnte. Auch kam es 2009 zu Rückrufaktionen in Fruchtsaftbetrieben, da Produktbeeinträchtigungen durch *Alicyclobacillus sp.* vorlagen [149, 150] [48, 151, 152]. Die Sporen des *Alicyclobacillus sp.* wurden über die Konzentrate bis ins Kühllager eingebracht, so dass nach der Ausmischung zum Fertiggetränk die vorhandenen Sporen nicht mehr durch die Pasteurisation abgetötet wurden. Die eingestellten Pasteurisationseinheiten waren mit 30 PE zu niedrig angesetzt. Für eine sichere Abtötung von zwei Zehnerpotenzen sind mindestens 1.500 PE notwendig (vgl. Tabelle 27). In einer Brauerei überleben Askosporen der Hefe vom Typ *Saccharomyces diastaticus* eine Pasteurisation von 78 °C über 30s (32 PE – 60°-Formel). Erforderlich waren jedoch zur sicheren Abtötung deutlich höhere Pasteurisationseinheiten von 43,9 PE (60 °C-Formel), d.h. 73,5 °C bei 30s Heißhaltezeit (vgl. Tabelle 28).

5.1.3.2 Auslegung nach Abtötungsraten sowie D- u. z-Werten

Aufgrund der unterschiedlich notwendigen letalen thermischen Energie zur Inaktivierung der vorliegenden Mikroorganismen empfiehlt sich die Durchführung eines Hitzeresistenztests um die D- und z-Werte der Kontaminationskeime zu ermitteln. Daraus

lassen sich dann die benötigte Verweilzeit und Einwirkungstemperaturen bzw. die Pasteurisationseinheiten definieren.

Aus den in der Literatur genannten und selbst ermittelten D- und z-Werten wurde erstmalig eine auf wissenschaftlichen Ergebnissen basierende Berechnungstabelle für die notwendigen spezifischen Pasteurisationseinheiten in Abhängigkeit von Keimart und Keimvorbelastung sowie des Vorliegens in der vegetativen oder sexuellen Form erstellt. Mit dieser Tabelle ist es erstmalig aufgrund der ermittelten Hitzeresistenzen möglich, die Pasteurisationseinheiten, je nach Populationsdichte und Mikroorganismus, für eine abgesicherte Pasteurisation festzulegen (vgl. Tabelle 27 und Tabelle 28). Für die erfolgreiche Funktionalität einer KZE-Anlage besteht demnach u. a. auch die Grundvoraussetzung, dass die Keimdichten im unsterilen Produkt ermittelt werden und die vorliegenden Keimarten (Schimmelpilze, Hefen und Bakterien) bekannt bzw. identifiziert sind, um die Hitzeresistenzen beurteilen zu können. Des Weiteren interessiert die zu pasteurisierende Getränkeart nicht nur auf Grund der mikrobiologischen Anfälligkeit, sondern auch auf Grund der Tatsache, dass unter bestimmten Stressfaktoren einige Hefen auch in der sexuellen Form als Askosporen vorliegen können.

Dies führt demnach dazu, dass die vorgegebenen Pasteurisationseinheiten nicht mehr zur Deaktivierung der Askosporen ausreichen. Als Führungsgrößen für die Kurzzeiterhitzungsanlagen werden in der Regel die Pasteurisationseinheiten auf Basis der 80 °C-Fruchtsaftformel herangezogen, um die benötigte letale thermische Dosis festzulegen. Nur wenn die benötigten Pasteurisationseinheiten richtig ermittelt und dann auch angewendet werden, kann die KZE-Anlage die entsprechenden Keime abtöten. Für die praktische Anwendung und Überprüfung der Funktionalitäten von KZE-Anlagen wurde daher erstmalig ein Berechnungsbeispiel auf Basis einer Excel-Tabelle aufgestellt, welches die Abhängigkeiten von Temperatur, Durchfluss und Verweilzeit darstellt. Grundlage hierfür sind das Volumen der Heißhaltestrecke, also die Bestimmung der Länge und des Durchmessers der Rohrleitung, sowie die "Rampe" bei der Erhöhung oder Erniedrigung des Volumenstroms. Hieraus ist auch ersichtlich, dass eine "echte" PE-Regelung der KZE-Anlagen für kaltaseptische Abfüllanlagen vorgesehen werden muss (vgl. Tabelle 28). Aus diesen Untersuchungen ist ersichtlich und nachvollziehbar, dass die in der Praxis angewandten Pasteurisationseinheiten nicht die benötigte letale thermische Energie bereitstellen, um die Askosporen von *Pichia anomala* und *Saccharomyces diastaticus* sowie die Sporen von *Alicyclobacillus acidoterrestris* abzutöten.

Tabelle 27: Berechnung PE-Werte aus D- u. z-Werten für Keimvorbelastung

Pasteurisationseinheiten verschiedener Keime in Abhängigkeit von D- und z-Werten		Fruchtsaftformel		04. KW 2010												
PE = Zeit x 1,2589 ^(Temperatur - 80)		Fruchtsaftformel		04. KW 2010												
Verweilzeit		Betriebstemperaturen in °C		KZE-Anlage												
		115 °C	95 °C	85 °C												
		3.153 PE	32 PE	3 PE	d = 0,888 m											
		1.577 PE	16 PE	2 PE	l = 48,00 m											
					V = 0,241 m³											
Getränkeschädlinge		Reduzierung der Keime um jeweils eine Zehnerpotenz														
Literatur	D-Wert	z-Wert	Log 1		Log 2		Log 3		Log 4		Log 5					
			[min]	[°C]	[PE]	[min]	[°C]	[PE]	[min]	[°C]	[PE]	[min]	[°C]	[PE]		
<i>Allycyclophacillus acidocalcaratus</i>	95,0	5,30	9,5	168	5,3	104,5	1,493	5,3	114	13,304	5,3	123,5	5,3	133	1,056,358	
<i>Bacillus cereus</i>	100,0	3,10	9,2	310	3,1	109,5	2,761	3,1	119	24,605	3,1	128,5	3,1	138	1,953,679	
<i>Bacillus coagulans</i>	121,0	0,07		881	0,1	130,5	7,846	0,1	140	69,915	0,1	149,5	0,1	159	5,551,438	
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	121,0	1,50	6,0	18,868	1,5	130,5	168,131	1,5	140	1,498,184	1,5	149,5	1,5	159	118,959,385	
<i>Clostridium botulinum</i>	121,0	0,21	10,0	2,642	0,2	130,5	23,538	0,2	140	209,746	0,2	149,5	0,2	159	16,554,314	
<i>Clostridium perfringens</i>	110,0	0,50		500	0,5	119,5	4,453	0,5	129	39,677	0,5	138,5	0,5	148	3,150,459	
California Keime	65,0	3,00	6,6	0	3,0	74,5	1	3,0	84	8	3,0	93,5	3,0	103	598	
<i>E. coli</i> O157	60,0	0,75	4,8	0	0,8	69,5	0	0,8	79	1	0,8	88,5	0,8	98	47	
<i>Leuconostoc</i> sp.	65,0	1,00	5,5	0	1,0	74,5	0	1,0	84	3	1,0	93,5	1,0	103	199	
<i>Lactobacillus</i> sp.	65,0	1,00	5,5	0	1,0	74,5	0	1,0	84	3	1,0	93,5	1,0	103	199	
<i>Candida</i> sp.	65,0	1,00	4,5	0	1,0	74,5	0	1,0	84	3	1,0	93,5	1,0	103	199	
Osmophile Hefen	55,0	1,00	4,2	0	1,0	64,5	0	1,0	74	0	1,0	83,5	1,0	93	20	
<i>Pichia anomala</i> (Askoporen)	75,0	0,17	18,0	0	0,2	84,5	0	0,2	94	4	0,2	103,5	0,2	113	332	
<i>Pichia anomala</i> (Hansenula anomala)	55,0	1,00	6,4	0	1,0	64,5	0	1,0	74	0	1,0	83,5	1,0	93	20	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55,0	0,76	5,0	0	0,8	64,5	0	0,8	74	0	0,8	83,5	0,8	93	15	
<i>Talaromyces flavus</i> (Askoporen)	90,6	2,20	5,2	25	2,2	100,1	2,25	2,2	109,6	2,005	2,2	119,1	2,2	128,6	159,220	
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	55,0	1,00	4,2	0	1,0	64,5	0	1,0	74	0	1,0	83,5	1,0	93	20	
<i>Aspergillus</i> sp.	62,0	1,00	9,0	0	1,0	71,5	0	1,0	81	1	1,0	90,5	1,0	100	100	
<i>Byssocladia nivea</i>	92,0	1,90	7,0	30	1,9	101,5	268	1,9	111	2,390	1,9	120,5	1,9	130	189,808	
<i>Byssocladia fuba</i>	90,0	12,00	7,8	120	12,0	99,5	1,069	12,0	109	9,526	12,0	118,5	12,0	128	756,416	
<i>Eugenicillium</i> sp.	90,0	15,00		150	15,0	99,5	1,336	15,0	109	11,908	15,0	118,5	15,0	128	945,519	
<i>Neosartoria</i> sp.	85,0	9,60	12,0	30	9,6	94,5	270	9,6	104	2,410	9,6	113,5	9,6	123	191,379	
<i>Penicillium</i> sp.	60,0	1,00	5,7	0	1,0	69,5	0	1,0	79	1	1,0	88,5	1,0	98	63	
<i>Bacillus subtilis</i> (DSMZ 4181)	80,0	10,60	20,5	11	10,6	89,5	94	10,6	99	84,2	10,6	108,5	10,6	118	66,830	
<i>Lactobacillus frigidus</i> (Stamm-Nr. L 150)	50,0	1,60	22,7	0	1,6	59,5	0	1,6	69	0	1,6	78,5	1,6	88	10	
<i>Lactobacillus lindneri</i> (Stamm-Nr. L 2)	59,0	1,90	14,6	0	1,9	68,5	0	1,9	78	1	1,9	87,5	1,9	97	95	
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404)	55,0	1,20	10,5	0	1,2	64,5	0	1,2	74	0	1,2	83,5	1,2	93	24	
<i>Allycyclophacillus acidoterrestris</i> (DSMZ 3922)	86,0	5,90	22,1	23	5,9	95,5	209	5,9	105	1,865	5,9	114,5	5,9	124	148,970	
<i>Pichia anomala</i> (Stamm-Nr. P 27)	57,9	0,10	15,0	0	0,1	67,4	0	0,1	76,9	0	0,1	86,4	0	0,1	95,9	4
<i>Pichia anomala</i> (Isolat)	75,0	0,17	18,0	0	0,2	84,5	0	0,2	94	4	0,2	103,5	0,2	113	332	
<i>Saccharomyces diastaticus</i> (Stamm-Nr. S 22)	61,9	0,30	8,3	0	0,3	71,4	0	0,3	80,9	0	0,3	90,4	0,3	99,9	29	

Tabelle 28: Spezifische Pasteurisationseinheiten für eine KZE-Anlage

Pasteurisationseinheiten in Abhängigkeit von Durchfluss und Temperatur																	
d = 0,080 m l = 48,00 m V = 0,241 m ³		(Beispiel-Tabelle für Kurzzeiterhitzungs-Anlage)															
		04. KW 2010															
		Fruchtsaftformel															
		PE = Zeit x 1,2589 ^(Temperatur - 80)															
Verweilzeit		105 °C	104 °C	103 °C	102 °C	101 °C	100 °C	99 °C	98 °C	97 °C	96 °C	95 °C	94 °C	93 °C	92 °C	91 °C	90 °C
1,00	min	315	251	199	158	126	100	79	63	50	40	32	25	20	16	13	10
0,96	min	305	242	192	153	121	96	77	61	48	38	30	24	19	15	12	10
0,90	min	286	227	180	143	114	90	72	57	45	36	29	23	18	14	11	9
0,85	min	269	214	170	135	107	85	68	54	43	34	27	21	17	13	11	9
0,80	min	254	202	160	127	101	80	64	51	40	32	25	20	16	13	10	8
0,76	min	241	191	152	121	96	76	60	48	38	30	24	19	15	12	10	8
0,72	min	229	182	144	115	91	72	57	46	36	29	23	18	14	11	9	7
0,69	min	218	173	137	109	87	69	55	43	35	27	22	17	14	11	9	7
0,66	min	208	165	131	104	83	66	52	41	33	26	21	17	13	10	8	7
0,63	min	199	158	125	100	79	63	50	40	32	25	20	16	13	10	8	6
0,60	min	191	151	120	96	76	60	48	38	30	24	19	15	12	10	8	6
0,58	min	183	145	115	92	73	58	46	37	29	23	18	15	12	9	7	6
0,56	min	176	140	111	88	70	56	44	35	28	22	18	14	11	9	7	6
0,54	min	169	135	107	85	67	54	43	34	27	21	17	13	11	8	7	5
0,52	min	163	130	103	82	65	52	41	33	26	21	16	13	10	8	7	5
0,50	min	158	125	100	79	63	50	40	31	25	20	16	13	10	8	6	5
0,48	min	152	121	96	76	61	48	38	30	24	19	15	12	10	8	6	5
0,47	min	148	117	93	74	59	47	37	29	23	19	15	12	9	7	6	5
0,45	min	143	114	90	72	57	45	36	29	23	18	14	11	9	7	6	5
0,44	min	139	110	87	69	55	44	35	28	22	17	14	11	9	7	6	4
0,43	min	135	107	85	67	54	43	34	27	21	17	13	11	8	7	5	4
0,41	min	131	104	82	65	52	41	33	26	21	16	13	10	8	7	5	4

Insbesondere sind bei der Festlegung der benötigten Pasteurisationseinheiten die Keimvorbelastungen mit zu berücksichtigen. Des Weiteren muss sicher gestellt sein, dass in den Konzentraten und Rohstoffen keine bekannten Stressfaktoren vorliegen, die eine Sporulation der Mikroorganismen induzieren und somit die Hitzeresistenzen deutlich erhöhen.

5.1.4 Diskussion

Bei einer potentiellen Keimvorbelastung der unsterilen Produkte von ca. 1.000 KBE/ml und den derzeitigen zugesicherten Eigenschaften (Garantieangaben) der Hersteller (bei der aseptischen Abfüllung maximal eine kontaminierte 1,0 Liter PET-Flasche von 50.000 bzw. 100.000 Flaschen) darf demnach nur 1 Keim in 50.000 bzw. 100.000 Liter, entsprechend 50.000.000 ml bzw. 100.000.000 ml überleben. Daraus resultiert eine maximale Keimbelastung in der Gesamtcharge, demnach in den abgefüllten Flaschen, von 0,000.000.02 bzw. 0,000.000.01 KBE/ml (dies entspricht 2×10^{-8} bzw. 1×10^{-8} KBE/ml).

Dies ist eine fiktive Größe und kann nur in der Gesamtheit der Abfüllchargen betrachtet werden. Nimmt man nun noch die Keimvorbelastung von ca. 1.000 KBE/ml mit einer Sicherheit von zwei Zehnerpotenzen an, werden u. a. bei kaltseptischen Anlagen "Keimabtötungsraten" von 13 bis 14 Zehnerpotenzen und sogar darüber zu Grunde gelegt. Für die vorgeschaltete KZE-Anlage bedeutet dies, dass die Pasteurisation bzw. die sog. "*kommerzielle Sterilisation*" auf eine Keimabtötungsrate von 5 bis 6 Zehnerpotenzen auszulegen ist [53]. Für die erfolgreiche Funktionalität einer KZE-Anlage besteht demnach u. a. auch die Grundvoraussetzung, dass die Keimdichten im unsterilen Produkt ermittelt werden und die vorliegenden Keimarten (Schimmelpilze, Hefen und Bakterien) bekannt bzw. identifiziert sind, um deren Hitzeresistenzen beurteilen zu können.

Des Weiteren interessiert die zu pasteurisierende Getränkeart nicht nur wegen der mikrobiologischen Anfälligkeit, sondern auch wegen der Tatsache, dass unter bestimmten Stressfaktoren einige Hefen auch in der sexuellen Form als Askosporen vorliegen können [57]. Dann liegt bei der sexuellen Form eine erhöhte Hitzeresistenz gegenüber der vegetativen Form der Hefen vor, die dazu führen kann, dass die vorgegebenen Pasteurisationseinheiten nicht mehr zur Deaktivierung der Askosporen ausreichen und die Pasteurisationseinheiten bzw. die veranschlagte thermische Letalenergie zu gering bemessen wurden.

Mit den in den Versuchen ermittelten Hitzeresistenzen sowie aus der Literatur bekannten Hitzeresistenzen bzw. D- und z-Werten von Getränkeschädlingen wurde erstmalig, in

Abhängigkeit von der Keimvorbelastung, die benötigten Pasteurisationseinheiten zur geforderten Keimreduktion und Erreichung der produktspezifischen Getränkesterilität berechnet und in Form einer Tabelle dargestellt.

Mit dieser aus wissenschaftlich abgesicherten Messergebnissen erstellten Tabelle, lässt sich jetzt die benötigte letale thermische Energie für die kommerzielle Getränkesterilität, in Abhängigkeit von Keimart und Keimdichte, als Pasteurisationseinheiten für Kurzzeit-Erheizungsanlagen und Pasteure ermitteln. Die in der Praxis angewandten Pasteurisationseinheiten können demnach nicht die benötigte letale thermische Energie bereitstellen, um die Askosporen von *Pichia anomala* und *Saccharomyces diastaticus* sowie die Sporen von *Alicyclobacillus acidoterrestris* abzutöten. Bei der Festlegung der benötigten Pasteurisationseinheiten ist die Keimart, das Vorliegen von Sporen und Askosporen sowie deren Keimvorbelastung im Getränk mit zu berücksichtigen. Ferner muss sicher gestellt sein, dass in den Konzentraten und Rohstoffen keine Stressfaktoren, wie Trockenheit (Dehydrierung) oder Zellgifte (Teein, Koffein) vorliegen, die eine Sporulation der Mikroorganismen induzieren und damit die Hitzeresistenzen deutlich erhöhen.

5.2. Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit von Keimreduktionstests (CRT)

Die Aussagefähigkeit eines anlagen- und parameterspezifischen Keimreduktionstests (CRT) an aseptischen Abfüllanlagen ist neben der eigentlichen Versuchsdurchführung vor Ort auch maßgeblich von der Reproduzierbarkeit der Keimzahlbestimmungen im Labor abhängig [31, 157-159]. Daher wurden die Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen der Transportkontrollen - als Ausgangskonzentration - wie auch die Ergebnisse der Keimreduktionstest an den Anlagen statistisch ausgewertet, um deren Aussagefähigkeit zu erfassen und auszuwerten.

5.2.1 Transportkontrollen

Zur Einschätzung der Reproduzierbarkeit für die Keimreduktionstests liegen 52 Analysenreihen aus Transportkontrollen für vor Ort durchgeführte Tests vor, davon 27 Reihen mit Flaschen, 15 mit Verschlüssen und 3 mit Bechern. Die Transportkontrollen wurden dem inokulierten Gesamt-Probenmaterial entnommen und nicht durch die zu testenden Desinfektionsstufen der betroffenen Anlagen gefahren. Sie dienten daher zur Ermittlung der dem Keimreduktionstest (CRT) zugrunde liegenden Ausgangsbelastung des Probenmaterials.

Aus diesen Untersuchungsserien wurden die Konfidenzbereiche für den Vertrauensbereich von 95 % der Untersuchungsergebnisse aus den Ausgangskeimzahlen des Testkeims *Bacillus subtilis* der Transportkontrollen ermittelt.

