

Abschlussbericht

von

Carina Braun

zum

Promotionsprojekt

„Prüfung der Anwendbarkeit von intrinsisch antimikrobiellen
Oberflächen zur Reduzierung von Kreuzkontaminationen in
der Fleischindustrie“

1 ALLGEMEINE ANGABEN

Antragssteller:	Carina Braun
Institut:	Universität Bonn, Institut für Tierwissenschaften, Abt. Präventives Gesundheitsmanagement, AG Cold Chain Management
Thema des Projektes:	Prüfung der Anwendbarkeit von intrinsisch antimikrobiellen Oberflächen zur Reduzierung von Kreuzkontaminationen in der Fleischindustrie
Berichtszeitraum:	01.07.2012-20.05.2014
Förderungszeitraum:	01.07.2012-30.06.2014
Publikationen:	<p>Braun, C., Ilg, Y. & J. Kreyenschmidt (2013): Improvement of food quality and safety by intrinsic antimicrobial food contact surfaces. Vortrag: 5th International Workshop Cold Chain Management, Workshop, 10.-11.06.2013, Bonn, Deutschland.</p> <p>Braun, C., Ilg, Y., Kreyenschmidt, M., Lorenz, R. & J. Kreyenschmidt (2013): Improvement of food quality and safety by intrinsic antimicrobial food contact surfaces. Proceedings 5th International Workshop Cold Chain Management, Workshop, 10.-11.06.2013, Bonn, Deutschland.</p> <p>Kreyenschmidt, J.; Albrecht, A.; Braun, C.; Herbert, U.; Mack, M.; Rossaint, S.; Ritter, G.; Teitscheid, P. & Y. Ilg (2013): Food Waste in der Fleisch verarbeitenden Kette. Fleischwirtschaft 10, 57-63.</p> <p>Weitere Publikationen sind in Vorbereitung und erfolgen nach Offenlegung der Patente (Juli 2014)</p>

2 ARBEITS- UND ERGEBNISBERICHT

2.1 Hintergrund

Das Dissertationsvorhaben wird in der Arbeitsgruppe „Cold Chain Management“ (Abteilung Präventives Gesundheitsmanagement) der Universität Bonn durchgeführt. Im Rahmen eines nationalen Forschungsprojektes „SmartSurf“ (16INO639) hat die Arbeitsgruppe zusammen mit der Fachhochschule Münster (IKFM) den Prototypen eines antimikrobiell funktionalisierten (AMF-) Polymers¹ entwickelt. Bei diesen Kunststoffen handelt es sich um Sustainable Active Microbiocidal (SAM)-Polymere, die eine neue Klasse von Biozidprodukten darstellen. Die kontaktbiozide Wirkungsweise beruht auf der Beschaffenheit der Polymeroberfläche, welche eine hohe Dichte an aminofunktionalisierten Gruppen aufweist (Abbildung 1) (Thölmann et al. 2003).

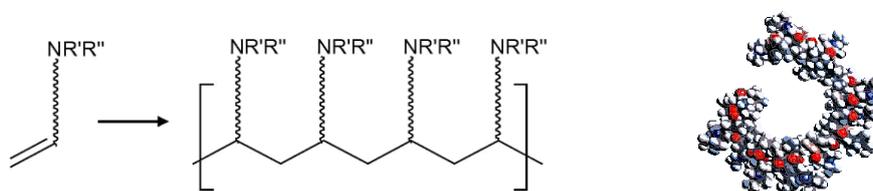


Abbildung 1: Struktur der SAM-Polymere (Thölmann et al., 2003)

Diese Struktur und ihre intrinsisch antimikrobielle Wirksamkeit zeigen gegenüber konventionellen Bioziden erhebliche Vorteile auf, sodass keine mit der Migration von aktiven Stoffen einhergehenden Probleme entstehen. Untersuchungen wiesen die toxikologische Unbedenklichkeit, die Geruchs- und Geschmacksneutralität (Buranasompob 2005) sowie eine verlässliche antimikrobielle Wirksamkeit nach (Ilg et al. 2011). Das von der Degussa/Evonik entwickelte SAM-Produkt Amina T100[®] wurde jedoch aufgrund von unzureichenden Werkstoffeigenschaften wieder vom Markt genommen.

Das im Rahmen von SmartSurf entwickelte AMF-Polymer weist substantziell verbesserte Werkstoffeigenschaften auf und Untersuchungen an der Universität Bonn konnten sehr gute antimikrobielle Aktivität nachweisen. Alle bisher erfolgten Untersuchungen bezogen sich auf die Optimierung der allgemeinen Werkstoffeigenschaften unter Beibehaltung der antimikrobiellen Aktivität. Für die Anwendung des AMF-Polymers in der Fleischindustrie muss das Material jedoch an die dortigen Gegebenheiten angepasst werden und eine systematische, anwendungsbezogene Untersuchung erfolgen. Vor Beginn dieses Promotionsvorhabens war nur sehr wenig über die Wirksamkeit der SAM-Polymere unter realen Bedingungen bekannt. So lagen beispielsweise kaum Daten über den Einfluss von produkt- und prozessspezifischen Parametern, wie Mikroorganismenspezies, Umgebungstemperatur oder Lebensmittelkomponenten auf die antimikrobielle Aktivität des AMF-Polymers vor. Zur Bewertung der Anwendbarkeit der Polymere zur Reduzierung von Kreuzkontaminationen in der Fleischindustrie sind diese Daten aber essentiell.

¹ Zurzeit sind Stoff- und Anwendungspatente in Arbeit, daher wird eine interne Verschlüsselung verwendet.

2.2 Ziel des Projektes

Das Ziel der Arbeit war daher die systematische Erforschung von SAM-Polymeren auf deren Eignung hygienische Bedingungen in der Fleischindustrie zu verbessern. Die Forschungsschwerpunkte lagen hierbei auf:

1. Prüfung der antimikrobiellen Wirksamkeit in Abhängigkeit von der Mikroorganismenspezies und von der Höhe des Keimgehaltes
2. Analyse des Einflusses von produkt- und prozessspezifischen Faktoren auf die antimikrobielle Wirksamkeit von SAM-Polymeren
3. Untersuchung der Langzeitstabilität von SAM-Polymeren
4. Erforschung des Wirkmechanismus der SAM-Polymere gegen Mikroorganismen
5. Analyse des Potentials der SAM-Polymere Kreuzkontaminationen zu verringern sowie Untersuchung des Migrationsverhaltens bei Lebensmittelkontakt

Ziel war es durch systematische und anwendungsbezogene Untersuchungen Aussagen über die Anwendbarkeit der SAM-Polymere und ihren Beitrag zur Reduzierung der Kreuzkontaminationen in der fleischverarbeitenden Industrie zu treffen.

2.3 Darstellung der Forschungsarbeiten

Das Promotionsprojekt ist in 10 Arbeitspakete aufgeteilt (Tabelle 1). Innerhalb des Berichtszeitraumes wurde in allen Arbeitspaketen gearbeitet. Aufgrund von verzögerten Materialbereitstellungen durch die FH Münster, die durch technische Probleme bedingt waren, sowie unvorhersehbaren weiteren Optimierungen der Probenkörpern konnten innerhalb der zwei Jahre nicht alle Arbeitspakete abgeschlossen werden. Diese Arbeiten werden nach Abschluss der Förderung erfolgen.