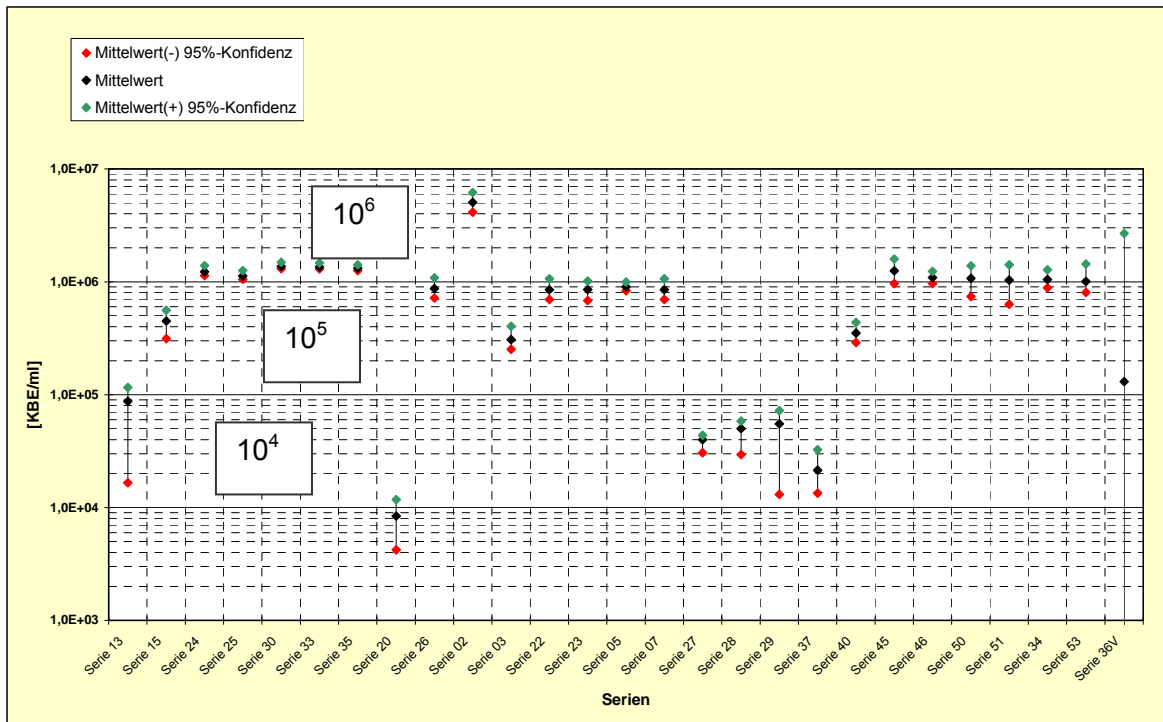


Abbildung 59: Transportkontrolle - Flaschen nach Höhe der Inokulationskeimzahl geordnet

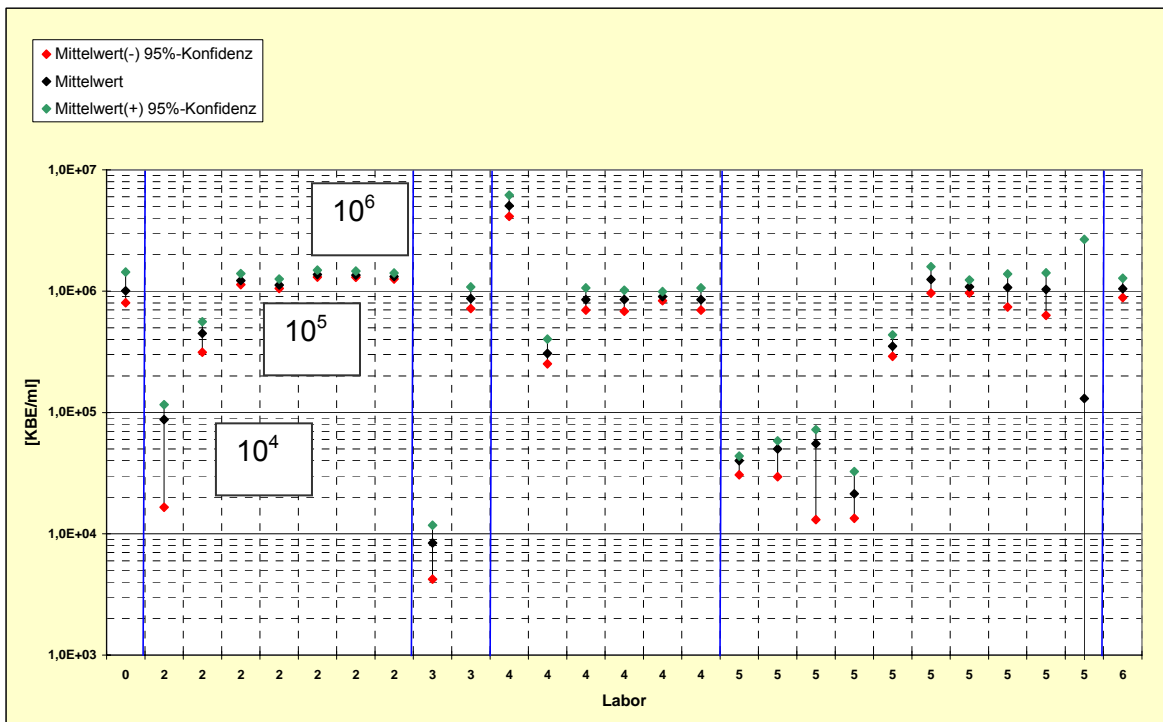


Abbildung 60: Transportkontrolle - Flaschen nach den Labors geordnet

Die Analysenreihen unterschieden sich bei den vorgenommenen Inokulationen teilweise bezüglich der eingestellten Ausgangskonzentration, den Testspezies sowie des Probenumfangs. Die Inokulationen der Transportkontrollen wurden in fünf verschiedenen Labors durchgeführt (vgl. Abbildung 59 und Abbildung 60).

Daraus resultiert für jede Analysenreihe ein eigener "wahrer" Wert; die der Ausgangskonzentration zur Ermittlung der logarithmischen Keimreduktion. Dieser ist jedoch noch nicht bekannt und muss ja erst im Rahmen der Transportkontrollen bestimmt werden.

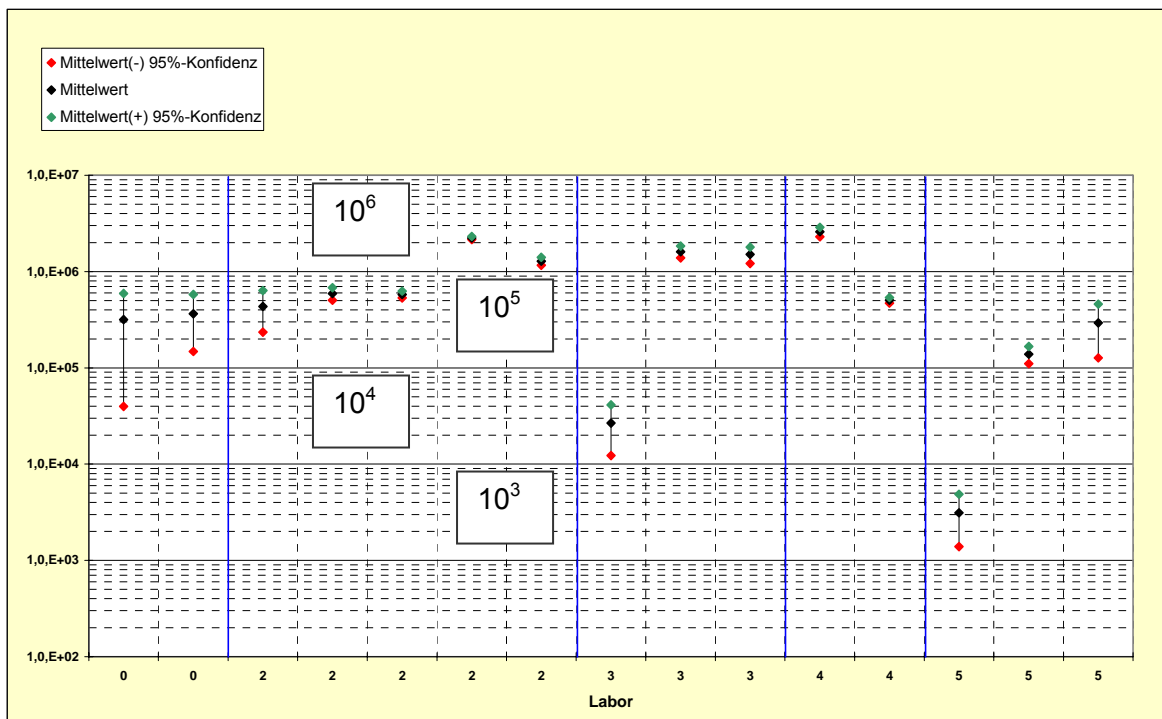


Abbildung 61: Transportkontrolle - Verschlüsse nach den Labors geordnet

Die insgesamt 417 Einzelbestimmungen aus den Verpackungen stellen daher keine Grundgesamtheit für eine gemeinsame statistische Auswertung dar. Es können lediglich aus jeweils einer Testreihe der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt werden. Um die Reproduzierbarkeit der Analysen bewerten zu können, müssen die Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen daher einzeln logarithmiert werden, bevor sie der statistischen Auswertung unterzogen werden, anders als es nach den derzeitigen Regeln durchgeführt wird [116]. Dies ist deshalb erforderlich, da zur Ermittlung der Keimreduktion für die jetzt praktizierte Berechnungsmethode definitionsgemäß jeweils die mittleren logarithmischen Ausgangs- und Endkeimzahlen herangezogen werden. Aus den Testreihen ist ersichtlich, dass die Einzelwerte einer Reihe unterschiedlich stark voneinander abweichen (vgl. Abbildung 59 bis Abbildung 62).

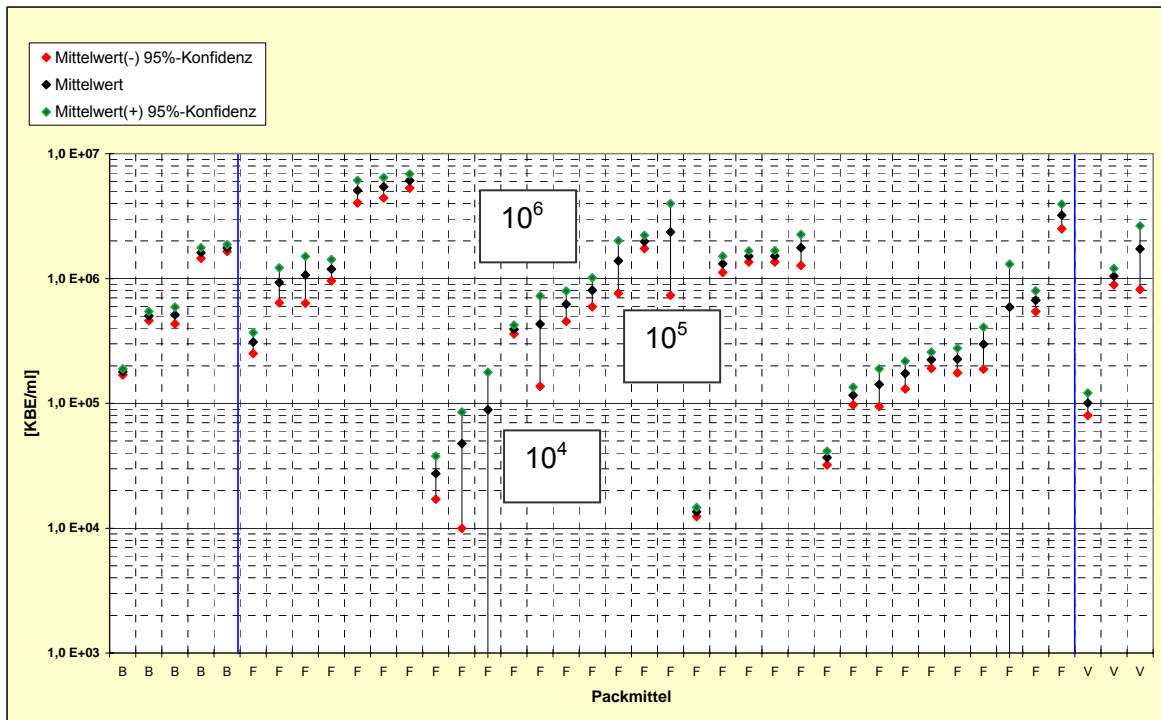


Abbildung 62: Transportkontrolle - Flaschen/Becher/Verschlüsse nach Packmittel

Statistisch abgesicherte Aussagen, inwieweit die ermittelten Abweichungen mit den Parametern der Ausgangskeimzahl, des Probenumfangs und dem durchführenden Labor korrelieren, können aufgrund des zu geringen Umfangs sowie der Inhomogenität der ausgewerteten Analysenreihen zum jetzigen Zeitpunkt nicht getroffen werden. Festgestellt wurde jedoch, dass die mittleren Standardabweichungen bis zu 5,9 % über bzw. 39,5 % unter den jeweiligen Mittelwerten liegen.

Tabelle 29: Übersicht zur Auswertung der Transportkontrollen

	Flaschen	Verschlüsse	Becher
Anzahl Versuchsreihen	27	15	3
Probenumfang gesamt	252	154	11
Mittlere positive Abweichung der Standardabweichung vom Mittelwert	2,2 %	2,5 %	5,9 %
Mittlere negative Abweichung der Standardabweichung vom Mittelwert	4,1 %	6,5 %	39,5 %

Wie aus den zusammengefassten Auswertungen damit ersichtlich, wurde die mittlere positive bzw. negative Abweichung der Standardabweichungen bei Flaschen mit 2,2 %

bzw. 4,1 % und bei den Verschlüssen mit 5,9 % bzw. 6,5 % berechnet (vgl. Tabelle 29). Damit wird erstmalig statistisch gezeigt, mit welcher hohen Streuung die derzeit praktizierte Erfassung der Ausgangskeimzahlen der Inokulate für die Durchführung und Ermittlung der mittleren logarithmischen Keimreduktion behaftet ist. Dies betrifft sowohl die Streuung innerhalb einer Messserie wie auch die Streuung zwischen den einzelnen Untersuchungslaboratorien bzw. Instituten.

Für eine hinreichende Genauigkeit und Reproduzierbarkeit eines Keimreduktionstests (CRT) muss zunächst die Keimzahlbestimmung reproduzierbar durchgeführt werden. Dies bedeutet, dass statistisch belastbare Testreihen mit bekannten Stammsuspensionen für einzelne Testspezies innerhalb eines Labors unter standardisierten Bedingungen (z. B. Alter und Aufbewahrung der Suspension, Anlegen der Verdünnungsreihen, Auswerten) durchzuführen sind. Hieraus lässt sich die maximal erreichbare Genauigkeit einer Keimzahlbestimmung ableiten. Auf Basis dieser Standardanalysen sind dann die Ringanalysen durchzuführen, an denen sich Labors, welche Keimzahlbestimmungen im Rahmen eines Keimreduktionstests durchführen wollen, beteiligen müssen. Damit kann die Güte bzw. Reproduzierbarkeit eines Labors und eines Instituts hinsichtlich einer CRT-Vorbereitung und -Auswertung ermittelt werden. Wenn sichergestellt ist, dass nur reproduzierbar arbeitende Labors diese Untersuchungen durchführen, können Toleranzwerte für Keimzahlbestimmungen und damit für Abtötungsraten festgelegt und Testergebnisse unabhängig vom Tester verglichen bzw. als objektive Abnahmekriterien herangezogen werden.

5.2.2 Keimreduktionstests

Insgesamt wurden 52 Keimreduktionstests zur Flaschendesinfektion zusammengetragen, die von vier verschiedenen Instituten und Laboratorien im Rahmen von Unternehmungsberatungen zur Inbetriebnahme und Abnahme veranlasst wurden. Die durchgeführten Einzelmessungen je Serie liegen nach dem Durchlauf zwischen 13 und 48 Keimzahlbestimmungen. Die ebenfalls mit erfassten MLK-Bestimmungen der Verschlüsse, Platinen und Becher wurden für die grundlegende Betrachtung nicht berücksichtigt. Da lt. VDMA-Merkblatt Nr. 6 die Prüfung von Aseptikanlagen mit Packmittel-Entkeimungsvorrichtungen auf deren Wirkungsgrad bei lediglich 20 Desinfektions- bzw. Sterilisationsproben und nicht von allen installierten Positionen erfolgt, ist die Aussage zur Entkeimungseffizienz mit der jetzigen Überprüfungsmethodik nicht korrekt [116]. Dies wird damit begründet, dass die Funktionalität und damit die Überprüfung aller Desinfektions- bzw. Sterilisationsstellen eines Aggregats sicher gestellt sein müssen, um eine mikrobiologisch sichere aseptische Abfüllung zu gewährleisten.

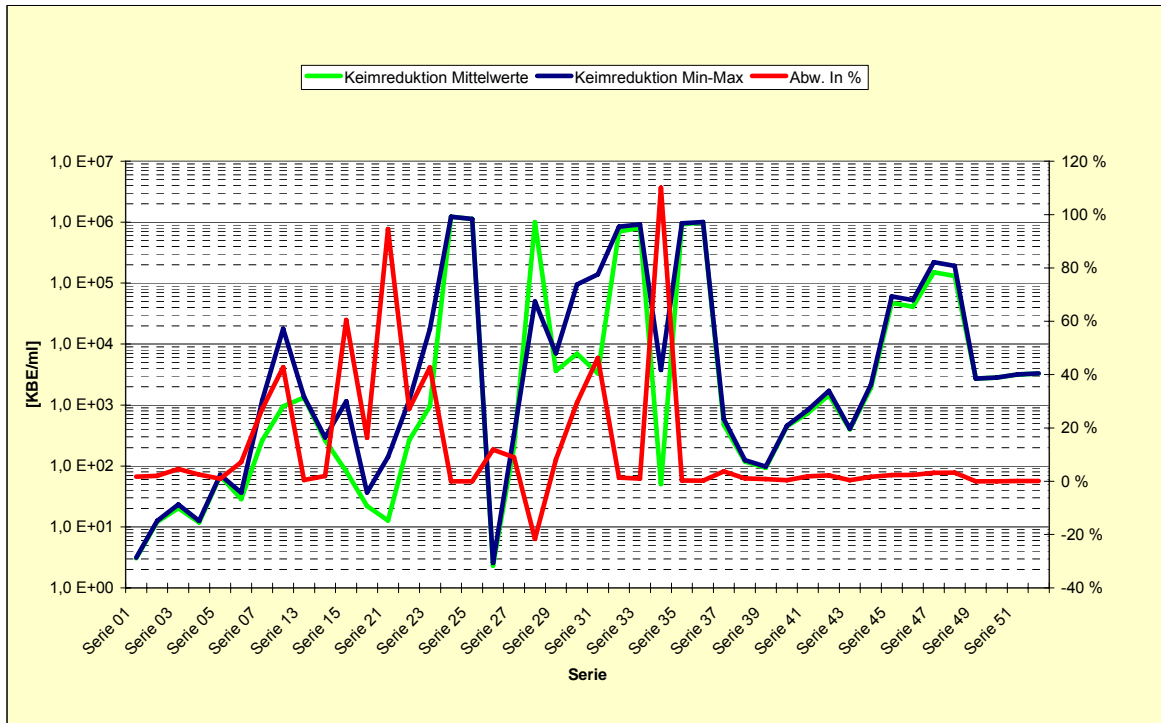


Abbildung 63: Abweichung ermittelter Keimreduktionswerte aufgrund der Berechnungsart

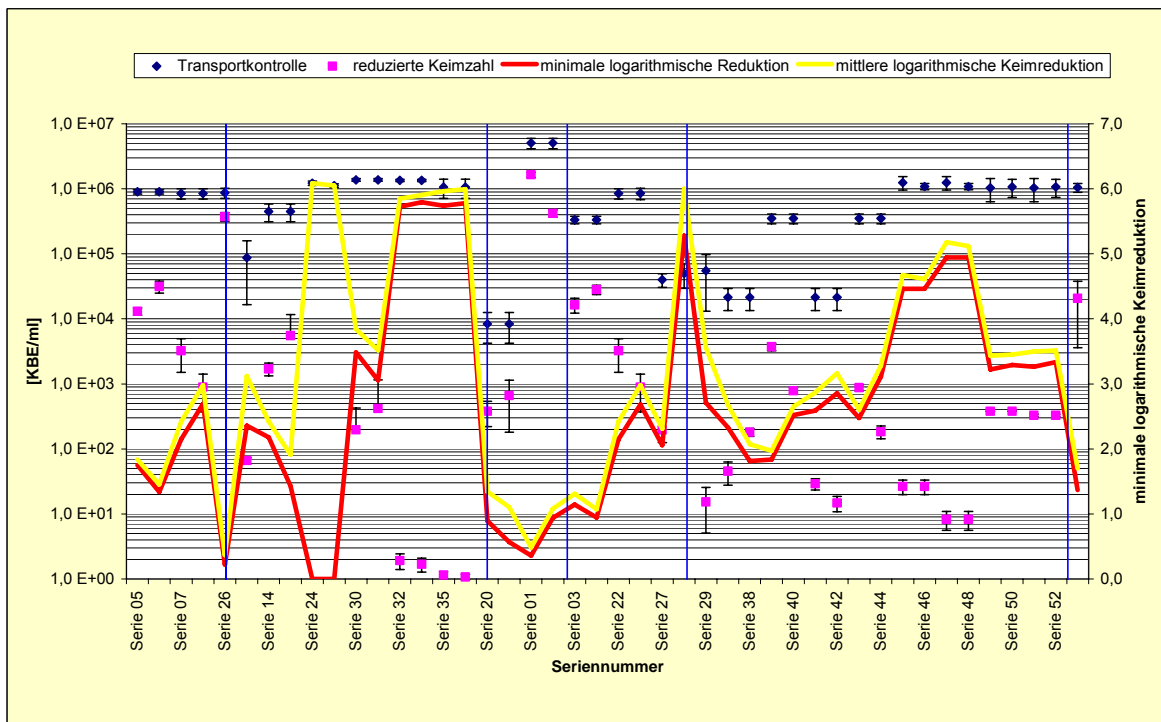


Abbildung 64: Keimreduktionswert-Auswertung nach minimaler log. Keimreduktion (sortiert nach Seriennummern)

In der Abbildung 63 und der Abbildung 64 sind die prozentualen Abweichungen des Keimreduktionswerts, bezogen auf die Mittelwerte, aufgrund der Berechnungsart, sortiert nach Seriennummern bzw. Labor bzw. Prüfstelle, als Logarithmus des Mittelwerts der Einzelproben "MLK gesamt" zum Mittelwert der Logarithmen der Einzelproben "MLK

einzel" dargestellt. Der Unterschied ist umso größer, je näher die gefundenen Keimzahlen gegen Null gehen. Nachdem jede Position am Rinser, Injektor oder Aktivator einzeln betrachtet werden sollte, muss demnach auch für jede Probe einzeln die logarithmische Keimreduktion bestimmt und daraus erst der Mittelwert gebildet werden.