Tabelle 1: Übersicht über die Arbeitspakete im Promotionsprojekt

Arbeitspaket	Beginn	Ende
1 Literaturrecherche und Versuchsplanung	07/12	läuft
2 Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit von SAM-Polymeren gegenüber fleischrelevanten Verderbniserregern und pathogenen Mikroorganismen sowie in Abhängigkeit der Höhe des Keimgehaltes	10/12	10/13
3 Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit in Abhängigkeit produkt- und prozessspezifischer Faktoren	10/12	06/14
4 Untersuchungen zum Wirkprinzip der SAM-Polymere	07/12	läuft
5 Untersuchungen zum Potential Kreuzkontaminationen zu verringern	02/14	läuft
6 Untersuchungen zum Migrationsverhalten der SAM-Polymere bei Lebensmittelkontakt	11/12	läuft
7 Untersuchungen zur Langzeitstabilität von SAM-Polymeren	09/12	läuft
8 Datenanalyse und statistische Auswertung	07/12	läuft
9 Publikationen	06/13	läuft
10 Verfassen der Dissertationsschrift	12/14	06/15

Zu Beginn der Promotion erfolgte eine intensive Literaturrecherche. Zudem wurde in Zusammenarbeit mit der FH Münster festgelegt mit welchem SAM-Polymer die systematischen Untersuchungen durchgeführt werden sollten. Aufbauend auf durchgeführten Versuchsreihen wurde ein Copolymersystem basierend auf dem neuem SAM-Polymer und einem nicht aziden Monomer im molaren Verhältnis von 50/50 ausgewählt. Dieses AMF/n.a.-Copolymer zeichnet sich durch gute Werkstoffeigenschaften und einer sehr guten antimikrobiellen Aktivität aus. Zusätzlich wurde das AMF-Homopolymer in die Untersuchungen einbezogen, um eine weitere Charakterisierungen des neuen SAM-Polymers

zu ermöglichen. Während des gesamten Berichtszeitraumes wurde stetig durch die FH Münster an der Optimierung des AMF-Polymers gearbeitet und diese neuen Probenkörper promotionsbegleitend auf ihre antimikrobielle Aktivität geprüft.

Die ersten optimierten Probenkörper für die systematischen Untersuchungen wurden im 1. Quartal 2013 zur Verfügung gestellt. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden Vorversuche und Methodenentwicklungen in den AP 2, 3, 6 und 7 durchgeführt. Die Untersuchungen in AP 2 wurden bereits erfolgreich abgeschlossen und auch AP 3 kann zeitnah beendet werden. In AP 4 erforderten unerwartete methodenbedingte Probleme einen neuen Lösungsansatz, welcher nun verfolgt wird. Für AP 5 werden aktuell Methoden zur Untersuchung des Potentials Kreuzkontaminationen zu verringern entwickelt. Erste Ergebnisse sind dieses Quartal zu erwarten. Untersuchungen zum Migrationsverhalten (AP 6) wurden in Kooperation mit der FH Münster durchgeführt und werden begleitend zur Optimierung der Polymere durchgeführt. In AP 7 wurden im Abstand von 6 Monaten Proben auf ihre Langzeitstabilität überprüft. Diese Untersuchungen werden kontinuierlich weitergeführt. Das AP 8 wird begleitend zu den Untersuchungen der zuvor beschriebenen APs durchgeführt. Im Juni 2013 wurde das Promotionsprojekt auf dem 5. Internationalen Cold Chain Management Workshop in Bonn im Rahmen eines Vortrages vorgestellt. Mitte 2014 werden die Stoffpatente für das neue SAM-Polymer offengelegt, sodass daraufhin zeitnah weitere Publikationen eingereicht werden (AP 9).

Im Folgenden werden die durchgeführten Untersuchungen in den unterschiedlichen APs näher erläutert.

AP 1: LITERATURERECHERCHE UND VERSUCHSPLANUNG

Zu Beginn der Promotion wurde eine umfangreiche Literaturrecherche zu den zwei Oberthemen antimikrobielle Oberflächen und Kreuzkontaminationen in der Fleischindustrie durchgeführt. Durch diese Recherche wurden zum einen Methoden als Grundlage für eigene Untersuchungen erfasst und zum anderen wichtige Untersuchungsaspekte herausgearbeitet. Erwartungsgemäß gab es im Bereich der antimikrobiellen Oberflächen zahlreiche Veröffentlichungen, welche ein breites Spektrum von eingesetzten Bioziden umfassen. Zum Thema SAM-Polymeren sind bisher nur wenige Artikel publiziert worden. Daher wurde in der Versuchsplanung auf die Erkenntnisse über andere Systeme zurückgegriffen und Methoden entsprechend modifiziert. Im Bereich der Kreuzkontaminationen zeigten Untersuchungen, dass SAM-Polymere ebenfalls das Potential haben Biofilme zu reduzieren. Daher wurde dieser Aspekt in das Promotionsvorhaben aufgenommen.

Seit Beginn des Promotionsvorhabens wird fortlaufend eine Literaturdatenbank (Citavi) aufgebaut, welche eine Literatur- und Wissensorganisation bietet.

AP 2: EINFLUSS VON MIKROORGANISMENART UND HÖHE DES KEIMGEHALTES

Zur systematischen Prüfung der antimikrobiellen Aktivität (AP 2, 3 und 7) wird das Standardprüfverfahren JIS Z 2801:2000 bzw. ISO 22196:2007 verwendet und wurde entsprechend für die jeweiligen Forschungsschwerpunkte modifiziert. Bei dem Testverfahren handelt es sich um eine quantitative Methode zur Erfassung der antimikrobiellen Aktivität von Kunststoffoberflächen durch den Vergleich der Oberflächenkeimgehalte auf Referenz- und Probenmaterial nach Beimpfen (*S. aureus*; 10^5 KBE/ml) und Inkubation unter definierten

Bedingungen. Ein Material ist nach JIS 2801:2000 als antimikrobiell wirksam einzustufen, wenn nach 24 h Inkubation bei 35°C eine Log_{10} -Reduktion des Oberflächenkeimgehaltes von mindestens 2 Log_{10} -Stufen nachgewiesen werden kann. Abbildung 1 zeigt die grundlegende Vorgehensweise.

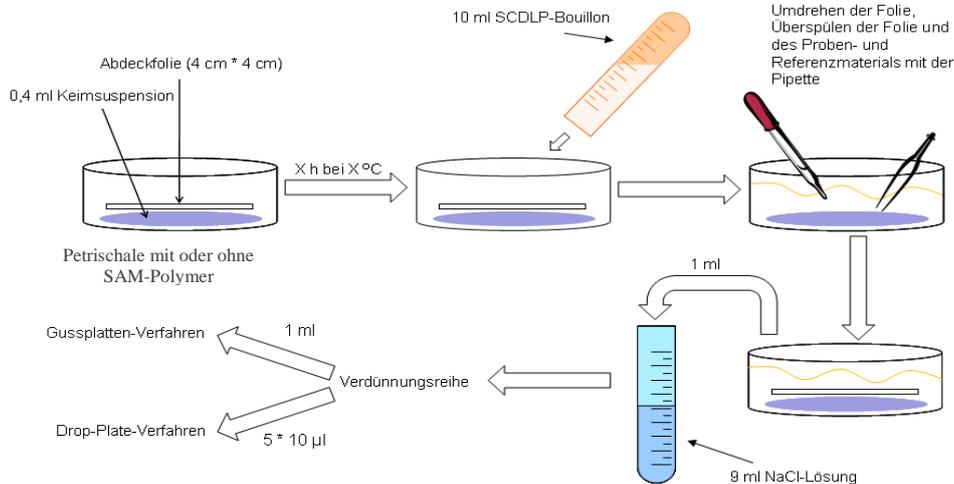


Abbildung 2: Vorgehensweise zur Quantifizierung der antimikrobiellen Aktivität von Oberflächen in Anlehnung an den JIS 2801:2000

In ersten Versuchsreihen wurden verschiedene fleischrelevante Mikroorganismen mit einer Beimpungskonzentration von 10^5 KbE/ml verwendet: *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. enterica*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. putida*, *Ps. fluorescens*, *B. thermosphacta* und *A. faecalis*. Nach 2 h Kontakt bei 35°C wurde der Oberflächenkeimgehalt auf dem SAM-Polymer bis oder nahezu bis zur Nachweisgrenze von $1,0 \log_{10}$ KbE/ml reduziert.