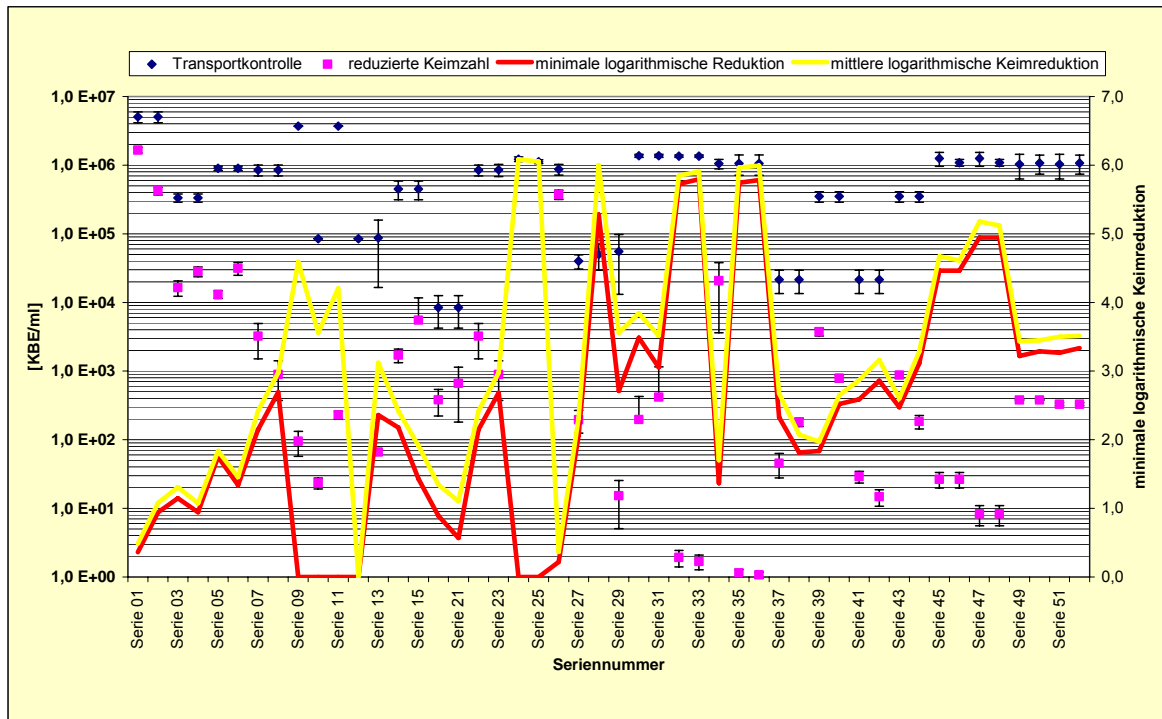


Abbildung 65: Keimreduktionswert-Auswertung nach minimaler log. Keimreduktion (sortiert nach Labor bzw. Prüfstelle)

In der Abbildung 65 sind die Keimzahlbestimmungen aus den Transportkontrollen, nach Reduktion und minimaler logarithmischer Keimreduktion, sortiert nach Labor bzw. Prüfstelle, dargestellt. Betrachtet man diese Auswertungen aus den Transportkontrollen der sortierten Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen mit denen der nach Reduktion und minimaler Keimreduktion ermittelten, so differieren die Werte der minimalen logarithmischen Keimreduktion zur mittleren logarithmischen Keimreduktion doch erheblich (vgl. Abbildung 63 bis Abbildung 65).

5.2.3 Diskussion zum Keimreduktionstest

Nachstehende Fehlerquellen mit einer Vielzahl von einfließenden Parametern und Rahmenbedingungen existieren demnach und beeinflussen die Aussagefähigkeit von Keimreduktionstests:

- Unklarheit bez. der D-Werte der eingesetzten Sporensuspensionen für Peressigsäure bzw. Wasserstoffperoxid

- Prüfung bzw. Ermittlung der Haltbarkeiten und Reinheiten der Sporensuspensionen
- Homogenität der Sporensuspension
- Beimpfung bzw. Auftragsmodalitäten
- Ausgangskeimzahl für den Keimreduktionstest
- Gleitmittelzusätze in den Extrudern bei der Verschlussproduktion
- Geometrische Form der Flaschen
- Bestimmungsmethodik der Ausgangskeimzahl
- Vitalität der Sporensuspensionen beim Test
- Transportkontrollen
- Benetzungsproblematik von PET-Flaschen
- Einsatzmedium beim Flaschendurchlauf (Ringerlösung, Sterilwasser)
- Abweichungen von der Solleinstellung der Abfüllanlagen (Konzentration, Temperatur, Nennleistung)
- Anzahl der überprüften Positionen zur Desinfektion und Sterilisation
- Quantitative Überführung der Hilfsmedien zur Probenverarbeitung
- Mikrobiologische Probenverarbeitung und Keimzahlbestimmung
- Berechnungsmodalitäten zur mittleren logarithmischen Keimreduktion (MLK)

Als Schlussfolgerung aus den ermittelten Ergebnissen werden daher folgende Aussagen getroffen:

- Es muss logischerweise mindestens eine komplette Füllerrunde mit allen Stellen untersucht werden, da man ansonsten Teile der Anlage nicht mit überprüft. Hier nützt auch der Mittelwert aus den überprüften Stellen nichts bzw. die Aussage ist fragwürdig.
- Die im VDMA-Merkblatt Nr. 6 auf Seite 11 durchgeführte Berechnung ist zwar richtig, da hier erst der Mittelwert aus den gefundenen Keimzahlen gebildet und dieser dann logarithmiert wird [116]. Es wird jedoch mit dieser Berechnungsart nicht auf jede einzelne Sterilisations- bzw. Desinfektionseinheit eingegangen. Die Mittelwerte werden als arithmetische Werte genommen. Dies ist richtig, da es sich hier um poissonverteilte Werte handelt und eigentlich das geometrische Mittel zu verwenden ist.
- Laut diesem Merkblatt geht die Wiederfindungsrate in die Berechnung der Keimreduktion ein. Die Wiederfindungsrate errechnet sich aus der Ausgangskonzentration (Inokulation der Verschlüsse oder Flaschen) und dem Ergebnis der Transportkontrollen. Hier geht also der evtl. Fehler beim Bestimmen der Keimzahlen mehrfach in die Berechnung ein. (Einmal bei den

Transportkontrollen und dann bei der Keimzahlbestimmung der behandelten Proben). Die Formel muss daher korrigiert werden.

- Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den einzelnen Versuchsreihen der Grundtabelle bringt keine weiteren Erkenntnisse, da die Proben an sich nichts miteinander zu tun haben und von jeder Probe nur 1 Messreihe vorliegt.
- Die Abweichungen zwischen der niedrigsten wiedergefundenen Keimvorbelastung aus den Transportkontrollen und dem höchsten ermittelten Wert aus den desinfizierten Flaschen liegen zwischen Null und 100 %.
- Fehlfunktionen bei der Keimreduktion lassen sich durch die Berechnung der mittleren logarithmischen Keimreduktion nicht erkennen.

Somit wird folgende Forderung aufgestellt: Die Inokulation der Proben und die Keimzahlbestimmungen (sowohl der Transportkontrollen als auch der behandelten Proben) müssen standardisiert sein, um Vergleiche ziehen zu können. Daher muss auch jede Behandlungsstelle bzw. Sterilisationsposition eines untersuchten Aggregats für sich untersucht (logarithmische Keimreduktion) werden. Aus dem berechneten Mittelwert dieser Einzelbestimmungen pro Position kann dann erst auf die Effizienz des Aggregates verwiesen werden. Um ein abgesichertes Akzeptanzkriterium [160] zu erhalten, sollten bei Desinfektions-, Rinser- und Sterilisationspositionen und einem Vertrauensbereich von 99,9 % mind. 69 Einzeluntersuchungen durchgeführt werden (vgl. Anhang 8.2). Da dies in der Praxis nicht durchführbar ist, sollte und muss bei den derzeit in den Verträgen bzw. in der Praxis vereinbarten mittleren logarithmischen Keimreduktionen (MLK), die mit $\log > 4,0$ bei UltraClean-Anlagen und von $\log > 5,0$ bei Aseptikanlagen definiert sind, eine Varianz von mind. $\pm \log 0,5$ toleriert werden [129]. Um den Praxisbedingungen gerecht zu werden, ist des Weiteren darauf zu achten, dass alle Keimreduktionstests vor Ort unter den wirklichen Betriebsbedingungen durchgeführt werden bzw. bei identischer Nennleistung, Parametrierung und Verfahrenstechnik.

5.3. Methoden zur Beurteilung der mikrobiologischen Verfahrenstechnik

5.3.1 Endpointtest zur Desinfektions- u. Sterilisationseffizienz im Reinraum

Der VDMA hat in einer Fachverbandsvorschrift einen Endpointtest zur Desinfektions- und Sterilisationseffizienz im Bereich Isolator bzw. Reinraum empfohlen [5]. Für die Praxis ist dieser Test jedoch sehr umständlich und nicht für die Überprüfung kompletter Reinigungsprogramme auf alkalischer Basis geeignet, da die empfohlenen Aluminiumfolien teilweise angelöst werden und Knallgas entstehen würde. Die Lösung der vorhandenen Problematik wurde in der Weiterentwicklung dieser Überprüfungsmethodik gefunden. Für die Praxis wurde daher ein funktionaler Test zur Ermittlung der

Abtötungseffizienz bei der Reinigung und Desinfektion sowie der Sterilisation von Maschinenoberflächen bzw. Isolator- und Reinraumbereichen als "Endpointtest" entwickelt.

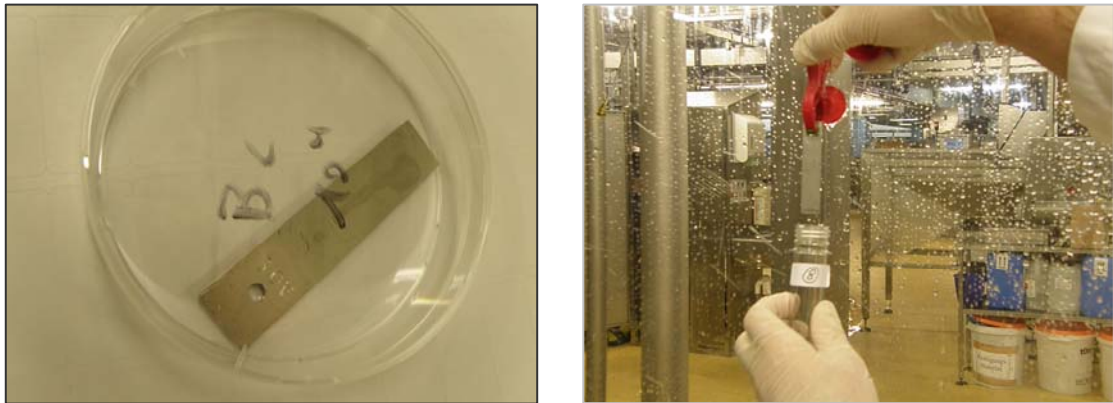


Abbildung 66: Transportbehältnisse zum Endpointtest im Reinraum / Isolator

Statt der in der VDMA-Methode (Sterilisationsüberwachung) vorgesehenen, mit drei Zehnerpotenzen inokulierten und mit Klebeband versehenen Aluminiumstreifen wird bei der neu entwickelten Methode mit an Saugnäpfen befestigten Edelstahlplättchen, jeweils nur mit einer definierten Zehnerpotenz beimpft, gearbeitet.



Abbildung 67: Befestigungsvarianten zum Endpointtest im Reinraum / Isolator

Die mikrobiologischen Untersuchungen belegen die Praktikabilität dieser modifizierten Untersuchungsmethode zur Überprüfung der Reinigungs- und Rehygienisierungseffizienz des Reinraums bzw. Isolators mittels inokulierter Edelstahl-Teststreifen. Die punktförmig mit unterschiedlichen Keimdichten inokulierten Teststreifen weisen an den festgelegten Positionen im Reinraum nach der Desinfektionsphase mit Peressigsäure (15 min / 25 °C / 1.200 ppm) bei beiden Materialien ähnliche Keimreduktionen auf (vgl. Tabelle 30 u. Tabelle 31).

Tabelle 30: Endpointtest – Mikrobiologische Überprüfung der inokulierten Aluminiumstreifen

Analyse Nr. P 09/00776 / Institut f. Lebensmittelhygiene Stroh					
Keimzahlbestimmung der inokulierten Aluminium-Teststreifen					Betrieb F
Probenverarbeitung vom 05.10.2009					
Nr.	Ausgangskkeimzahl	Verkeimung 10 ³ 1,2 x10 ³	Verkeimung 10 ⁴ 1,4 x10 ⁴	Verkeimung 10 ⁵ 2,2 x10 ⁵	
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 4181 in Glucose-Pepton-Lösung					Keimreduktion
01	Wand, links (90°)	nein	nein	nein	> 10 ⁵
02	Decke, links (abgefallen)	nein	nein	nein	> 10 ⁵
03	Roof-Table, links (umgefallen)	nein	nein	nein	> 10 ⁵
04	Roof-Table, links (umgefallen)	nein	nein	nein	> 10 ⁵
05	Fensterscheibe (90°)	-	-	-	-
06	Auslaufstern Verschließer (180°)	nein	nein	nein	> 10 ⁵
07	Roof-Table, rechts	nein	nein	ja	> 10 ⁴
08	Fensterscheibe (90°)	nein	ja	ja	> 10 ⁴
09	Auslaufband (90°)	ja	ja	ja	
10	Fensterscheibe (90°)	ja	ja	ja	
Prüfung der in der Anlage desinfizierten Aluminium-Teststreifen (Fa. Bioteccon):					
Überführen der einzelnen Abschnitte in Glucose-Pepton-Lösung, Ablösen der Keime durch Vortexen. Bebrütung: 3 bis 5 Tage bei 30°C, Ausstrich auf Caso-Agar zur Überprüfung der gefundenen Keime, Mikroskopie					

Tabelle 31: Endpointtest – Mikrobiologische Überprüfung der inokulierten Edelstahlstreifen

Analyse Nr. P 09/00777 / Institut f. Lebensmittelhygiene Stroh					
Keimzahlbestimmung der inokulierten Edelstahl-Teststreifen					Betrieb F
Probenverarbeitung vom 05.10.2009					
Nr.	Ausgangskkeimzahl		Verkeimung 10 ⁶ 2,4 x10 ⁶		
<i>Bacillus subtilis</i> (DSM 4181) in Glucose-Pepton-Lösung					Keimreduktion
01	Wand, links (90°)		nein		> 10 ⁶
02	Decke, links		nein		> 10 ⁶
03	Roof-Table, links		nein		> 10 ⁶
04	Roof-Table, links		nein		> 10 ⁶
05	Fensterscheibe (90°)		nein		> 10 ⁶
06	Auslaufstern Verschließer (180°)		ja		> 10 ⁶
07	Roof-Table, rechts		ja		> 10 ⁶
08	Fensterscheibe (90°)		nein		> 10 ⁶
09	Auslaufband (90°)		nein		> 10 ⁶
10	Fensterscheibe (90°)		nein		> 10 ⁶
Prüfung der in der Anlage desinfizierten Edelstahl-Teststreifen (Fa. Bioteccon):					
Überführen der einzelnen Abschnitte in Glucose-Pepton-Lösung, Ablösen der Keime durch Vortexen. Bebrütung: 3 bis 5 Tage bei 30°C, Ausstrich auf Caso-Agar zur Überprüfung der gefundenen Keime, Mikroskopie					

Somit ist im Gegensatz zur VDMA-Methode das Handling und die Probenverarbeitung vereinfacht sowie der Anwendungsbereich auf alkalische und saure Medien bzw. auch Desinfektionsmittel ausgedehnt worden. Selbst Temperaturbereiche mit Laugen von 2,0 % und 60 °C können nun in ihrer Abtötungseffizienz überprüft werden. Dies war bisher nach der VDMA-Methode in dieser Form nicht möglich.

An Vorteilen der neu entwickelten Methode sind zu nennen:

- Möglichkeit der Überprüfung von alkalischen Medien
- Möglichkeit zur Überprüfung von heißen Reinigungsmedien
- Nur eine Zehnerpotenz statt drei Inokulationen auf dem Teststreifen
- Transparente Preforms als Transport- und Bebrütungsbehälter (Nähr-Bouillon)
- Probevorbereitung und Probeverarbeitung vereinfacht
- Saugnapfklammern statt Klebeband (Heiße Medien)
- Transportmedium Preforms statt Petrischalen
- Unabhängigkeit von Suspensionslieferanten, da individuelle Auftragung möglich
- Variabilität im Teststamm und der Keimdichte gegeben
- Verwendung von definierten Plättchen aus Edelstahl statt Aluminium

5.3.2 Retentionstest / Spritzschattentest

Da spezifische Keime wie *Pichia anomala*, *Saccharomyces diastaticus* und *Alicyclobacillus acidoterrestris* gefunden wurden und möglicherweise über die Anlage eingetragen werden, wurde ein spezielles Testmedium zur Durchführung des Spritzschattentests entwickelt (vgl. Tabelle 4).

Biofilme bzw. nicht abgereinigtes organisches Material lassen sich mittels Abstrichproben (Swaps) und geeigneter Nährmedien sowie mit der ATP-Messmethode nachweisen [25, 161]. Um die Effizienz des installierten Innenraumreinigungssystems auch "just-in-time" visuell überprüfen zu können, wird daher neben den mikrobiologischen Abstrichproben seit einigen Jahren bei Inbetriebnahmen, Abnahmen und Revalidierungen ein klassischer Retentions- bzw. Spritzschattentest durchgeführt. Die Zusammensetzung der aufgetragenen Medien wurde seit ihrer ersten Anwendung 2002 von OLIVER-DAUMEN sowie diversen Herstellerfirmen für Aseptikanlagen stets weiterentwickelt [137, 162].

Es besteht jedoch beim Einsatz von Kieselgur die Problematik der Schädigung der rotierenden Maschinenbauteile durch Abrasion sowie stets die Problematik des Nährstoffeintrages und damit ein potentiell mikrobiologisches Risiko. Bei nicht einwandfrei funktionierenden Reinigungssystemen bedeutet dies ein beschleunigtes bzw.

induziertes Wachstum von Mikroorganismen, d.h. ein Reinfektionspotential über das aufgebrauchte Testmedium. Aus diesem Grunde wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neues Testmedium entwickelt. Diese 70 vol.-% alkoholische Testlösung kann nicht von getränkeschädlichen Mikroorganismen verwertet werden.

Das neu entwickelte Medium besteht aus den lebensmittelrechtlich zugelassenen Komponenten:

- Hydroxypropylzellulose (HPC)
- Azorubin (Carmoisin) E 122
- Alkohol 96% vergällt
- Destilliertes Wasser

Die durchgeführten Untersuchungen belegen die mikrobiologische Immunität dieser neu entwickelten Lösung. Hierbei wurden die Vorzuchten der ausgesuchten Teststämme, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus brevis*, *Aspergillus niger* und *Bacillus subtilis* in das neuentwickelte Retentionstestmedium eingepflegt und über mehrere Tage bebrütet. Die Ergebnisse belegen, dass in diesem Medium ein Wachstum dieser typischen Getränkeschädlinge ausgeschlossen werden kann. Lediglich die Hefe *Pichia anomala* könnte den auf 2,0 % verdünnten Ethanol verstoffwechseln (vgl. Tabelle 33 bis Tabelle 35). Die Testlösung wird mittels einer handelsüblichen Gartenspritze auf die Maschinenoberflächen aufgebracht und ca. 5 – 10 Minuten aufzutrocknen gelassen.