Aufgrund dieser sehr guten Wirksamkeit wurde der Einfluss einer stark erhöhten initialen Oberflächenkeimbelastung überprüft. Auch bei einer Kontamination mit Keimgehalten von bis zu 10^8 KbE/ml lagen die Oberflächenkeimgehalte auf dem AMF-Proben bereits nach 2 h deutlich unter denen auf dem Referenzmaterialien (Abbildung 3). Eine Ausnahme stellt *Ps. fluorescens* dar, bei weniger stark erhöhten Keimbelastungen zeigten sich jedoch auch hier deutliche Unterschiede. Erhöhte Keimgehalte der pathogenen Keime *S. enterica* (10^4 KbE/ml) und *S. aureus* (10^8 KbE/ml) konnten bereits innerhalb 1 h Kontakt bis zur Nachweisgrenze reduziert werden. Das Material scheint daher dafür geeignet zu sein in der Industrie nicht nur moderate; sondern auch erhöhte partielle Kontaminationen fleischrelevanter Mikroorganismen in kurzer Zeit auf ein Minimum zu reduzieren.

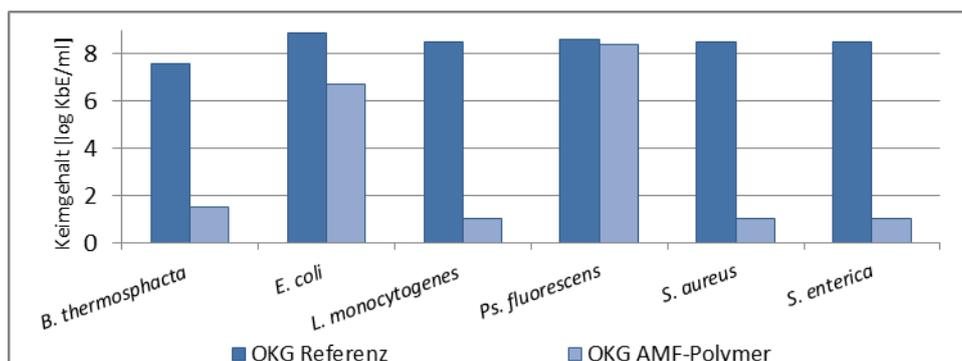


Abbildung 3: Oberflächenkeimgehalt (OKG) ausgewählter Mikroorganismen auf Referenz- und AMF-Material nach 2-stündigem Kontakt bei 35°C

Die Kontaminationen in der Industrie setzten sich meist aus verschiedenen Mikroorganismen zusammen. Daher wurden zusätzlich Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität des AMF-Polymers gegenüber Mischkulturen durchgeführt, um Selektionsvorteile auszuschließen. Verwendet wurden Mischkulturen, die sich aus den oben genannten Mikroorganismen zusammensetzten. Nach 2-stündigem Kontakt bei 35°C wurde sowohl der Gesamtoberflächenkeimgehalt als auch der Oberflächenkeimgehalt der einzelnen Mikroorganismen bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Mischkultur aus *S. enterica*, *S. aureus* und *Ps. fluorescens* durch das AMF-Homopolymer bis zur Nachweisgrenze reduziert wurde. Durch das AMF/n.a.-Copolymer wurde *Ps. fluorescens* in Kombination mit verschiedenen Mikroorganismen nicht so stark reduziert als seine vorwiegend pathogene Begleitflora. Der Keimgehalt von *Ps. fluorescens* lag durchschnittlich bei 2,5 log₁₀ KbE/ml, während die Begleitflora bis zur Nachweisgrenze abgetötet wurde. Eine deutliche antimikrobielle Aktivität konnte somit bereits nach 2 h erzielt werden. Eine Verlängerung der Kontaktzeit auf 24 h führte bei einem Mix aus den drei Pseudomonaden spp. wiederum zur Reduzierung bis zur Nachweisgrenze. Das AMF-Polymer weist somit nicht nur eine sehr gute antimikrobielle Aktivität gegenüber einzelnen Mikroorganismen auf, sondern reduziert Mischkontaminationen ebenfalls effektiv.

AP 3: EINFLUSS PRODUKT- UND PROZESSSPEZIFISCHER FAKTOREN

Ein entscheidender prozessspezifischer Faktor stellt die Umgebungstemperatur dar. Studien von Kampmann et al. (2008) und Chaitiemwong et al. (2008) zeigten, dass die antimikrobielle Aktivität von silberhaltigem Material bei Kühltemperaturen gegenüber den im Teststandard geforderten Temperaturen herabgesetzt ist. Vergleichbare Reduktionen können erst nach deutlich längeren Kontaktzeiten erreicht werden. Im Rahmen der Promotion wurde daher die Inkubationstemperatur verringert (20°C, 7°C bzw. 4°C) und zusätzlich die Kontaktzeit variiert. Die Untersuchungen fanden mit den in AP 2 genannten Mikroorganismen statt.

Auch bei Kühltemperaturen, welche in der Fleischindustrie herrschen, reduziert das AMF/n.a.-Copolymer den Oberflächenkeimgehalt im Vergleich zur Referenzoberfläche um bis zu 5 log KbE/ml (Abbildung 4). Die antimikrobielle Wirksamkeit der AMF-Materialien ist jedoch bei einigen Keimen von Temperatur und Kontaktzeit abhängig (vergleiche AP 2).

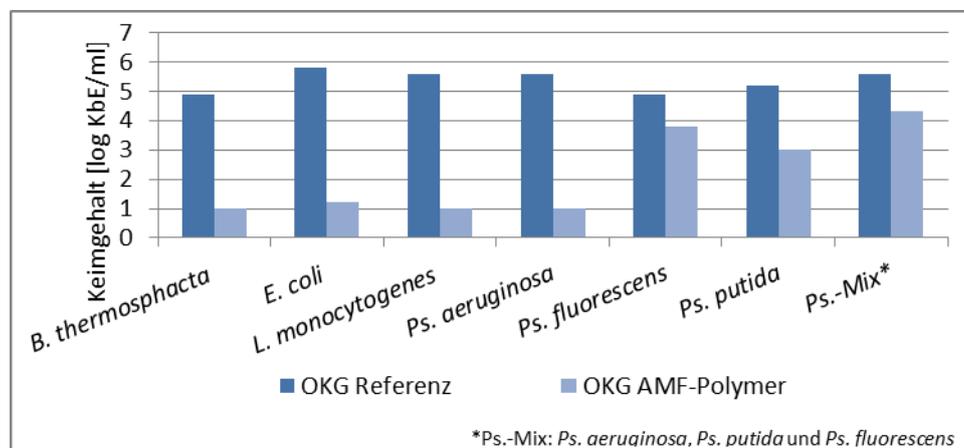


Abbildung 4: Oberflächenkeimgehalt (OKG) ausgewählter fleischrelevanter Mikroorganismen auf Referenz- und AMF-Material nach 2-stündigem Kontakt mit dem AMF/n.a.-Copolymer bei 4°C

Diese Abhängigkeit zeigt auch eine Versuchsreihe mit *S. aureus* (Abbildung 5).