Abbildung 68: Aufbringung des Mediums zum Retentionstest

Ein weiterer Vorteil dieser Lösung liegt in der hohen Oberflächenhaftung bei gleichzeitiger leichter Abspülbarkeit durch die Prozessmedien bei der äußeren Reinigung, Desinfektion und Sterilisation, unabhängig davon, ob Haftschaum, Haftgele oder CIP-Medien eingesetzt werden. Die Viskosität liegt im Bereich der üblichen Getränkearten.

Tabelle 32: Vergleichsuntersuchungen der RET-Lösung zur Zuckerlösung

Datum:	30.03.2009			AL 184/185
Probe A:	Basis Zucker, Kirschsirup			AL184
Probe B:	Basis Zellulose, Alkohol und Azofarbstoff			AL185
Journal Nr.:			184	185
	Dichte 20/4	[g/cm ³]	1,24806	0,91053
	Extrakt	[Gew. %]	53,1	-
	Alkohol	[Vol. %]	-	59,4
	Oberflächenspannung (Ring)	[mN/m]	66	33
	Viskosität Verdünnung 1:10 (H ₂ O)	[mPas]	1,72	
)	Viskosität Verdünnung 1:10 (ETOH)	[mPas]		2,49
	Farbe	[EBC]	90	1.400

Die Farbtiefe ist bewusst relativ hoch eingestellt, um die Interpretation auf Spritzschatten und auch Hinweise auf nicht hygienegerechte Konstruktionen, das sog. "Nachbluten" definieren zu können (vgl. Tabelle 32). Danach kann die Überprüfung der Reinigung und Desinfektion erfolgen, indem die entsprechenden Reinigungs- bzw. Desinfektions-Programme gestartet werden.

Gleiches gilt sinngemäß zur Überprüfung bei installierten Schwallern zur Entfernung von Produktresten in klassischen Abfüllanlagen für Bier und Biermischgetränke. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, werden die Rehygienisierungs-Programme zweimal durchgeführt, so dass die Aussagen über potentielle Spritzschatten und Schwachstellen im hygienischen Maschinendesign eindeutig sind.

Hinsichtlich der mikrobiologischen Inertheit gegenüber Getränkeschädlingen, wurde das neu entwickelte Retentionstestmedium mit ausgesuchten Teststämmen beimpft, bebrütet und nach einem sowie vier Tagen ausgewertet.

Die Untersuchungsergebnisse belegen, dass die Inhaltsstoffe des für den Spritzschattentest entwickelten Retentionstestmediums von ausgesuchten und praxisbezogenen Mikroorganismen aus dem Bereich der Brauereien und der Getränkeindustrie nicht verstoffwechselt werden können (vgl. Tabelle 33 bis Tabelle 35)

Tabelle 33: Prüfung einer 2,0 %-igen Retentionstest-Lösung auf mikrobiologische Inertheit 1

P 09/00167			Datum:	01.10.2008	
I. Sterilitätsprüfung einer 2%igen wässrigen RET-Lösung					
Medium	Angaben zur Probe	Medium	Ergebnis		
			KBE/g		
P 09/00167-0	2 %ige wässrige RET-Lösung	YGC-Agar	< 10 ¹		
		MRS-Agar	< 10 ¹		
		PC-Agar	< 10 ¹		
II. Prüfung der Ausgangskeimzahl der verwendeten Keimsuspensionen					
Medium	Angaben zur Probe	Medium	Ergebnis		
			KBE/g		
P 09/00167-A	<i>Pichia anomala</i>	YGC-Agar	1,2 x 10 ⁵		
P 09/00167-B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YGC-Agar	2,3 x 10 ⁵		
P 09/00167-C	<i>Lactobacillus brevis</i>	MRS-Agar	1,7 x 10 ⁶		
P 09/00167-E	<i>Aspergillus niger</i>	YGC-Agar	5,0 x 10 ⁴		
P 09/00167-F	<i>Bacillus subtilis</i>	PC-Agar	1,3 x 10 ⁵		
III. Beimpfung der 2,0 %igen RET-Lösung und Bebrütung 3 - 5 Tage					
Medium	Angaben zur Probe	Medium	Tag 0	Tag 1	Tag 4
			KBE/g		
P 09/00167-A	<i>Pichia anomala</i>	YGC-Agar	1,8 x 10 ³	4,9 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁶
			deutliche Zunahme der Keimzahlen		
P 09/00167-B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YGC-Agar	1,5 x 10 ³	1,5 x 10 ³	3,1 x 10 ³
			keine signifikante Änderung der Keimzahlen		
P 09/00167-C	<i>Lactobacillus brevis</i>	MRS-Agar	1,0 x 10 ⁴	7,6 x 10 ³	< 10 ¹
			deutliche Abnahme der Keimzahlen		
P 09/00167-E	<i>Aspergillus niger</i>	YGC-Agar	3,0 x 10 ²	4,0 x 10 ²	1,9 x 10 ²
			eine signifikante Änderung der Keimzahlen		
P 09/00167-F	<i>Bacillus subtilis</i>	PC-Agar	8,0 x 10 ³	< 10 ¹	< 10 ¹
			deutliche Abnahme der Keimzahlen		

Tabelle 34: Prüfung einer 2,0 %-igen Retentionstest-Lösung auf mikrobiologische Inertheit 2

P 08/00650					
Datum:	26.02.2009				
I. Sterilitätsprüfung einer 2%igen wässrigen RET-Lösung					
Medium	Angaben zur Probe	Medium		Ergebnis	
				KBE/g	
P 08/00650-0	2%ige wässrige RET-Lösung	YGC-Agar		< 10 ¹	
		MRS-Agar		< 10 ¹	
		PC-Agar		< 10 ¹	
II. Prüfung der Ausgangskeimzahl der verwendeten Keimsuspensionen					
Medium	Angaben zur Probe	Medium		Ergebnis	
				KBE/g	
P 08/00650-A	<i>Pichia anomala</i>	YGC-Agar		8,6 x 10 ⁶	
P 08/00650-B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YGC-Agar		8,3 X10 ⁶	
P 08/00650-C	<i>Lactobacillus brevis</i>	MRS-Agar		3,8x10 ⁸	
P 08/00650-D	<i>Aspergillus spec.</i>	YGC-Agar		6,2 x 10 ⁶	
P 08/00650-E	<i>Aspergillus niger</i>	YGC-Agar		4,6 x 10 ⁴	
P 08/00650-F	<i>Bacillus subtilis</i>	PC-Agar		2,0 x 10 ⁷	
III. Beimpfung der 2,0 %igen RET-Lösung und Bebrütung 3 - 5 Tage					
Medium	Angaben zur Probe	Medium		Tag 10	
				KBE/g	
P 08/00650-A	<i>Pichia anomala</i>	YGC-Agar		8,3 x 10 ⁴	
P 08/00650-B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YGC-Agar		5,7 x 10 ³	
P 08/00650-C	<i>Lactobacillus brevis</i>	MRS-Agar		1,4 x 10 ⁶	
P 08/00650-D	<i>Aspergillus spec.</i>	YGC-Agar		4,3 x 10 ⁴	
P 08/00650-E	<i>Aspergillus niger</i>	YGC-Agar		3,5 x 10 ²	
P 08/00650-F	<i>Bacillus subtilis</i>	PC-Agar		1,0 x 10 ⁵	

Tabelle 35: Prüfung einer 2,0 %-igen Retentionstest-Lösung auf mikrobiologische Inertheit 3

P 09/00166					
Datum:	01.10.2008				
I. Sterilitätsprüfung einer 2%igen wässrigen RET-Lösung					
Medium	Angaben zur Probe	Medium	Ergebnis		
P 09/00166-0			KBE/g		
2%ige wässrige RET-Lösung		YGC-Agar	< 10 ¹		
		MRS-Agar	< 10 ¹		
		PC-Agar	< 10 ¹		
Datum:	01.10.2008				
II. Prüfung der Ausgangskeimzahl der verwendeten Keimsuspensionen					
Medium	Angaben zur Probe	Medium	Ergebnis		
			KBE/g		
P 09/00166-A	<i>Pichia anomala</i>	YGC-Agar	8,6 x 10 ⁶		
P 09/00166-B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YGC-Agar	8,3 x 10 ⁶		
P 09/00166-C	<i>Lactobacillus brevis</i>	MRS-Agar	3,8x10 ⁸		
P 09/00166-D	<i>Alicyclob. acidodoterestris</i>	BAT-Agar	6,2 x 10 ⁶		
P 09/00166-E	<i>Aspergillus niger</i>	YGC-Agar	4,6 x 10 ⁴		
P 09/00166-F	<i>Bacillus subtilis</i>	PC-Agar	2,0 x 10 ⁷		
Beimpfung von je 200 ml 1:10 verdünnten Alkohol- RET-Farbstoff-Lösung					
Medium	Angaben zur Probe	Medium	Tag 0	Tag 1	Tag 4
P 09/00166-A	<i>Pichia anomala</i>	YGC-Agar	1,1 x 10 ³	1,7 x 10 ⁵	3,1 x 10 ⁶
deutliche Zunahme der Keimzahlen					
P 09/00166-B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YGC-Agar	1,3 x 10 ³	1,4 x 10 ³	1,8 x 10 ³
keine signifikante Änderung der Keimzahlen					
P 09/00166-C	<i>Lactobacillus brevis</i>	MRS-Agar	6,9 x 10 ³	1,9 x 10 ²	< 10 ¹
deutliche Zunahme der Keimzahlen					
P 09/00166-D	<i>Alicyclob. acidodoterestris</i>	BAT-Agar	5,6 x 10 ²	8,0 x 10 ²	7,3 x 10 ²
keine signifikante Änderung der Keimzahlen					
P 09/00166-E	<i>Aspergillus niger</i>	YGC-Agar	9,0 x 10 ¹	4,0 x 10 ¹	7,1 x 10 ²
geringfügige Zunahme der Keimzahlen					
P 09/00166-F	<i>Bacillus subtilis</i>	PC-Agar	7,3 x 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹
deutliche Abnahme der Keimzahlen					

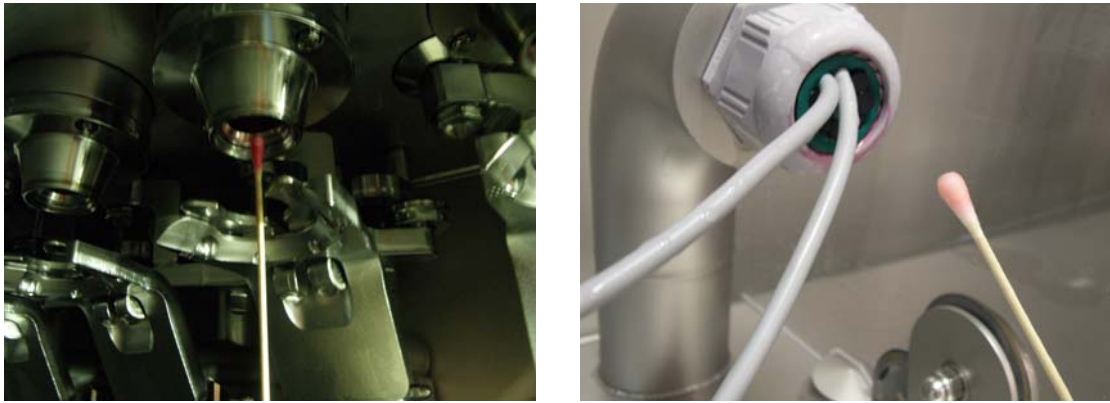


Abbildung 69: Retentionstest auf Spritzschatten

Die Prüfung auf Spritzschatten erfolgt visuell sowie an ausgewählten Stellen mit Swabs und wird fotografisch dokumentiert. Nachlaufendes Testmedium, das sog. "Nachbluten" aus Spalten, Sicken und Maschinenbauteilen, deutet auf nicht hygienegerechte Konstruktionen (QHD) hin, so dass Demontagen zur manuellen Reinigung notwendig werden.

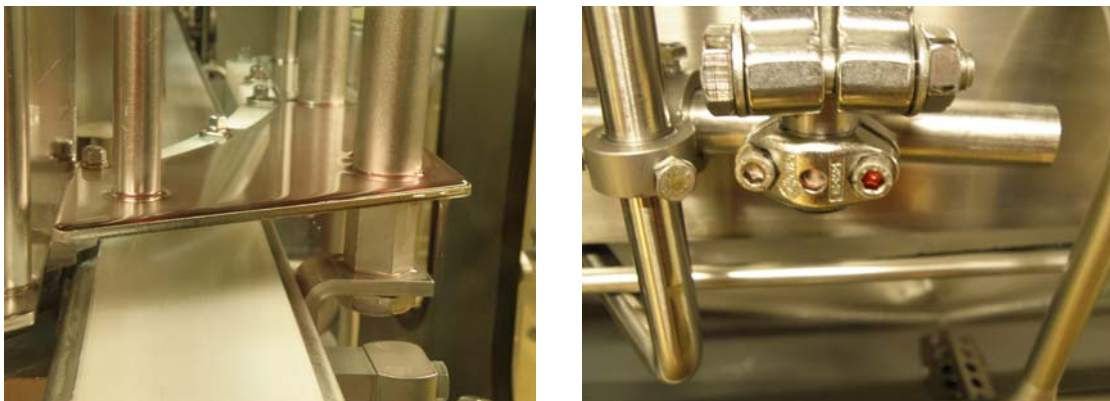












Abbildung 70: Retentionstest auf konstruktive Mängel

Des Weiteren werden bei diesen Retentionstests auch die Programmstruktur, die Schaum- bzw. Dünnschichtqualität sowie die Intensität der Spritzdrücke bewertet. Auch muss eine einwandfreie Abspülung der Maschinenoberflächen und Bauteile sichergestellt sein. Letztere Effizienz wird mittels pH-Teststäbchen überprüft.

Es wird daher empfohlen, die Spritzschattentests künftig mit dem neu entwickelten, nährstofffreien Retentionsmedium auf Basis Hydroxypropylzellulose, Ethanol, Wasser und eines Azofarbstoffs durchzuführen, um potentielle Reinfektionen durch einen Nährsubstrateintrag zu vermeiden sowie Fehlfunktionen im Reinigungsprogramm und hygienische Schwachstellen schnell und einfach zu erkennen (vgl. Tabelle 36).

Tabelle 36: Auswertung Retentionstest

Demonstration der Anwendungstauglichkeit des Retentionstests			
Datum: 11.03.2010		Seite: 1 von 1	
Betreff: Aseptik-Check-Up Anlage 1 (Betrieb L)			
Nr.	wo	Bemerkung	Bild
01	Kabeldurchbruch Verschrauber außen	Am Beispiel ist zu sehen, dass Kabeldurchbrüche undicht werden und deshalb besonderer Aufmerksamkeit bedürfen	
02	Kabeldurchbruch Vortisch - Rinser	Der Kunststoff des Kabeldurchbruchs wird spröde, er behält die rote Farbe auch nach der Reinigung (nicht abwaschbar)	
03	Transferstern Rinser - Füller	Die Halterungen werden ungenügend gereinigt. An den Schrauben, Unterlegscheiben und Langlochbohrungen sind rote Reste zu erkennen (am Swap)	
04	N ₂ -Dropper	Die Steuerluftleitungen sind nicht nach den a.a.R.d.T. eingedichtet (keine offenen Teflon-Eindichtungen im Aseptikbereich!)	
05	N ₂ -Dropper, Flansch, nachbluten	Der Flansch muss besser gereinigt werden, "blutet" nach	
06	Handschuh am Verschrauber	Darauf achten, dass der Handschuh möglichst ohne Falten hängt, ansonsten Reinigungsprobleme	
07	FlaDa-Sonde Auslaufband	Die FlaDa-Sonde gehört offensichtlich noch zur ersten Generation. Das Sichtfenster scheint so rau zu sein, dass es sich rot einfärbt	
08	Verschraubung Auslaufband	An den Unterlegscheiben der Halterungen der Führungsschiene Auslaufband ist Nachbluten zu erkennen. Die Spülung sollte verlängert werden.	
09	Füllventil	Die Zielstrahlreiniger für die Füllventile sind offenbar verstellt, aus den Rückluftbohrungen ist starkes Nachbluten zu erkennen	
10	Sitz der Zielstrahlreiniger	Der Sitz der Zielstrahlreiniger muss überprüft werden	

5.3.3 Außenreinigung (Schaum/Gel/CIP-Medien)

Überprüfung der Außenreinigung auf Spritzschatten

Dieser Test dient dazu, das Düsenlayout der Fülleraußenreinigung auf Spritzschatten zu überprüfen. Es soll dabei gezeigt werden, dass die relevanten Maschinenoberflächen durch das automatische Füllerreinigungssystem erreicht werden.

Dazu wird eine gezielte, definierte nährstofffreie Verschmutzung aufgebracht und nach einer definierten Antrocknungszeit durch die Fülleraußenreinigung abgereinigt. Im Anschluss werden die Oberflächen visuell auf noch anhaftende Verschmutzungspartikel untersucht. Bei Bedarf kann durch Abstriche die visuelle Kontrolle unterstützt werden.

Von Getränkesirup, Molke oder Joghurt zur Durchführung dieses Tests wird abgeraten, da diese auf Grund des hohen Anteils an gelösten Stoffen nicht einer realen Verschmutzung entsprechen und auch Nährstoffe eingebracht werden, die ggf. Probleme bereiten können. Gleiches gilt für die Verwendung von Lösungen mit einer hohen Konzentration an färbenden Substanzen sowie abrasiven Stoffen, wie Kieselgur. Auch der vom VDMA beschriebene Fluoreszenztest nach der Riboflavin-Methode [162] ist für die Praxis ungeeignet, da er nur in abgedunkelten Räumen aussagefähig ist.

Aus diesem Grunde wird das im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelte Retentionsmedium auf Basis Ethanol, Hydroxypropylzellulose und Azofarbstoff (Farblösung ohne Nährstoffeintrag) empfohlen.

Die Interpretation beinhaltet demnach die Aussagen hinsichtlich "echter" Spritzschatten sowie konstruktiver Mängel in Hygienischen Konstruktionen (QHD) bez. das sog. "Nachbluten" aus Sicken und Wellenübergängen.