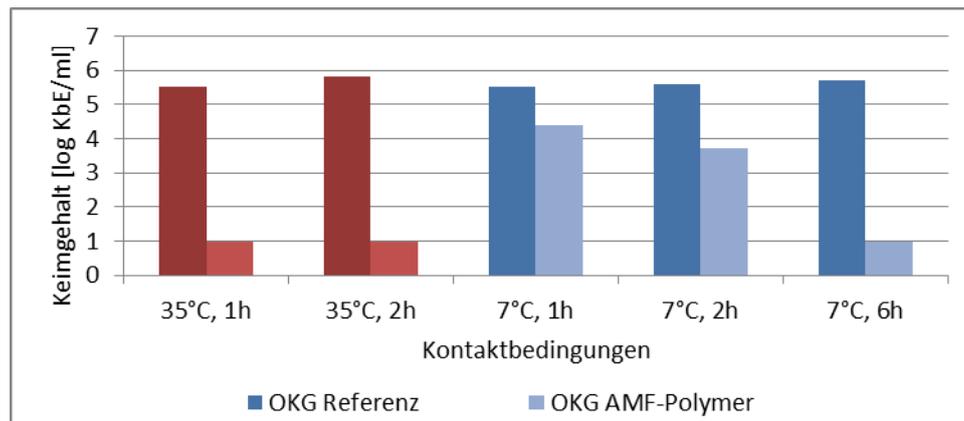


Abbildung 5: Oberflächenkeimgehalt (OKG) von *S. aureus* auf Referenz- und AMF-Material in Abhängigkeit von Kontaktdauer und Umgebungstemperatur

Neben den prozessspezifischen Faktoren können produktspezifische Faktoren einen Einfluss auf die Aktivität von antimikrobiellen Werkstoffen haben. So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass Proteinen hemmenden Einfluss auf die antimikrobiellen Eigenschaften von Silber haben (Kampmann et al. 2008). Desweiteren zeigte Lenoir et al. (2006) eine signifikante Abnahme der Wirksamkeit des SAM-Polymer TBAEMA in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen. Ebenfalls einen inhibierenden Effekt von divalenten Kationen (Mg^{2+}) auf die antimikrobielle Wirksamkeit von tertiären Aminen wies Endo et al. (1987) nach. Aufbauend auf diesen Forschungsergebnissen wurde im Berichtszeitraum der Einfluss fleischrelevanter Bestandteile auf die antimikrobielle Wirksamkeit von AMF/n.a.-Copolymer getestet. Hierzu wurden die Mineralstoffe Calcium, Magnesium und Phosphat in Konzentrationsreihen entsprechend der in Hähnchenfleisch enthaltenden Mengen der Beimpfungslösung zugesetzt. Magnesium- und Calciumionen haben in den zugesetzten Mengen von bis zu 40 mmol/l keinen signifikanten Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität des AMF/n.a.-Copolymer gegen *S. aureus*. Die Untersuchungen mit *E. coli* bestätigen jedoch die Ergebnisse von Endo et al. (1987). Im Vergleich zu einer SAM-Referenz, welche mit der Keimsuspension ohne Mineralstoff beimpft wurden, liegen die Oberflächenkeimgehalte auf dem SAM-Polymer, welche mit Mineralstoff-Keim-Suspension beimpft wurden, nach 2 h Kontakt bei 35°C durchschnittlich um $2 \log_{10}$ KbE/ml höher. Die antimikrobielle Aktivität ist aber weiterhin gegeben (Log_{10} -Reduktion $>3,8$). Auch bei Zugabe von Phosphationen konnte eine deutliche Reduktion des Oberflächenkeimgehaltes durch das Material nachgewiesen werden. Es zeigte sich aber, dass sich die Reduktion bei beiden Keimen bei steigender Phosphatkonzentration verringerte. Zusammenfassend ist zu sagen, dass erst bei sehr großen Mineralstoffkonzentrationen ein geringer Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität des SAM-Polymer gegeben ist, wobei dieser bei *E. coli* ausgeprägter ist als bei *S. aureus*. Da die gewählten Konzentrationen weit über dem Gesamtanteil (inkl. gebundener Form) der Mineralstoffe in Hähnchenfleisch liegen, ist davon auszugehen, dass die Wirksamkeit der AMF-Polymer in der Anwendung in der Fleischindustrie nicht durch Mineralstoffe beeinflusst wird.