Tabelle 37: Demonstration - Vergleich ATP-Messungen / Abstrichproben / RET-Medium 1

Ifd. Nr.	Bezeichnung der Probe	Datum	CAF-Anlage AZ (1,5 Liter) / Betrieb "L"			CAF-Anlage 2 (1,5 l Individualflasche)			RET-Test Rosafärbung	0 = kein Befund 1 = 1x Befund
			ATP [RLU]	HBB-AM-B 4 d / 28 °C (aerob)	SSL-B 4 d / 28 °C (aerob)	Caso-Bouillon 4 d / 28 °C (aerob)				
ABSTRICHPROBEN (3 verschiedene Boullions)										
CAF-Anlage AZ (1,5 Liter) / Betrieb "L"										
30.04.2008										
	" Abstrichproben "	>50	>100							
	Injektor									
1	FlaDa / Bereich Zulauf Injektor (hinten)	45	0	0	0	0	0	0	0	
2	FlaDa / Bereich Zulauf Injektor (vorne)	26	0	0	0	0	0	0	0	
3	Auslaufstern 1 / Klammern	25	0	0	0	0	0	0	0	
	Einlaufstern 1 / Klammern		0	0	0	0	0	0	0	
6	Kabeldurchbruch / Vortisch	28	0	0	1	1	1	1	1	
7	Kabeldurchbruch / Oben	36	0	0	0	0	0	0	0	
8	Handschuh Nr. 1 (links) // angefasst; Verprobung jedoch an Unterseite	61	0	0	0	0	0	0	0	
9	Handschuh Nr. 2 (rechts) // angefasst; Verprobung jedoch an Unterseite	38	0	0	0	0	0	0	0	
10	Einlaufstern Weile	91	0	0	0	0	0	0	0	
	Gesamtbelastung Abfüllanlage		0,0%	0,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	
	Rinser									
11	FlaDa hinten / Einlaufstern	230	0	0	1	1	1	1	1	
12	Auslaufstern 1 / Klammern	56	0	0	0	0	0	0	0	
13	FlaDa vorne / Einlaufstern	140	0	0	0	0	0	0	0	
4	Einlaufstern RI / Klammern	240	0	0	0	0	0	0	0	
5	Mittlerer Übergabestern RI -> FU Klammern	21	0	0	0	0	0	0	0	
15	Kabeldurchbruch / Vortisch	20	0	0	0	0	0	0	0	
	Belastung		0,0%	0,0%	16,7%	16,7%	16,7%	16,7%	33,3%	
	Füller									
16	Übergabestern FU -> VS / Säule oben	defekt	0	0	0	0	0	0	0	
17	Einlaufstern FU / Klammern	220	0	0	0	0	0	0	1	
18	FlaDa hinten / Füller Auslauf	40	0	0	0	0	0	0	0	
19	FlaDa vorne / Füller Auslauf	61	0	0	0	0	0	0	0	
20	Kabeldurchbruch / Vortisch	42	0	0	0	0	0	0	0	
21	Übergabestern FU -> VS / Säule mitte	130	0	0	0	0	0	0	0	
22	Teflonbalg (Steuerblock) / Übergabestern FU -< VS	64	0	0	0	0	0	0	0	
23	Füllerkarussell / Ringspalt mit Dichtung	31	0	0	0	0	0	0	0	
24	Faltenbalg	120	0	0	0	0	0	0	0	
25	Heckhafter / Spikes / vor Füllventil	87	0	0	0	0	0	0	0	
26	Füllventil (innen)	970	0	0	1	1	1	1	1	
27	Übergabestern FU -> VS / Klammern	80	0	0	0	0	0	0	0	
28	ELT-Gehäuse Steuerblock / Stern FU -> VS	69	0	0	0	0	0	0	0	
29	Auslaufstern / stationärer Bereich (Speiche)	60	0	0	0	0	0	0	0	
30	Faltenbalg	26	0	0	0	0	0	0	0	
31	Füllventil / obere Platte	22	0	0	0	0	0	0	0	
32	Füllerkarussell / Ringspalt mit Dichtung	220	0	0	0	0	0	0	0	
33	Schlauchlemme (oben) / Faltenbalg		0	0	0	0	0	0	0	
34	Schlauchlemme (unten) / Faltenbalg		0	0	0	0	0	0	0	
35	Schlauchlemme (oben) / Faltenbalg		0	0	0	0	0	0	0	
36	Schlauchlemme (unten) / Faltenbalg		0	0	0	0	0	0	0	
	Belastung		0,0%	0,0%	4,8%	4,8%	4,8%	4,8%	9,5%	

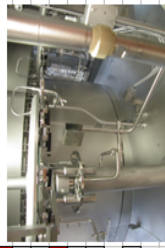


Tabelle 38: Demonstration - Vergleich ATP-Messungen / Abstrichproben / RET-Medium 2

Ifrd. Nr.	Bezeichnung der Probe	Datum	CAF-Anlage 2 (1,5 Liter) / Betrieb "L"				RET-Test Rosafärbung
			ATP [RLU]	NBB-AM-B 4 d / 28 °C (aerob)	SSL-B 4 d / 28 °C (aerob)	Caso-Bouillon 4 d / 28 °C (aerob)	
	ABSTRICHPROBEN (3 verschiedene Bouillions)						
	CAF-Anlage A2 (1,5 Liter) / Betrieb "L"	30.04.2008					
	" Abstrichverproben "	>50	>100			0 = kein Befund 1 = 1x Befund	
	Verschleißer						
99	Handschuh		93	0	0	0	
37	Isolatortür / Revisionsöffnung		29	0	0	0	
38	VS-Element Nr. 09		78	0	0	0	
39	VS-Element Nr. 10		48	0	0	0	
40	VS-Element Nr. 08		310	0	1	1	
41	VS-Element Nr. 13		50	0	0	0	
42	VS-Element Nr. 14		35	0	0	0	
43	VS-Element Nr. 15		37	0	0	0	
64	VS untere Rollenbahn / Lager		49	0	0	0	
45	VS-Auslaufstern / Innenbereich		91	0	0	0	
46	Auslaufstern / Teflon-Formateil zum Auslaufband		230	0	0	0	
42	Isolator - Türdichtung		32	0	0	0	
47	Abgabestern VS -> Auslaufband / rotierender Bereich (Gewindestück)		29	0	0	0	
44	Isolator: Handschuh		130	0	0	0	
48	VS-Element / Halterung		33	0	0	0	
49	Formatschielenen - Unterseite (mitte)		31	0	0	0	
50	VS / Verschlebung (grün) / unterer Bereich		40	0	0	0	
51	VS / Mittelsäule / obere Abdeckung		31	0	0	0	
52	Schlauchkupplung (grün) / oben		16	0	0	0	
53	Formatschiene (unten)		11	0	0	0	
54	Formatschielenen - Unterseite (unten)		67	0	0	0	
	Belastung		0,0%	0,0%	0,0%	4,8%	
	5,0%					5,0%	
	Auslaufband						
57	Kettenführung oben (Band grün)		41	0,0%	0,0%	0,4%	
58	VA-Halter Auslaufband (Kausch)		38	0	0	0	
59	Flada hinten / Bohrungen		30	0	0	0	
60	Flada hinten		34	0	0	0	
61	Auslaufband Führungsgeländer Tropfen		33	0	0	0	
62	Auslaufband Führungsgeländer		52	0	0	1	
63	Auslaufband Führungsgeländer hinten		40	0	0	0	
44	Umtenkrolle Auslaufband		30	0	0	0	
	Belastung		0,0%	0,0%	0,0%	12,5%	
	Verschleißerköpfe (demontriert)						
70	VS-Nr. 11 - Innenraum Verschlusspindel (unten)		42	0	0	0	
71	VS-Nr. 11 - Nullprobe		40	0	0	0	
72	VS-Nr. 11 - Tefloneinsatz		37	0	0	0	
73	VS-Nr. 11 - Rkt O-Ring		34	0	0	0	
74	VS-Nr. 11 - Innenraum Lagergehäuse (unten)		74	0	0	0	
75	VS-Nr. 11 - Innenraum Lagergehäuse (oben)		fehlt	0	0	0	
76	VS-Nr. 11 - Lagergehäuse Außenkäfig (von unten)		32	0	0	0	
77	VS-Nr. 11 - Lagergehäuse Außenkäfig (von oben)		33	0	0	0	
78	VS-Nr. 11 - Kopf vom Lagergehäuse oben (Antriebsritzel)		27	0	0	1	
79	VS-Nr. 11 - Innenrand von unten		38	0	0	0	
	Belastung		0,0%	0,0%	0,0%	11,1%	



ATP-Test

Der ATP-Test dient dem Nachweis von organischen Verschmutzungen. Von der Aufbringung einer gezielten in der Praxis üblichen Verschmutzung, wie Säfte mit Fruchtzellen oder Milch, wird abgeraten, da hier durch den Nährstoffeintrag wiederum ein Reinfektionspotential aufgebaut wird. Eine mikrobiologisch relevante Aussage und Korrelation besteht nicht, wie aus der Literatur zu ersehene Untersuchungsergebnisse belegen [24, 163]. Insbesondere ist die ATP-Methode mit Fehlern behaftet, da sie nicht zwischen lebenden Mikroorganismen und totem organischem Material differenziert. Der ATP-Test gibt daher nicht zwingend einen Aufschluss über die mikrobiologische Situation. Die Aussage, dass bei einer gemessenen Emission von ≤ 100 RLU die Fläche, von der diese Probe mittels Abstrichtupfer genommen wurde, als gereinigt anzusehen ist, kann so nicht bestätigt werden. Die ATP-Messung ist demnach zur Beurteilung des Hygienestatus und zur Vermeidung von Sekundärinfektionen ungeeignet, da falsch positive Ergebnisse erzielt werden und insbesondere auch Getränkeschädlinge nicht erfasst werden [24]. Dies belegen auch die durchgeführten Vergleichsmessungen zur Aussagefähigkeit der ATP-Methode zu den mikrobiologischen Abstrichproben (vgl. Tabelle 37 u. Tabelle 38).

Vielmehr sollte daher ein Retentionstest mit dem beschriebenen neu entwickelten Medium zur Erfassung von Spritzschatten und Mängeln im hygienischen Design der Maschinenoberflächen durchgeführt werden. In Ergänzung dazu sollten mikrobiologische Abstrichproben vorgenommen werden, vorzugsweise bei Produktionsende, nach 48 bis ≥ 72 h Abfüllung, vor dem durchzuführenden Reinigungsintervall des Maschineninnenraums (Isolator / Reinraum). Damit werden sowohl die Rehygienisierungseffizienz der Zwischendesinfektionen wie auch potentielle Spritzschatten bzw. ein Biofilmaufbau erfasst.

5.4. Qualified Hygienic Design / Demonstration der Eignung des RET-Mediums

Schwachstellen und konstruktive Mängel im hygienischen Design (QHD) wurden an UltraClean- und aseptischen Abfüllanlagen im Rahmen dieser Arbeit mehrfach durch den neu entwickelten Spritzschattentest mit dem ebenfalls neu entwickelten Spezialmedium bei den durchgeführten Untersuchungen und Abnahmen vor Ort festgestellt.

Die Brisanz dieser mikrobiologischen Schwachstellen liegt eindeutig im Risiko der potentiellen Reinfektion im Bereich der Maschinenoberflächen durch einen Biofilmaufbau bzw. Nischen für ein Anwachsen von potentiellen Getränkeschädlingen. Die im Rahmen dieser Arbeit bemängelten Maschinenbauteile und die daraus resultierenden Anregungen

bzw. Vorschläge wurden seitens der Maschinenhersteller aufgenommen und konstruktiv in ein hygienisches Design umgesetzt [24, 49].

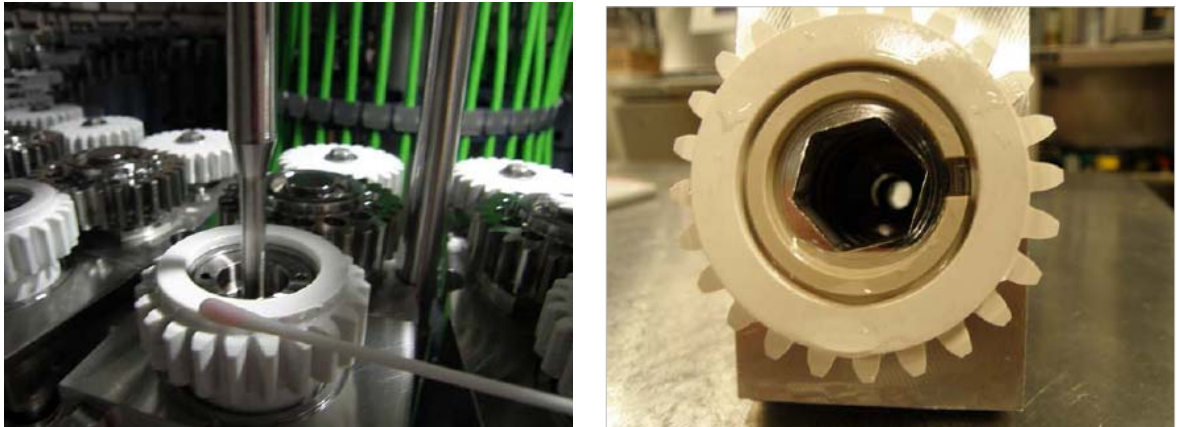


Abbildung 71: Verschleißerelemente / alte und neue Konstruktion

Bei den ursprünglichen Verschleißerelementen eines Herstellers konnte die Sanitation im oberen Bereich nicht sicher gestellt werden. Erst mit der Neukonstruktion, mit der freien Durchspülung, konnte eine einwandfreie Rehygienisierung erreicht werden.

Problematisch waren ebenfalls die Flaschenerkennungssonden, sog. FLADA-Sonden, die der Flaschenerkennung dienen und für die Steuerung unabdingbar sind. Die ursprüngliche Version bestand aus der eigentlichen Sonde und einem U-förmigen Schutzblech. Da diese Konstruktion nicht dem hygienischen Design entsprach, wurden auch immer wieder mikrobiologische Befunde festgestellt. Auch im Spritzschattentest ließ sich diese Problemstelle sehr gut erkennen. Die vom Verfasser dieser Arbeit nachgewiesene Problematik wurde vom Maschinenbauer erkannt und eine alternative Konstruktion, der EHEDG gerecht, eingesetzt. Mit dieser Lösung konnten diese Schwachstellen eliminiert werden.

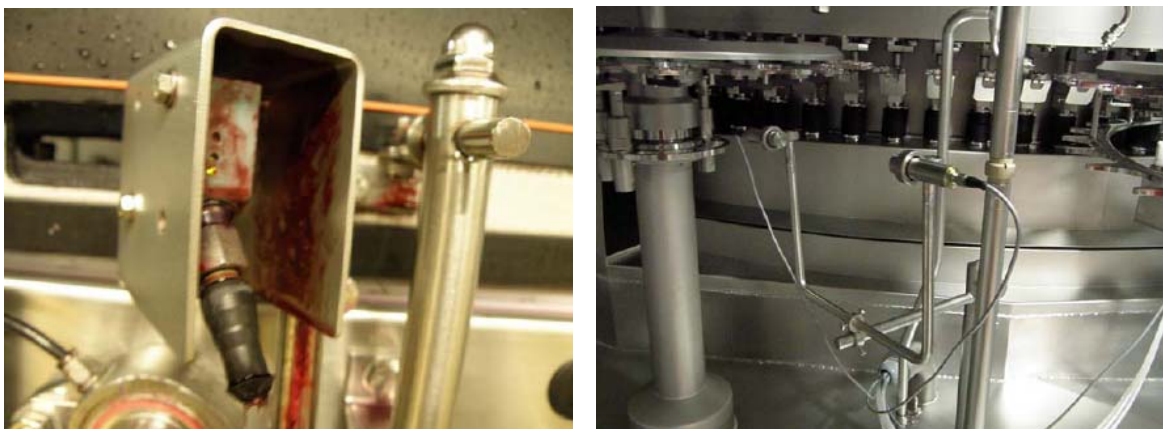


Abbildung 72: Flaschenerkennungssonden / alte und neue Konstruktion



Abbildung 73: Spritzschatten im Bereich der Füllventile / Lösung Zielstrahlreiner

Im unteren Bereich der Füllventile, dort wo das Produkt auftritt, waren keine gezielt positionierte Spritzdüsen eingebaut, so dass an dieser mikrobiologisch sensiblen Stelle keine Reinigungs- und Desinfektionsmedien aufgetragen werden konnten.

Die Forderung bestand daher, nachträglich Zielstrahldüsen einzubauen, um diese mikrobiologische Schwachstelle zu eliminieren.

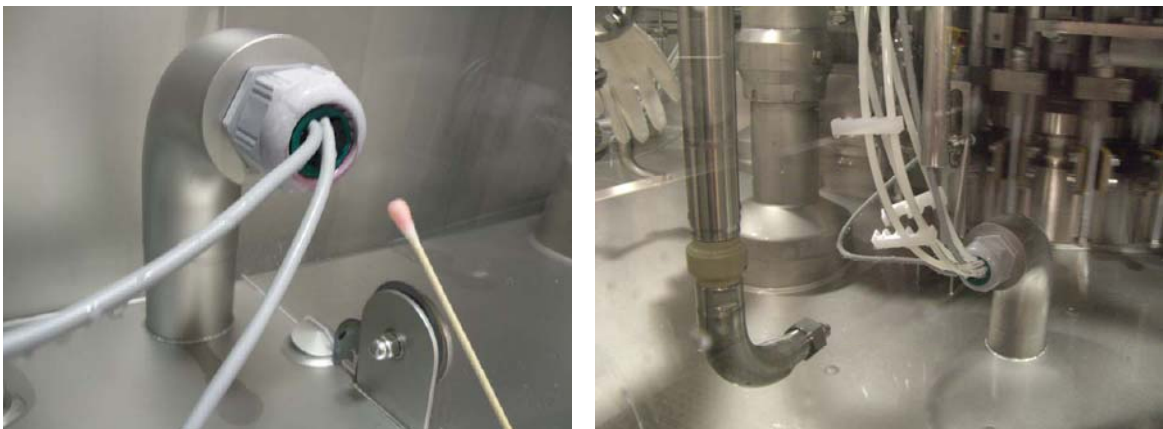


Abbildung 74: Spritzschatten an den Kabeldurchbrüchen / Lösung Zielstrahl

Ähnliche mikrobiologische Problemstellen sind die Kabeldurchbrüche im Bereich des Isolators. Auch hier konnte durch Zielstrahldüsen sowie eine Auffächerung der Kabel die Reinigung und Desinfektion sicher gestellt werden. Auch falsch konzipierte Sprühkugeln, die partiell zugeschweißt waren, können nicht akzeptiert werden. Als Lösung zur bestehenden reinigungstechnischen Problematik wurden daher Rotationsdüsenstöcke eingesetzt.

Prinzipiell gilt, dass an rotierenden Maschinenbauteilen stationäre Düsen und an Feststehenden rotierende Düsen eingebaut werden sollen. Nicht verschweißte Bleche, die im Isolatorbereich verschraubt bzw. genietet sind, können nicht akzeptiert werden.

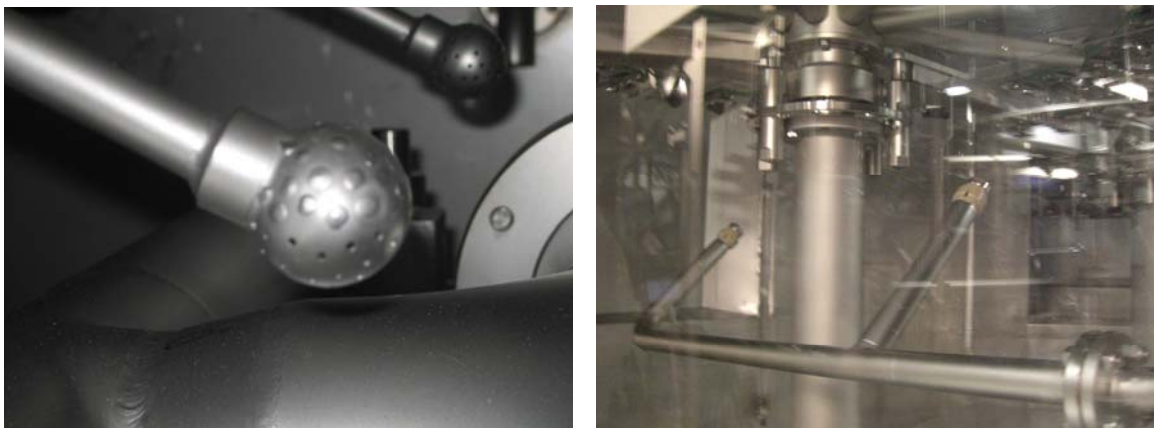


Abbildung 75: Spritzkugeln verschweißst (Mangel) / Düsen rotierend (QHD)

Gleiches gilt sinngemäß für inkorrekt ausgeführte Revisionsöffnungen, wenn die Dichtungen nicht aufvulkanisiert sind.



Abbildung 76: Mangelndes Hygienische Design im Bereich Füllventile

6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Den in der Praxis der Getränkeabfüllung, insbesondere bei UltraClean- und aseptischen Abfüllanlagen, immer wieder auftretenden mikrobiologischen Problemen wurde in Fallstudien aus technischer und mikrobiologischer Sicht nachgegangen. Vor dem Hintergrund der rasch zunehmenden Vielfalt an mikrobiologisch anspruchsvollen Getränkesorten wurde die Hitzeresistenz potentieller Getränkeschädlinge in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand und vom Erhitzungsmedium untersucht mit dem Ziel, die dabei gewonnenen Erkenntnisse auf die Praxis der modernen Abfülltechnik zu übertragen.

Um die thermische Inaktivierung ausgewählter, Getränke schädigender Mikroorganismen darzustellen, ist erstmalig deren Hitzeresistenz aus zwei dezimalen Reduktionszeiten (D-Wert) in Form des z-Wertes ermittelt worden. Die Untersuchungen fanden in der jeweils hitzeresistentesten Zustandsform, z.B. als Sporensuspension, statt und bestätigten die erwarteten unterschiedlichen Reaktionen auf die thermische Einwirkung in den getesteten flüssigen Medien. Auch konnte erstmals die spontane Sporulation von *Pichia anomala* unter den Stressfaktoren Teein und Dehydratisierung, mit der einhergehenden erhöhten Hitzeresistenz, nachgewiesen werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde eine Matrix entwickelt, in welcher die speziell erforderlichen Pasteurisationseinheiten in Abhängigkeit der gewünschten Keimreduzierung und der Hitzeresistenz der einzelnen Mikroorganismen aufgeführt sind. Damit wurde eine Parametrierhilfe für Kurzzeiterhitzungs-Anlagen erarbeitet.

Des Weiteren wurde für aseptische Abfüllanlagen ein für den Praxiseinsatz geeigneter Test zur Ermittlung der Abtötungseffizienz bei der Reinigung und Desinfektion sowie der Sterilisation in Form eines "Endpointtests" entwickelt.

Ein weiteres Modul für die Optimierung der Produktsicherheit bei UltraClean- und kaltseptischen Abfüllanlagen stellt ein im Zuge dieser Arbeit entwickeltes, nährstoffreies Retentionstestmedium für Spritzschattentests als Effizienznachweis der Oberflächenreinigung dar. Im Gegensatz zu bisher üblichen Medien wird hierdurch kein Wachstum von Mikroorganismen induziert und auch kein abrasives Produkt in die Anlagen eingebracht.

Um die innere und äußere Anlagenhygiene sicher zu stellen, wurden ein Hygienekonzept sowie ein Probenahmeplan für aseptische PET-Getränkeabfüllanlagen ausgearbeitet. Bei

Untersuchungen und Abnahmen vor Ort wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrfach Schwachstellen und konstruktive Mängel im hygienischen Design (QHD) an UltraClean- und kaltseptischen Abfüllanlagen festgestellt und dokumentiert. Die Brisanz dieser mikrobiologischen Schwachstellen liegt im Risiko einer potentiellen Reinfektion im Bereich der Maschinenoberflächen durch einen Biofilmaufbau bzw. Keimnischen für Getränkeschädlinge.

Für die Praxis wurden aus den wissenschaftlich erworbenen Erkenntnissen Kriterien für die Überprüfung von Abfüllanlagen und deren Peripherie erarbeitet. In Form von Checklisten wurde damit eine Grundlage erstellt, die den Betreibern eine effiziente Kontrolle der Prozessabläufe ermöglicht, um somit bei Validierungen und Abnahmen die aseptischen Prozesse abzusichern.

Keimreduktionstests stellen ein wichtiges Kriterium für die Funktionalität von aseptischen Abfüllanlagen dar. Hierbei ist die mittlere logarithmische Keimreduktion (MLK) als wichtigstes Abnahmekriterium herauszustellen. Aus diesem Grunde wurden erstmals die Testergebnisse aus unterschiedlichen Betrieben und Labors statistisch aufgearbeitet und miteinander verglichen. Die hierbei detektierten Schwachpunkte führten zu konkreten Empfehlungen für die Gestaltung und Auswertung von Keimreduktionstests in der Praxis. Abschließend wurden die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse für die Konzeption und Absicherung einer aseptischen Abfüllung zusammengestellt.

Mit dieser Arbeit wurden wissenschaftlich fundierte Erkenntnisse für die Produktsicherheit bei UltraClean- und kaltseptischen Abfüllanlagen erarbeitet, welche den Anforderungen an die aktuelle Getränkevielfalt mit ihrer jeweiligen Flora an schädlichen Mikroorganismen gerecht werden. Die in diesem Umfeld auftretenden Risiken, Schwachstellen und Probleme wurden ausführlich dargestellt.

Abstraktum

Den in der Praxis der Getränkeabfüllung, insbesondere bei UltraClean- und aseptischen Abfüllanlagen, immer wieder auftretenden mikrobiologischen Problemen wurde in Fallstudien aus technischer und mikrobiologischer Sicht nachgegangen. Um die thermische Inaktivierung ausgewählter, Getränke schädigender Mikroorganismen darzustellen, ist deren Hitzeresistenz aus zwei dezimalen Reduktionszeiten (D-Wert) in Form des z-Wertes ermittelt worden.

Auch konnte erstmals die spontane Sporulation von *Pichia anomala* unter Stressfaktoren nachgewiesen werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde eine Matrix entwickelt, in welcher die speziell erforderlichen Pasteurisationseinheiten in Abhängigkeit der gewünschten Keimreduzierung und der Hitzeresistenz der einzelnen Mikroorganismen aufgeführt sind. Des Weiteren wurde für aseptische Abfüllanlagen ein für den Praxiseinsatz geeigneter Test zur Ermittlung der Abtötungseffizienz bei der Reinigung und Desinfektion sowie der Sterilisation in Form eines "Endpointtests" entwickelt.

Mit Hilfe eines neuartig entwickelten Testmediums zur Kontrolle der Oberflächenreinigung ist es nun möglich, direkt Schwachstellen im Reinigungsablauf zu visualisieren. Um die äußere Anlagenhygiene sicher zu stellen, wurden ein Hygienekonzept sowie ein Probenahmeplan für aseptische PET-Getränkeabfüllanlagen ausgearbeitet, welches in der komplexen Form bisher nicht vorlag. Für die Praxis wurden aus den wissenschaftlich erworbenen Erkenntnissen Kriterien für die Überprüfung von Abfüllanlagen und deren Peripherie erarbeitet. Die erarbeiteten Checklisten stellen die Grundlage für eine effiziente Kontrolle der Prozessabläufe dar und helfen, die aseptischen Prozesse bei Validierungen und Abnahmen abzusichern.

Ein direkter Vergleich unterschiedlicher statistischer Aussagen führte zu einer geordneten Übersicht der bisherigen Validierungsabläufe und stellt die statistische Sicherheit der Keimreduktionstest in einer neuartigen Form dar.

Mit dieser Arbeit wurden wissenschaftlich fundierte Erkenntnisse für die Produktsicherheit bei UltraClean- und kaltaseptischen Abfüllanlagen erarbeitet, welche den Anforderungen an die aktuelle Getränkevielfalt mit ihrer jeweiligen Flora an schädlichen Mikroorganismen gerecht werden. Die in diesem Umfeld auftretenden Risiken, Schwachstellen und Probleme wurden ausführlich dargestellt.

Summary

The microbiological problems occurring in the practice of beverage bottling, in particular at UltraClean- and aseptic filling plants, were tracked by case studies under technical and microbiological aspects. Against the background of the rapidly increasing variety of microbiologically pretentious beverages, the heat resistance of potential beverage spoiling microorganisms were investigated depending on their physiological condition and the heated medium, in order to apply the results into the practice of modern bottling-technology.

To describe the process of thermal inactivation of harmful microorganisms in selected representative drinks, their heat resistance was measured using two decimal reduction times (D-value), expressed as the z-value. During the inactivation tests the microorganisms were in their most heat-resistant physiological state, e.g. as a spore suspension, and the expected different reactions to the thermal effect in the tested liquid media could be confirmed. Also the spontaneous sporulation, accompanied by an increased heat resistance, could be proved for the first time for *Pichia anomala* under physiological stress, caused by the influence of teein and by dehydration. Based on these results, a matrix was developed, which specifically describes the necessary pasteurization units as a function of the demanded germreduction and the heat resistance of each microorganism. Thus a tool to set up the parameterisation of flash pasteurizer-plants was generated.

In addition, a test procedure, suitable for the practical use in form of a so called Endpointtest, was developed to determinate the destruction-efficiency of cleaning, disinfection and sterilization of aseptic filling plants.

As a further tool to optimise the product safety of UltraClean- and cold-aseptic filling plants, an applicable retention test medium for spray shadow tests to proof the efficiency of the surface cleaning was developed in the course of this work. Unlike the media in use, this one does not encourage the growth of microorganisms or the destruction of machine parts by bringing in nutritious or abrasive components.

In order to ensure the internal and external hygiene of the machines, hygiene drafts, as well as a sampling plan for aseptic PET bottling plants, were elaborated. On-site-investigations and acceptance tests had shown a variety of weak points and constructive shortcomings concerning the qualified hygienic design (QHD) of UltraClean- and cold-aseptic filling plants. The most important of these aspects have been listed in this thesis.

The explosive force of these weak points in QHD is caused by the risk of a potential re-infection by encouraging bio films and/or providing germ niches for beverage spoiling microorganisms in the area of the machine surfaces.

Based on the scientifically obtained results, inspection criteria for filling plants and their periphery were created as checklists for the use in bottling practice. These inspection lists can support the plant operators in terms of an efficient process control and ensure the suitable sanitizing processes during validation and acceptance tests.

Count reduction tests represent an important criterion to check the functionality of aseptic filling plants. Especially the average logarithmic germ reduction is the most important part of an acceptance test. For this reason, existing test results from different and labs were statistically analysed for the first time and compared with each other. The weak points detected at that examination led to recommendations for the organization and evaluation of count reduction tests in practice. Finally, the results gained during this were compiled as a tool to design and protect aseptic bottling processes.

The intention of this work was to create scientifically well-founded results for the product safety of UltraClean- and cold-aseptic filling plants, including the current and increasing variety of beverages and their specific flora of harmful microorganisms. The risks, weak points and problems occurring in this area were shown .

Abstract

The microbiological problems occurring in the practice of bottling of beverages, especially with UltraClean- and aseptic filling plants, again and again were tracked by case studies under technical and microbiological aspects. To describe the process of thermal inactivation of harmful microorganisms in selected representative drinks, their heat resistance was measured using two decimal reduction times (D-value), expressed as the z-value.

Also the spontaneous sporulation could be proved for the first time by *Pichia anomala* under stress factors. Based on these results, a matrix was developed, in which specifically necessary pasteurization units are presented as a function of the demanded germreduction and the heat resistance of each microorganism. Additionally, a test procedure, suitable for the practical use in form of a so called endpoint test, was developed to determinate the destruction-efficiency of cleaning, disinfection and sterilization of aseptic filling plants.

Using a newly developed test medium for checking up the cleaning of the surface, now it is possible to visualize weak points directly during the cleaning . In order to ensure the external hygiene of the machines, hygiene drafts as well as a sampling plan for aseptic PET filling plants were elaborated. Both are not available in such a detailed form so far. Based on the scientifically obtained results, inspection criteria for filling plants and their periphery were created as checklists for the use in bottling practice. These inspection lists can support the plant operators in terms of an efficient process control and ensure the suitable sanitizing processes during validation and acceptance tests.

A direct comparison of different statistical statements led to a structured overview of the previous validation and improves the statistical safety of the countreduction test.

The intention of this work was to create scientifically well-founded results for the product safety of UltraClean- and cold-aseptic filling plants, including the current and increasing variety of beverages and their specific flora of harmful microorganisms. The risks, weak points and problems occurring in this area were shown .

7. Literatur

Literaturverzeichnis

1. VDMA-Fachverbandsschriften "Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen" zum Thema "Aseptische und keimfreie Abfüllmaschinen für die Nahrungsmittelindustrie", Stand August 2010
2. Hauser, G.: Hygienische Produktion - Hygienische Produktionstechnologie, Vol. 1, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2008
3. Hauser, G.: Hygienische Produktion - Hygienegerechte Apparate und Anlagen Vol. 2, Wiley-VCH-Verlag, Weinheim, 2008
4. Oliver-Daumen, B.: Aseptische Abfüllanlagen - Teil 1: KZE-Anlagen in der Praxis, Brauwelt, Nr. 28/29, 2003, S. 905-912
5. VDMA-Fachverbandsschriften Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen: Merkblatt: Prüfung von Aseptikanlagen: Entkeimung des Sterilbereichs des Maschineninnenraums, Nr. 8, 2003
6. VDMA-Fachverbandsschriften Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen: Merkblatt: Prüfung von hygienischen Abfüllmaschinen der Klasse V nach VDMA (aseptisch arbeitende Abfüllmaschinen): Außenentkeimung von Packmitteln, Nr. 14, 2006
7. Krones AG: Validierungsmappe der Krones AG, Neutraubling, 2008
8. KHS GmbH: Validierungsmappe der KHS GmbH, Bad Kreuznach, 2009
9. Internetlexikon Onmeda, <http://www.onmeda.de/lexika/persoenlichkeiten/pasteur.html>
10. Ahrens, E.: Zur Absterbeordnung der Mikroorganismen bei thermischer Haltbarmachung, Getränkeindustrie, Nr. 6, 1983, S. 539 - 544
11. Roesicke, J.: Pasteurisiereinheit und Abtötungseffekt, Brauwelt, Nr. 15, Jahrgang 121, 1981, S. 522
12. Sinell, H.-J.: Einführung in die Lebensmittelhygiene - Physikalische Verfahren zur Haltbarmachung, 2. Auflage, 1985
13. Wallhäußer, K.H.: Praxis der Sterilisation, Desinfektion - Konservierung, 5. ed., Georg Thieme Verlag, 1995
14. Renner, E.: Mathematisch-Statistische Methoden in der praktischen Anwendung, 2. ed., Verlag Paul Parey, 1981
15. Langowski, H.C.: Privatmitteilung: Lehrstuhl für Verpackungstechnik, Technische Universität München - WZW, 2008

16. Hui, Y.H.: Handbook of Food Science, Technologie and Engineering, Vol. 3 CRC Press, 2005
17. Kunz, B.: Grundriss der Lebensmittelmikrobiologie, 2. ed., Behr's Verlag, Hamburg, 1994
18. Jay, J.M.: Modern Food Microbiology, 6th ed., An Aspen Puplicaton, 2000
19. Manger, H.-J.: Füllanlagen für Getränke, 1. ed., VLB Berlin, 2008
20. Holzapfel, W.: Lexikon der Lebensmittel-Mikrobiologie, 3. Auflage, Behr's Verlag, 2004
21. Takacs, J. Wirth, F. und Leistner, L.: Berechnung der Erhitzungswerte (F-Werte) für Fleischkonserven, I. Mitteilung: Theoretische Grundlagen, Die Fleischwirtschaft, 49. Jahrgang, 1969, S. 877-883
22. Schneider, J.: Inaktivierung von Mikroorganismen, Definition Pasteurisations-Einheiten (Privatmitteilung), Oktober 2009
23. Schneider, J.: Privatmitteilung im VDI-Richtlinienausschuss 4066, März 2009
24. Back, W.: Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie 2, Hans Carl Getränkefachverlag, Nürnberg, 2000
25. Back, W.: Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie 1, Hans Carl Getränkefachverlag, Nürnberg, 1994
26. Madigan, M.T. und Martinko, J.M.: Brock Biologie of microorganisms, 11th ed., Prentice Hall International, 2005
27. DIN-EN-ISO-11138-1: Sterilisation von Produkten für die Gesundheitsfürsorge - Biologische Indikatoren Teil 1: Allgemeine Anforderungen (ISO 11138-1:2006), 2006
28. Reuter, H.: Bewertung der thermischen Wirksamkeit von UHT-Anlagen, Teil I: Reaktionskinetische Grundlagen, Deutsche Molkereizeitung F12, 1980, S. 362 - 370
29. Reuter, H.: Bewertung der thermischen Wirksamkeit von UHT-Anlagen Teil II - Berechnung von Sterilisationswerten, Deutsche Molkereizeitung, F43, 1980, S. 1616 - 1625
30. Reuter, H.: Bewertung der thermischen Wirksamkeit von UHT-Anlagen Teil III: F-Werte von UHT-Anlagen, Deutsche Molkereizeitung, F 48, 1980, S. 1793 - 1798
31. Evers, H. und Wolf, D.: Wachstum, Vermehrung und Reduzierung von Mikroorganismen haben mathematisch viel gemeinsam, Flüssiges Obst (Confrukta Medien), 2008, S. 135-139

32. Fachhochschule-Ostwestfalen-Lippe: Datenbank zur Erfassung der D- und z-Werte, 2010
33. Röcken, W.: Aktuelle Gesichtspunkte zum Thema Pasteurisation (Biologische Grundlagen) Brauwelt, Nr. 42, 1984, S. 1826-1832
34. Annemüller, G. Manger, H.-J. und Lietz, P.: Die Hefe in der Brauerei, VLB Berlin, 2004
35. Baumgart, J.: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln, 3. ed., Behr's Verlag, 1999
36. Baggermann und Samson: (Editors), Introduction to food-borne fungi, Ed.: Samson, R. A. und Van Reenen-Hoekstra, E. S, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Delft, 1988
37. Bibek, R.: Fundamental Food Microbiology, 2nd ed., CRC Press, 2001
38. Brown, A.D.: Microbial Water Stress Physiology, John Wiley & Sons, Chicester, UK, 1990
39. Kessler, H.-G.: Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik - Molkereitechnologie, Verlag A. Kessler, München, 1996
40. Goepfert, J.M. Iskander, I.K. und Amundson, C.H.: Relation of the Heat Resistance of Salmonellae to the Water Activity of the Environment, Applied and Environmental Microbiology - American Society for Microbiologie, Vol.19/3, 1970, S. 429-433
41. Corry, J.E.L.: The Effect of Sugars and Polyols on the Heat Resistance and Morphology of Osmophilic Yeasts, Journal of Applied Microbiology, Vol. 40/3, 1976, S. 269-276
42. Sumner, S.S. Sandros, T.M. Harmon, M.C. Scott, V.N. und Bernard, D.T.: Heat Resistance of Salmonella typhimurium and Listeria monocytogenes in Sucrose Solutions of Various Water Activities, Journal of Food Science, Vol. 56/6, 1991, S. 1741-1743
43. Rademacher, B.: Dissertation: Hochdruckbehandlung von Milch. Untersuchungen zur Inaktivierung von Mikroorganismen und Enzymen und deren kinetische Beschreibung, TU München - FML Weihenstephan, Lebensmittelverfahrenstechnik, 1999
44. Stahl, U. und Scheide, K.: TU-Berlin-Forschungsinstitut für Mikrobiologie: Privatrecherche zu D- u. z-Werten, 08.01.2002
45. Roberts, T.A. und Hitchins, A.D.: Resistance of Spores. The Bacterial Spore (ed. by G. W. Gould), New York Academic Press, 1969
46. Uni-Jena, 22.05.2008, <http://www2.uni-jena.de/biologie/mikrobio/lehre/winter/g1/kapitel4.html>

47. Behringer, R.: Dissatation: Über das Absterbeverhalten von Bazillussporen in Milch und Milchwirtschaft, TU München, 1989, S. 19
48. Orr, R.V. und Beuchat, L.R.: Efficacy of Disinfectants in Killing Spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Journal of Food Protection*, Vol. 63, No. 8, 2000, S. 1117-1122
49. Back, W.: *Colour Atlas and Handbook of Beverage Brewing*, Fachverlag H. Carl, Nürnberg, 2005
50. Oliver-Daumen, B. und Back, W.: Kaltseptik in der Getränkeindustrie, *Flüssiges Obst*, Nr. 8, 2008, S. 392 - 397
51. Brosig, M.: Diplomarbeit: Hitzeresistenz von getränkeschädlichen Mikroorganismen in alkoholfreien Getränken, TU München (WZW), Juni 2008
52. Dück, S.: Diplomarbeit: Untersuchungen zur Hitzeresistenz von getränkerelevanten Mikroorganismen in verschiedenen alkoholfreien Getränken, TU München (WZW), Januar 2010
53. Oliver-Daumen, B.: Hitzeresistenz von getränkeschädlichen Mikroorganismen in alkoholfreien Getränken, 42. Technologisches Seminar Weihenstephan, 2009
54. Oliver-Daumen, B.: Sachverständigengutachten zur Herstellung von Apfelschorlenkonzentrat, 04.10.2001
55. Oliver-Daumen, B.: Sachverständigenberichte zur Kontamination mit *Alicyclobacillus*, 28.08.2008 und 02.09.2008
56. Oliver-Daumen, B.: Abnahmegutachten Mineralwasserbetriebe, Molkereien und Brauereien, 2000-2010
57. Stahl, U.: Untersuchungen zum Stressphänomen *Pichia anomala* (Privatmitteilung), 2002
58. Stahl, U.: Technische Universität Berlin, Forschungsinstitut für Mikrobiologie der VLB-Berlin (Privatmitteilung), 26.07.2002
59. Oliver-Daumen, B.: Gutachten zum Problemkreis *Pichia anomala* bei der Herstellung von Brötchen und Toast, 30.10.2002
60. Pontius, A.J. Rushing, J.E. und Foegeding, P.M.: Heat Resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* Spores, *Journal of Food Protection*, Vol. 61 No. 1, 1998, S. 41-45
61. Silva, F.V.M. und Gibbs, P.S.: *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes, *Trends in Food Science & Technology*, No. 12, 2001, S. 68-74
62. Back, W.: Neu = empfindlich? / Anfälligkeit neuer Getränkeprodukte - Vermeidung mikrobiologischer Probleme, *Brauwelt*, Nr. 17, 2001, S. 617-622

63. Lodder, J.: The Yeasts: A Taxonomic Study, North-Holland, 1970
64. Kreger-van Rij (Editor), N.J.W.: The Yeasts: A Taxonomic Study, 3. ed., Elsevier Science Ltd., 1984
65. Barnett, J.A. Payne, R.W. und Yarrow, D.: Yeasts: Characteristics and identification, 3. ed., Cambridge University Press, 2000
66. Narziß, L.: Abriß der Bierbrauerei, 6. ed., Wiley-VCH Verlag, 1995, S. 294-296
67. Tetra-Pak: Handbuch der Milch- und Molkereitechnik, 2003
68. Schobinger, U.: Handbuch der Lebensmitteltechnologie - Frucht- und Gemüsesäfte, 3. ed., Eugen Ulmer-Verlag, 2001
69. Zeuthen, P. und Börg-Sörensen, L.: Food Preservation Techniques, Woodhead Publishing, 2003, S. 179 (12)
70. Oliver-Daumen, B.: KZE-Anlagen, TWA der VLB, Bielefeld, 10.03.2003
71. Sielaff, H. und Schleusner, H.: Zur Charakterisierung des Pasteurisationseffektes, Lebensmittelindustrie, Nr. 26, 1979, S. 248
72. Gschwendner, M.: Nass- oder Trockensterilisation: Für jeden das Richtige, 1-2006, S. 70 - 76
73. Langowski, H.C. Muranyi, P. und Wunderlich, J.: Plasmatechnologie - Neue Wege zur Entkeimung von Packstoffmaterialien, Chemie-Ingenieur-Technik CIT, Band 78: (Heft 11), 2006, S. 1697-1706
74. DVGW-Arbeitsblätter: W 225, W 296, W 625
75. Schuh, C.: Vorsicht - ätzende Luft - Gesundheitsgefahren durch peroxidhaltige Desinfektionsmittel bei aseptischen Abfüllungen, Getränkeindustrie, Nr. 7, 2010, S. 28 - 31
76. Berufsgenossenschaft NGG: Arbeitssicherheitsinformation (ASI) 8.03/02 Umgang mit Peressigsäure, 2002
77. Berufsgenossenschaft NGG: Arbeitssicherheitsinformation (ASI) 8.05/07 Reizende und ätzende Stoffe, 2007
78. Geiser, A. und Schneider, M.: Keimfreie Verschlüsse im Trockenverfahren, Brauwelt, Ausgabe 46/47, 2003, S. 1574-1576
79. Engelhard, P.: Dissertation: Inaktivieren von Mikroorganismen auf festen Oberflächen mittels Atmosphären aus feuchter Luft/Wasserstoffperoxid und IR-Behandlung, 19.10.2005

80. FDA U.S. Food and Drug Administration: Guidance on Consultation Procedures - Foods Derived From New Plant Varieties, Oktober 1997
81. FDA U.S. Food and Drug Administration: Guidance to Industry for Foods Derived from New Plant Varieties - FDA Federal Register, Volume 57, 29.05.1992
82. KHS GmbH: Infobroschüre: Konstruktionsmerkmale Kappendesinfektion, 2009
83. Fischer, S.: Seminarunterlagen: Flaschen- und Verschlussentkeimung mit Wasserstoffperoxyd zur aseptischen Abfüllung in PET- und HDPE-Flaschen, 12. Flaschenkellerseminar Weihenstephan, 2005
84. Evers, H. Michel, M. und Wolf, D.: Das Multitalent - ACF mit Kondensation, KHS-Journal, H 1, 2007, S. 16-19
85. Muranyi, P.: Plasma-Entkeimung - Eine zündende Innovation, Brauwelt, Ausgabe 4/5, 2005, S. 101-103
86. Langowski, H.C. und Welle, F.: PET in der Verpackung: Perspektiven und Grenzen, Kunststoffe 91, 2001, S. 32 - 35 und 98-102
87. Langowski, H.-C.: Flexible Materialien mit hohen und ultrahohen Barriereigenschaften - Permeationsmechanismen, Materialien und Herstellungsprozesse, Vakuum in Forschung und Praxis 14, Nr 5, 2002, S. 297-302
88. Langowski, H.C.: Neuentwicklung von Barrierefolien, VDI-Fachtagung Folienextrusion, Darnstadt, Juni 2003
89. Luwatec-GmbH: AirLife-System zur Oberflächendesinfektion mit ionisierter Luft, Infobroschüre, 2009
90. Fischer, U.: Adäquate Anlagentechnik für Bier in Kunststoff-Flaschen Teil 2, Brauindustrie, Nr. 3, 2002, S. 30-33
91. Kronen AG: Beste Füllkonzepte für beste Produkte, Infobroschüre, 2009, S. 32-33
92. Heraeus-Noblelight: Carbon-Infrarotstrahler, Infobroschüre, 2009
93. Claranor-S.A.: DÉCONTAMINATION DE BOUCHONS, Firmenprospekt, 2009
94. Französisches-Informationszentrum für Industrie und Technik, FIZIT: Pressemitteilung Claranor Lichtimpulstechnologie:
95. Weisser, H.: Aseptisches Abfüllen, Brauwelt, Nr. 40, 1992, S. 1890-1891
96. Weisser, H.: Vortrag: Cold Aseptic Filling, 7. Flaschenkellerseminar -TU München-Lehrstuhl Brauereianlagen und Lebensmittel-Verpackung, 05. u. 06.12.2000

97. Schmoll, W.: Seminarunterlagen: Vergleichende Darstellung der nass- und trockenaseptischen Abfüllung, 11. Flaschenkellerseminar, TU München-Weihenstephan, 2004
98. Fischer, U.: ACF schlägt alle, KHS-Journal, H 1, 2004, S. 34-36
99. Oliver-Daumen, B.: Kaltaseptische Abfüllanlagen - Teil 2: Anlagenkonfiguration, Brauwelt, Nr. 29 (s. 877-881) und 32 (S. 1-5), 2004
100. VDMA-Fachverbandsschriften Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen: Aseptische und keimarme Abfüllmaschinen für die Nahrungsmittelindustrie, 27.08.2008
101. Hoffmann, J.: Dissertation: Stoffübergang bei der Reinigung als Qualifizierungsmethode der Reinigbarkeit, TU München, 2007
102. EHEDG-Guidelines: Gestaltungskriterien für hygienegerechte Maschinen, Apparate und Komponenten, Doc 8, 2. Auflage, April 2004
103. IFS Food Version 5: IFS Leitfaden / Doktrin - Deutsche Version, 8/2009
104. Berufsgenossenschaft NGG: Arbeitssicherheitsinformation (ASI) 11.03/09, Hygienic Design, 2009
105. DIN-25448: Ausfalleffektanalyse (Fehler-Möglichkeits- und -Einfluß-Analyse), Mai 1990
106. DIN-EN-60812: Analysetechniken für die Funktionsfähigkeit von Systemen (FMEA-Analyse), 2006
107. Evers, H.: FMEA-Analyse - Projekt HR-Isolator (Privatmitteilung), 2008
108. VDMA-Fachverbandsschriften Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen: Aseptische Produktionslinien: Unsterilitätsrisiken bei Produkt- und Versorgungsleitungen - Planungs- und Installationsfehler, Nr. 4, 2002
109. VDMA-Fachverbandsschriften Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen: Aseptische Verpackungsmaschinen für die Nahrungsmittelindustrie: Mindestanforderungen und Rahmenbedingungen für einen bestimmungsgemäßen Betrieb, Nr. 11, 2006
110. VDMA-Arbeitskreis Schnittstellenproblematik bei Aseptikanlagen: Checkliste - CIP-Anlagen für aseptische Füllmaschinen: zu betrachtende Aspekte,, 10-2009
111. VDMA-Fachverbandsschriften Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen: Checkliste "Qualitätssicherung und Wartung" für aseptische Verpackungsmaschinen für die Nahrungsmittelindustrie, Nr. 3, 2. Auflage, 2008

112. VDMA-Fachverbandsschriften Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen: Hygienische Abfüllmaschinen der Klasse IV nach VDMA für flüssige und pastöse Nahrungsmittel: Mindestanforderungen und Rahmenbedingungen für einen bestimmungsgemäßen Betrieb, Nr. 10, Mai 2005
113. VDMA-Fachverbandsschriften Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen: Hygienische Abfüllmaschinen für flüssige und pastöse Nahrungsmittel - Kategorisierung und typische Anwendungsfelder, Nr. 2 Neuauflage, 2006
114. VDMA-Fachverbandsschriften Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen: Leitfaden zur Überprüfung der mikrobiologischen Sicherheit von Abfüllmaschinen der Hygieneklassen IV und V nach VDMA, Nr. 12, 2007
115. VDMA-Fachverbandsschriften Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen: Signalaustausch für aseptische Abfüllmaschinen - Mindestanforderungen für einen sicheren Betrieb, Nr. 5, 2002
116. VDMA-Fachverbandsschriften Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen: Merkblatt: Hygienische Abfüllmaschinen der Klasse V nach VDMA: Prüfung von Packmittelentkeimungsvorrichtungen auf deren Wirkungsgrad, Nr. 6, 2. Auflage, 2008
117. VDMA-Fachverbandsschriften Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen: Zwei Methoden zur Restperoxyd-Bestimmung in Leerbechern an der Abfüllmaschine - Prüfprozeduren, Nr. 1, 2000
118. VDMA-Fachverbandsschriften Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen: Was ist HACCP?, Nr. 7, 2002
119. VDMA-Fachverbandsschriften Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen: Allgemeine Anforderungen an Packmittel für Abfüllmaschinen der VDMA-Hygieneklassen IV und V, Nr. 16, 2010
120. DIN-EN-14698-1: Reinräume und zugehörige Reinraumbereiche (Biokontaminationskontrolle)
121. DIN-EN-1822: Schwebstofffilter (HEPA und ULPA); Klassifikation
122. DIN-EN-ISO-14644-1: Reinräume und zugehörige Reinraumbereiche; Klassifizierung der Luftreinheit
123. VDI-Richtlinie-2083 Blatt 2: Reinraumtechnik, Bau, Betrieb und Instandhaltung, Februar 1996
124. VDI-Richtlinie-4066 Blatt 1: Hygienische Anforderungen an die Herstellung und aseptische Abfüllung von Getränken, Mai 2010
125. Back, W.: Privatmitteilung: Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, Technische Universität München - WZW, 2008

126. Zschaler, R.: Keimreduktionstest an Aseptikanlagen in der Molkerei, Privatmitteilung, 2008
127. DIN-ISO-2859-1: Annahmestichprobenprüfung anhand der Anzahl fehlerhafter Einheiten oder Fehler (Attributprüfung)
128. Wershofen, T.: Hygieneplanung - Kaltseptische Abfüllung sensibler Getränke in PET-Flaschen, Getränkeindustrie Nr.11/12, 2000, S. 670-672
129. Amtliche Sammlung Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LMBG): L00.00-88/55/57 § 64 - Anforderungen aus Keimzahlbestimmungen, Juli 2004
130. Oliver-Daumen, B.: Überprüfung der Isolator- u. Reinraumbereiche mittels Endpointstest und Retentionstest, 43. Technologisches Seminar Weihenstephan, 2010
131. Robinson, J.P.: Handbook of Flow Cytometry Methods, John Wiley & Sons, 25.03.1993
132. International Federation of Fruit Juice Producers (IFU): First standard IFU-method on the detection of Alicyclobacillus in fruit juices - IFU method No. 12, Januar 2004/Februar 2006
133. DIN-EN-ISO-11138-1: Sterilisation von Produkten für die Gesundheitsfürsorge - Biologische Indikatoren, Teil 1 Allgemeine Anforderungen (EN ISO 11138-1:2006), 2006, S. 32
134. DIN-EN-ISO-11138-1: Sterilisation von Produkten für die Gesundheitsfürsorge - Biologische Indikatoren Teil 1 Allgemeine Anforderungen (EN ISO 11138-1:2006), 2006, S. 21
135. Rizvi, S.S.H. und Mittal, G.S.: experimental methods of food engineering, 1992
136. DIN-EN-ISO-11138-1: Sterilisation von Produkten für die Gesundheitsfürsorge - Biologische Indikatoren Teil 1 Allgemeine Anforderungen (EN ISO 11138-1:2006), 2006, S. 22
137. Oliver-Daumen, B.: Kaltseptische Abfüllanlagen - Hygienekonzepte, Brauwelt, Nr. 38-39, 2006, S. 1137-1145
138. Bronstein, I.N. und Semendjajew, K.: Taschenbuch der Mathematik: Statistische Berechnungsmethoden, 1991
139. Ilberg, V. und Jacob, F.: Zur Planung des Stichprobenumfangs bei der Qualitätskontrolle in der Brauerei, Brauwelt, Nr. 20/21, 2004, S. 605
140. Döhler Gruppe, Darmstadt: Aseptic Validation Medium (AVM), Firmenprospekt, 2008
141. Brücklmeier, J.: Linden Grain Medium (Privatmitteilung), 2008

142. Oliver-Daumen, B.: Gutachten zur Mikrobiologie, Hygiene und Aseptik in der Technologie und Verfahrenstechnik, 18.11.2002
143. Legan, J.D. und Voysey, P.A.: Yeast spoilage of bakery products and ingredients, *Journal of Applied Bacteriology*, Volume 70: (Issue 5), 1991, S. 361-371
144. Müller, G.: Mikrobieller Verderb von Backwaren - Mikrobiologie der Lebensmittel - Lebensmittel pflanzlicher Herkunft, 1. ed., Behr's Verlag, Hamburg, 1997
145. Oliver-Daumen, B.: Sachverständigenbericht über eine mikrobiologische Betriebsrevision in einer Brauerei 23.05.2000
146. Eiroa, M.N.V., Junqueira, V.C.A. und Schmidt, F.: Alicyclobacillus in Orange Juice-Occurrence and Heat Resistance of Spores, *Journal of Food Protection*, Vol. 62: (No. 8), 1999, S. 883-886
147. Miller, S. Hennlich, W. Cerny, G. und Duong, H.-A.: Alicyclobacillus acidoterrestris: Ein thermophiler Fruchtsaftverderber - Untersuchungen zum Wachstumsverhalten in Fruchtsäften in Abhängigkeit vom Sauerstoff, *Flüssiges Obst*, Heft Nr. 1, 2001, S. 14-19
148. Oliver-Daumen, B.: Sachverständigengutachten zur Validierung einer Aseptik-Anlage 17.10.2008
149. McIntyre, S. Ikawa, J.Y. Parkinson, N. Haglund, J. und Lee, J.: Characteristics of an acidophilic Bacillus strain isolated from shelf-stable juices, *Journal of Food Protection*, 58, 1995, S. 319-321
150. Walls, I. und Chujate, R.: Alicyclobacillus - historical perspective and preliminary characterization study, *Dairy Food and Environmental Sanitation*, 18, 1998, S. 1-5
151. Pettipher, G.L. Osmundson, M.E. und Murphy, J.M.: Methods for the detection and enumeration of Alicyclobacillus acidoterrestris and investigation of growth and production of taint and fruit juice-containing drinks, *Lett Microbiologie*, 24, 1997, S. 185-189
152. Splittstoesser, D.F.C.Y. und Churey, J.J.: Control of Alicyclobacillus in the juice industry, *Dairy Food and Environmental Sanitation*, 18, 1998, S. 585-587
153. Mette, M.: Leblos glücklich: Kaltsterile und sauerstoffarme Abfüllung von Getränken speziell in PET-Flaschen, Teil 3, *Getränkeindustrie*, Nr. 7, 1999, S. 388-394
154. Habel, F.: Tetra Therm Drink - Fruchtsaftproduktion als In-Line Konzept mit modularem Aufbau, *Flüssiges Obst*, Heft Nr. 1, 2000, S. 41-43
155. Stroh, R., Institut für Lebensmittelhygiene, Privatmitteilung, 2010
156. Vauk, W.R.A. und Müller, H.: Grundoperationen chemischer Verfahrenstechnik, 5. ed., VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1978

-
157. Evers, H.: Fachbegriffe praxisnah: Keine Angst vor der Statistik - Zahlen-Zauber, KHS-Journal, Nr. 2 2008, S. 56-58
 158. Evers, H.: Fachbegriffe praxisnah: Keine Angst vor der Statistik - Zahlen-Dreher, KHS-Journal, Nr. 3, 2008, S. 55 - 57
 159. Amtliche Sammlung Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LMBG): L00.00-88 § 35 - Anwendung der kritischen Differenz für die Auswertung der Ergebnisse, Juli 2004, S. 7-9
 160. Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission (MEBAK): Methodensammlung - Grundlagen der Statistik, 2010
 161. DIN-10124:2009-12: ATP-Messung, Grundlagen zur Erfassung des Hygienestatus mittels Biolumineszenz, Ausgabe 2009-12
 162. VDMA-Fachverbandsschriften Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen: Merkblatt: Riboflavintest für keimarme oder sterile Verfahrenstechniken, Fluoreszenztest zur Prüfung der Reinigbarkeit, Dezember 2007
 163. Back, W.: Privatmitteilung: Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, Technische Universität München - WZW, 2007

8. Anhang

8.1. Beispiel zur Berechnung der Hitzeresistenz (*Pichia anomala*)

8.1.1. Bestimmung des D-Wertes Nr. 1

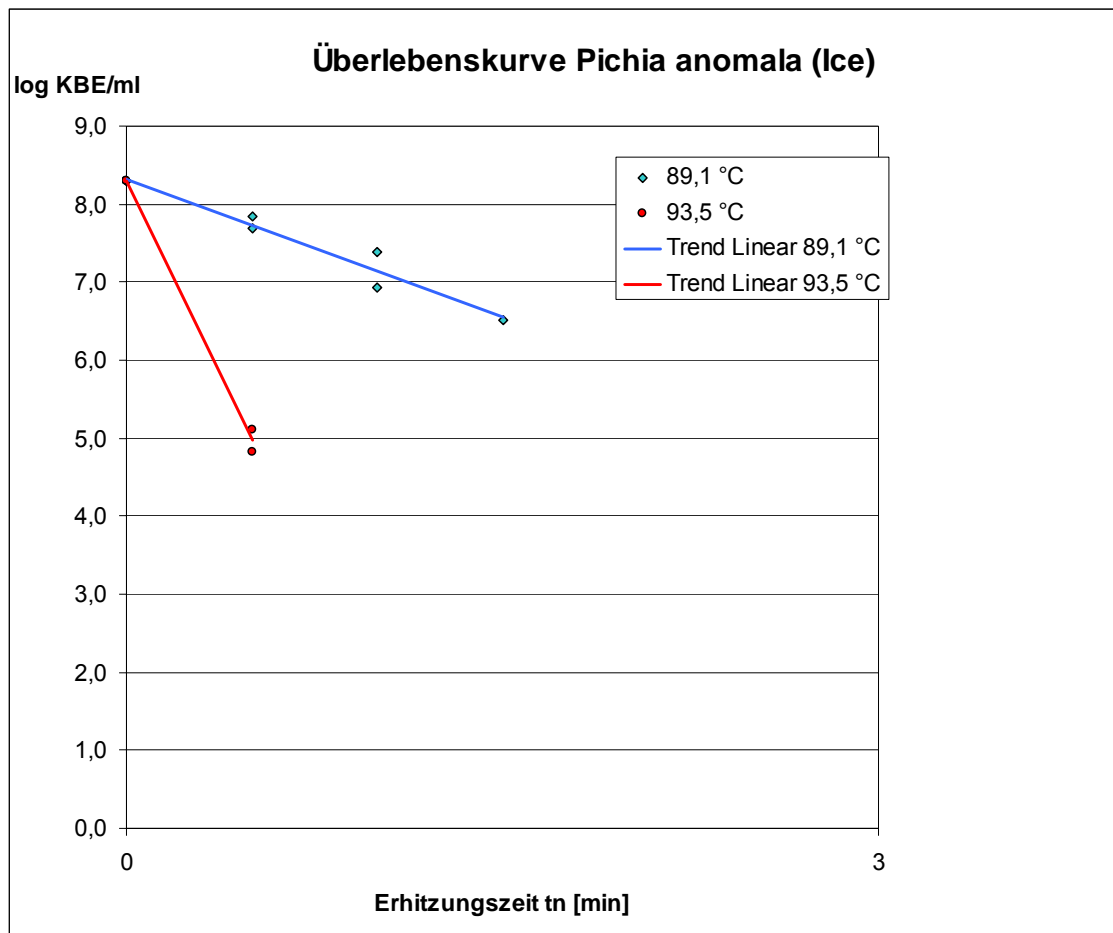
Bestimmung des D-Wertes						
(nach dem Verfahren der Überlebenskurve in Anlehnung an EN ISO 11138-1:2006)						
Untersuchter Keim:		Pichia anomala (Stammnr. P27)				
Untersuchungsmedium:		O-Saft				
Berechnungen: Neigung der Abtötungskurve, D-Wert, Korrelationskoeffizient						
Expositionsbedingung [°C]:		57,0 °C				
Expositions-Stufe	Rückgewonnene Population y_n [KBE/ml Ansatz]	Einwirkzeit t_n [n = min]	$\log_{10} y$	t^2	$t(\log_{10} y)$	$(\log_{10} y)^2$
1	2,00E+08	0	8,3010	0,00	0,0000	68,9071
1	2,00E+08	0	8,3010	0,00	0,0000	68,9071
2	4,85E+07	0,5	7,6857	0,25	3,8429	59,0706
2	6,80E+07	0,5	7,8325	0,25	3,9163	61,3482
3	2,40E+07	1	7,3802	1,00	7,3802	54,4675
3	8,70E+06	1	6,9395	1,00	6,9395	48,1569
4	3,20E+06	1,5	6,5051	2,25	9,7577	42,3170
Formeln:		$A = \sum_{i=1-N} t_i$	$B = \sum_{i=1-N} \log_{10} y_i$	$C = \sum_{i=1-N} (t_i^2)$	$G = \sum_{i=1-N} [t_i (\log_{10} y_i)]$	$E = \sum_{i=1-N} (\log_{10} y_i)^2$
Berechnete Werte:		4,5	52,9452	5	31,8366	403,1744
Anzahl Werte [n]:		7				
Steigung der Regressionsgeraden:						
m=		$[nG] - [AB] / [nC] - [A^2]$				
m=		-1,1844				
D-Wert (nicht gerundet) [min]:		0,844309355				
D-Wert (gerundet) [min]:		0,84				
Korrelationskoeffizient r^2						
$r^2 =$		$[(G) - [(A)(B/n)]]^2 / [(C) - (A^2/n)][E - (B^2/n)]$				
$r^2 =$		0,9584				

8.1.2. Bestimmung des D-Wertes Nr. 2

Bestimmung des D-Wertes							
(nach dem Verfahren der Überlebenskurve in Anlehnung an EN ISO 11138-1:2006)							
Untersuchter Keim:		Pichia anomala (Stammnr. P27)					
Untersuchungsmedium:		O-Saft					
Berechnungen: Neigung der Abtötungskurve, D-Wert, Korrelationskoeffizient							
Expositionsbedingung [°C]:		68,0 °C					
Expositions-Stufe	Rückgewonnene Population y_n [KBE/ml Ansatz]	Einwirkzeit t_n [n = min]	$\log_{10} y$	t^2	$t(\log_{10} y)$	$(\log_{10} y)^2$	
1	2,00E+08	0	8,3010	0,00	0,0000	68,9071	
1	2,00E+08	0	8,3010	0,00	0,0000	68,9071	
2	1,30E+05	0,5	5,1139	0,25	2,5570	26,1524	
2	6,70E+04	0,5	4,8261	0,25	2,4130	23,2910	
Formeln:		$A = \sum_{i=1-N} t_i$	$B = \sum_{i=1-N} \log_{10} y_i$	$C = \sum_{i=1-N} (t_i^2)$	$G = \sum_{i=1-N} [t_i (\log_{10} y_i)]$	$E = \sum_{i=1-N} (\log_{10} y_i)^2$	
Berechnete Werte:		1	26,5421	1	4,9700	187,2576	
Anzahl Werte [n]:		4					
Steigung der Regressionsgeraden:							
$m =$		$[nG] - [AB] / [nC] - [A^2]$					
$m =$		-6,662					
D-Wert (nicht gerundet) [min]:		0,150105074					
D-Wert (gerundet) [min]:		0,15					
Korrelationskoeffizient r^2							
$r^2 =$		$[(G) - (A)(B/n)]^2 / [(C) - (A^2/n)][E - (B^2/n)]$					
$r^2 =$		0,9963					

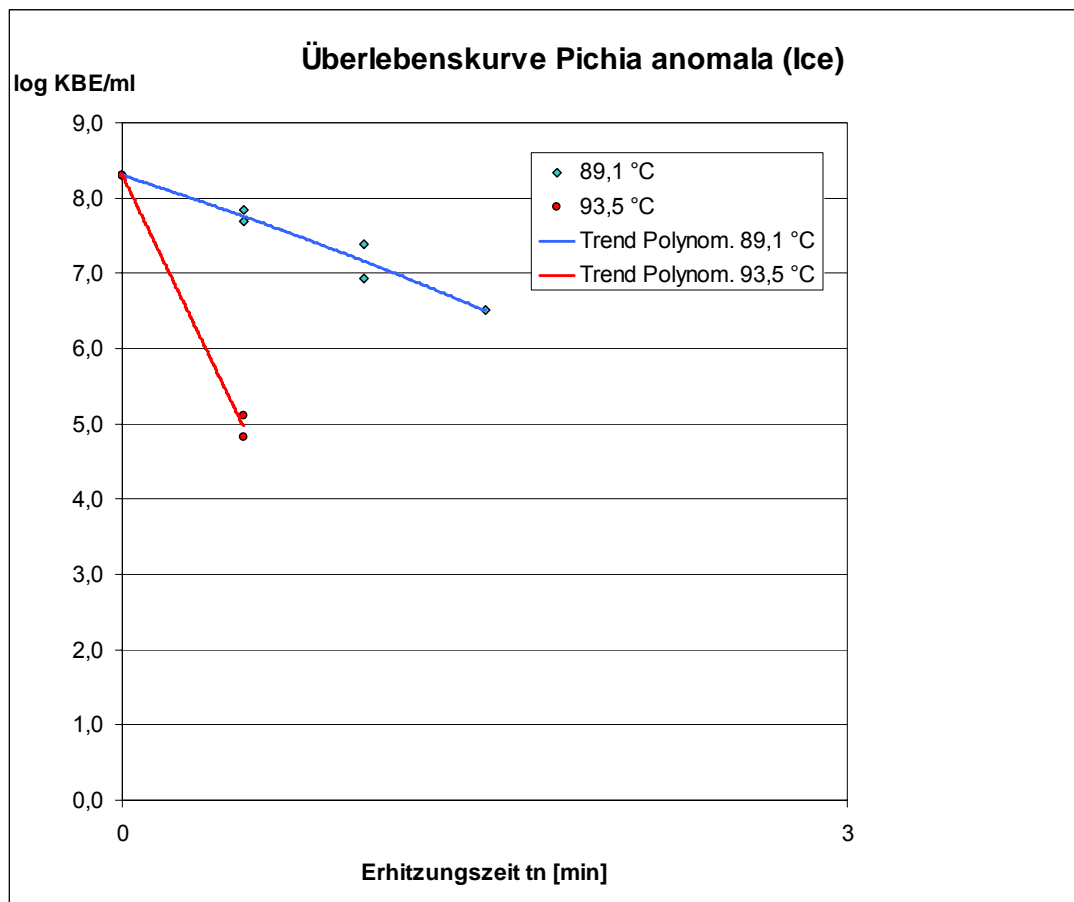
8.1.3. Abtötungskinetik Testkeim

Abtötungskinetik Testkeim									
Untersuchter Keim:		Pichia anomala (Stammnr. P27)							
Diagramm zur Abtötungskinetik: Überlebenskurve bei unterschiedlichen Temperaturen; Kurve aus linearer Trendberechnung									
Berechnungen: Neigung der Abtötungskurve, D-Wert, Korrelationskoeffizient									
Expositionsbedingung [°C]:		57,0 °C			Expositionsbedingung [°C]:		68,0 °C		
Stufe	Rückgewonnene Population y_n [KBE/ml Ansatz]	Einwirkzeit t_n [n = min]	log y_n	Stufe	Rückgewonnene Population y_n [KBE/ml Ansatz]	Einwirkzeit t_n [n = min]	log y_n		
1	2,00E+08	0	8,3	1	2,00E+08	0	8,3		
1	2,00E+08	0	8,3	1	2,00E+08	0	8,3		
2	4,85E+07	0,5	7,7	2	1,30E+05	0,5	5,1		
2	6,80E+07	0,5	7,8	2	6,70E+04	0,5	4,8		
3	2,40E+07	1	7,4						
3	8,70E+06	1	6,9						
4	3,20E+06	1,5	6,5						



8.1.4. Abtötungskinetik Testkeim

Abtötungskinetik Testkeim							
Untersuchter Keim:		Pichia anomala (Stammnr. P27)					
Diagramm zur Abtötungskinetik: Überlebenskurve bei unterschiedlichen Temperaturen; Kurve aus polynom. Trendberechnung							
Berechnungen: Neigung der Abtötungskurve, D-Wert, Korrelationskoeffizient							
Expositionsbedingung [°C]: 57,0 °C				Expositionsbedingung [°C]: 68,0 °C			
Stufe	Rückgewonnene Population y_n [KBE/ml Ansatz]	Einwirkzeit t_n [n = min]	log y_n	Stufe	Rückgewonnene Population y_n [KBE/ml Ansatz]	Einwirkzeit t_n [n = min]	log y_n
1	2,00E+08	0	8,3	1	2,00E+08	0	8,3
1	2,00E+08	0	8,3	1	2,00E+08	0	8,3
2	4,85E+07	0,5	7,7	2	1,30E+05	0,5	5,1
2	6,80E+07	0,5	7,8	2	6,70E+04	0,5	4,8
3	2,40E+07	1	7,4				
3	8,70E+06	1	6,9				
4	3,20E+06	1,5	6,5				



8.1.5. Temperatur - Abtötungskurve

Schätzung des z-Wertes	
Untersuchter Keim:	<i>Pichia anomala</i> (Stammnr. P27)
Schätzung: z-Wert aus D-Werten	
Behandlungs- temperaturen [°C]	D-Werte [min]
57,0 °C	0,84
68,0 °C	0,15
$1/z = D_2 - D_1/T_1 - T_2$	
$1/z =$	0,0627
z [°C] =	15,9420
z gerundet [°C] =	15,9

Temperatur-Abtötungszeit-Kurve

Behandlungstemperatur [°C]	D-Werte [min]
57,0	0,84
68,0	0,15

8.2. Stochastische Sicherheit zum Probenumfang

r	Akzeptanzkriterium / Vertrauensbereich A													
	50%	60%	75%	80%	90%	95%	98%	99%	99,5%	99,6%	99,7%	99,8%	99,9%	99,99%
0	0,69	0,92	1,39	1,61	2,30	3,00	3,91	4,61	5,30	5,52	5,81	6,21	6,91	9,21
1	1,68	2,02	2,69	2,99	3,89	4,74	5,83	6,64	7,43	7,68	8,01	8,46	9,23	11,76
2	2,67	3,11	3,92	4,28	5,32	6,30	7,52	8,41	9,27	9,55	9,90	10,40	11,23	13,93
3	3,67	4,18	5,11	5,52	6,68	7,75	9,08	10,05	10,98	11,27	11,65	12,18	13,06	15,91
4	4,67	5,24	6,27	6,72	7,99	9,15	10,58	11,60	12,59	12,91	13,31	13,86	14,79	17,78
5	5,67	6,29	7,42	7,91	9,27	10,51	12,03	13,11	14,15	14,48	14,90	15,48	16,45	19,57
6	6,67	7,34	8,56	9,08	10,53	11,84	13,44	14,57	15,66	16,00	16,44	17,05	18,06	21,29
7	7,67	8,39	9,68	10,23	11,77	13,15	14,82	16,00	17,13	17,49	17,94	18,57	19,63	22,96
8	8,67	9,43	10,80	11,38	12,99	14,43	16,17	17,40	18,58	18,95	19,42	20,07	21,16	24,59
9	9,67	10,48	11,91	12,52	14,21	15,71	17,51	18,78	20,00	20,38	20,86	21,54	22,66	26,19
10	10,67	11,52	13,02	13,65	15,41	16,96	18,83	20,14	21,40	21,79	22,29	22,98	24,13	27,76
15	15,67	16,69	18,49	19,23	21,29	23,10	25,24	26,74	28,16	28,61	29,17	29,95	31,24	35,29
20	20,67	21,84	23,88	24,73	27,05	29,06	31,45	33,10	34,67	35,16	35,77	36,63	38,04	42,44
25	25,67	26,97	29,23	30,17	32,71	34,92	37,51	39,31	39,31	39,31	42,19	42,19	42,19	42,19
50	50,67	52,49	55,62	56,89	60,34	63,29	66,72	69,07	69,07	69,07	72,81	72,81	72,81	72,81
100	100,67	103,23	107,58	109,35	114,07	118,08	122,70	125,84	125,84	125,84	130,80	130,80	130,80	130,80

8.3.2

Mikrobiologischer Kontrollplan im Abfüllprozess und zur Revalidierung UltraClean-Anlagen und Kaltaseptische Abfüllanlagen

Nr.	Probenart	Intervall	Anzahl	Endo	DEV	OFS	PC-Agar	OFS angereichert
3.	Sterilwasser							
3.1	Rinser	täglich	1				1.000 ml MF	
3.2	UHT	täglich	1				1.000 ml MF	
3.3	Kappendesinfektion	täglich	1				1.000 ml MF	
3.4	Hygienecenter	täglich	1				1.000 ml MF	
3.5								
3.6								
4.	Grundstoffe (Tankware, Containerware)							
4.1	Grundstoffe	jede Anlieferung	1				5 ml GP	5 ml GP
4.2	Konzentrate	jede Anlieferung	1	200 ml Sterilwasser + 50 ml Probe			100 ml MF	5 ml GP
4.3	Sirupe	jede Anlieferung	1				100 ml MF	5 ml GP
4.4	Zucker	jede Anlieferung	1				100 ml MF	5 ml GP
4.5								
MF = Membranfiltration; GP = Gussplatte / Die Anreicherungen für die Grundstoffe erfolgt mit SSL-Bouillon (2 Tage / 28°C)								

8.3.3

Mikrobiologischer Kontrollplan im Abfüllprozess und zur Revalidierung UltraClean-Anlagen und Kaltaseptische Abfüllanlagen

Nr.	Probenbereich	Probenart	Intervall	Anzahl	PC-Agar	OFS	SSL-Bouillon	NBB-Bouillon
5.	Anlage u. Spülwässer							
5.1	Leerflaschen	vor Desinfektion	wöchentlich parallel	5	100 ml MF			
		nach Desinfektion		5	100 ml MF			
5.2	Verschlusskappen	vor Desinfektion	wöchentlich parallel	5	100 ml MF			
		nach Desinfektion		5	100 ml MF			
5.3	Abstrichproben	vor Produktionsbeginn	0 Std.	34			5 ml Zusatz	5 ml Zusatz
		Nach 72 – 96 h	72 – 96 Std.	50			5 ml Zusatz	5 ml Zusatz
5.4	Luftkeime (1 m ³)	Injektor	72 – 96 Std.	1	GP	GP		
		Rinser		1	GP	GP		
		Füller		1	GP	GP		
		Verschließer		1	GP	GP		
		Füller-Füllventile		1	GP	GP		
5.5	Sterilluftproben	UHT-Steriltank	täglich 10 min in Ringerlösung	1	MF			
		Kappendesinfektion		1	MF			
		Rinser		1	MF			
5.6	Inertgase (N ₂ /CO ₂)	Füllerknoten			1	MF		

8.3.4

Mikrobiologischer Kontrollplan im Abfüllprozess und zur Revalidierung UltraClean-Anlagen und Kaltaseptische Abfüllanlagen

Nr.	Probenart	Intervall	Anzahl	aerob * O-NKS	anaerob ** O-NKS	Inkubation bei 30 °C	Anzahl D-Count	Würze- Bouillon (125 ml)	Bebrütung bei 28 – 20°C
6.	Fertigprodukte (klar)								
6.1	KZE (Einlauf)	täglich	1	1.000 ml MF*					
6.2	KZE (Auslauf)	täglich	1	1.000 ml MF*					
6.3	Steriltank (Auslauf)	täglich	1	1.000 ml MF*					
6.4	Füller (Einlauf)	täglich	1	1.000 ml MF*					
6.5	Verkaufseinheit	erste Füllerrunde	n = x	250 ml MF*	250 ml MF*	2 d	n = x	250 ml	3 d
		stündlich	2	250 ml MF*	250 ml MF*	2 d	n = x	250 ml	3 d
		letzte Füllerrunde	n = x	250 ml MF*	250 ml MF*	2 d	n = x	250 ml	3 d
6.6	Rückstellmuster	Produktionsbeginn	4			21 d			
		stündlich	4			21 d			

MF = Membranfiltration; GP = Gussplatte / aerobe Bebrütung (3 Tage / 28°C) / anaerobe Bebrütung (5 Tage / 28°C)

Probenverarbeitung:

für klare Produkte ⇒ Membranfiltration

für trübe und pulpehaltigen Produkte ⇒ Gussplatte á 5 ml Fertiggetränk

8.4. Benetzungstest für PET-Flaschen

Um bei starker Hydrophobie der PET-Flaschen eine wirkungsvolle Desinfektion zu gewährleisten, muss dem Desinfektionsmittel ein Benetzungshilfsmittel zugesetzt werden.

Bevor das Netzmittel jedoch zur Flaschendesinfektion eingesetzt wird, sollte die optimale Konzentration mittels Benetzungstest bestimmt werden.

Equipment:

- PET-Flasche mit oder ohne Verschluss
- Anwendungslösung bei Anwendungstemperatur (z.B. 60 °C)
- Einfüllen von ca. 50-100ml Desinfektionslösung in die PET-Flasche
- Schließen und schütteln der Flasche, hochhalten der Flasche
- Kontrolle der Benetzung:

Schlechte Benetzung:



Unzureichende Benetzung:



Gute Benetzung:



Keine ausreichende Benetzung:

bei Tropfenbildung, aufreißendem Film und zusammenziehender Flüssigkeit

Ausreichende Benetzung:

wenn ein gleichmäßiger vollkommen benetzender Film für ca. 30 Sekunden auf der Oberfläche verbleibt

Lebenslauf

Name		Bartolomé Peter Oliver - Daumen
Anschrift		Südstraße 38, D-31867 Lauenau
Geburtsdatum		16. Januar 1952
Geburtsort		Koblenz
Staatsangehörigkeit		deutsch
Familienstand		verheiratet, 3 Kinder
Schulbildung	1958 - 1968	Schule der Burgunderstraße, Köln St. Kastorschule, Koblenz Dr. Arle's höhere Privatlehranstalt, Koblenz
Schulabschluss I	1968	Mittlere Reife
Berufsausbildung	1968 - 1970	Brauer und Mälzer Klosterbrauerei AG, Koblenz Weissheimer AG, Andernach
Berufsweg I	1971 -1972	Binding-Brauerei AG, Frankfurt Königsbacher-Brauerei AG, Koblenz Schultheiss-Brauerei AG, Berlin
Studium I	1972 -1974	Technische Universität Berlin Fachtechnisches Brauereitechnologisches Studium
Studienabschluss	1974	Diplom-Braumeister
Berufsweg II	1974 - 1982	Technischer Leiter, Hochschulbrauerei Berlin Technisch-wissenschaftlicher Mitarbeiter, VLB-Berlin Freier Mitarbeiter, IfGB-Berlin
Schulabschluss II	1979	Allgemeine Hochschulreife (Begabtenabitur), Berlin
Studium II	1979 - 1982	Technische Universität Berlin Studiengang: Brauereitechnologie, Brennerei- und Hefetechnologie, Getränketechnologie
Studienabschluss	1982	Dipl.-Ing. (Univ.)
Berufsweg III	1982 - 1998	Privatbrauerei Thier, Dortmund Wicküler-Gruppe, Wuppertal u. Köln Gilde-Gruppe, Hannover u. Werningerode
Firmengründung Sachverständiger I	1998 seit 1998	Ingenieur- und Sachverständigenbüro Oliver-Daumen ö.b.u.v.SV der Industrie- und Handelskammer Aseptik, Hygiene u. Mikrobiologie in der Molkerei u. Getränkeindustrie
Sachverständiger II	seit 2002	ö.b.u.v.SV der Industrie- und Handelskammer Technologie und Verfahrenstechnik in der Brau- und Getränkeindustrie
Firmengründung	2007	vod-engineering GmbH
Aktivitäten	1982 -2010 seit 2006 seit 2008	Technisch-Wissenschaftlicher Ausschuss der VLB-Berlin – Fachausschuss Gärung, Lagerung u. Abfüllung Hygienische Anforderungen an die Herstellung und aseptische Abfüllung von Getränken - Grundlagen und Auslegungskriterien VDMA Arbeitskreis – Schnittstellenproblematik Aseptik
Lehraufträge	seit 2008	Hygienic Design, Hochschule Ostwestfalen-Lippe Fachbereich Life Science Technologies