Im Rahmen eines anderen Promotionsvorhabens in der Arbeitsgruppe wurde der Einfluss von Fleischsaft auf die antimikrobielle Aktivität der SAM-Polymer untersucht. Hierfür wurde der frische Fleischsaft von vakuumverpacktem Schweinefleisch als Beimpfungslösung

verwendet. Auch in Anwesenheit von Fleischsaft werden signifikante Reduktionsraten des Oberflächenkeimgehaltes durch das AMF-Polymer erzielt.

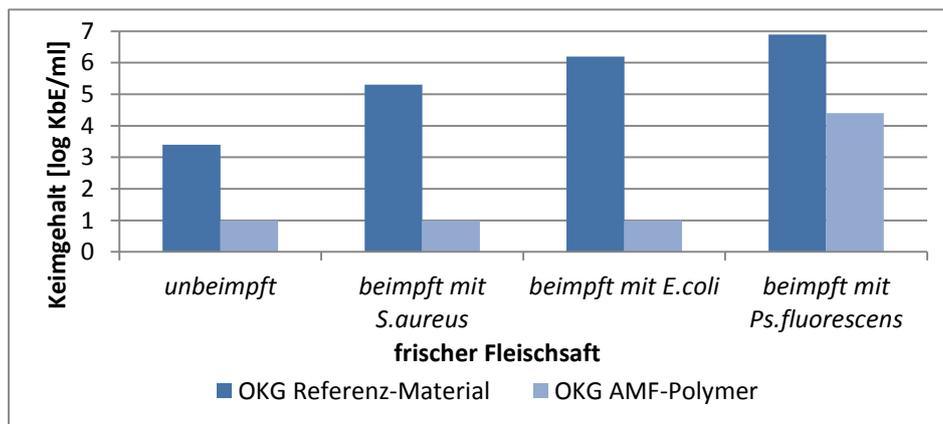


Abbildung 6: Oberflächenkeimgehalte (OKG) auf Referenz- und AMF-Oberflächen nach 2 h Kontakt bei 35°C mit frischem Fleischsaft (unbeimpft und beimpft) (Dohlen, unpubliziert)

Ein weiterer sowohl prozess- als auch produktspezifischer möglicher Einflussfaktor stellt der pH-Wert dar. Endo et al. (1987) zeigte, dass die antimikrobielle Aktivität von tertiären Aminen bei pH-Wert-Absenkung abnahm. Versuche zum Einfluss fleischrelevanter pH-Werte auf die antimikrobielle Wirksamkeit der SAM-Polymer zeigten, dass bei pH 5, 6 und 7 die Testkeime *S. aureus*, *E. coli* und *Ps. fluorescens* bis zur Nachweisgrenze reduziert werden. Der pH-Wert hat somit keinen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität.

AP 4: UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKPRINZIP DER SAM-POLYMERE

Wie im Stipendienantrag beschrieben, sollte das Wirkprinzip der SAM-Polymere mit dem SAW-Gerät erforscht werden. Hierzu war geplant die SAM-Polymere auf einem Chip aufzubringen und Keimsuspension über den Sensor zu leiten. Es stellte sich heraus, dass dieser Ansatz aufgrund von Bindungsproblemen am Chip nicht zu realisieren ist.

Um Aufschluss über das Wirkprinzip zu erhalten wird nun die Mikroskopie eingesetzt. An der FH Münster wurden Rasterelektronenmikroskopaufnahmen von *E. coli* vor und nach dem Kontakt mit dem AMF-Polymer angefertigt (Abbildung 7). Es zeigt sich deutlich, dass die Zellstruktur durch das Polymer aufgelöst wurde und Cytoplasma austritt. Weitere mikroskopische Untersuchungen folgen in Kürze.

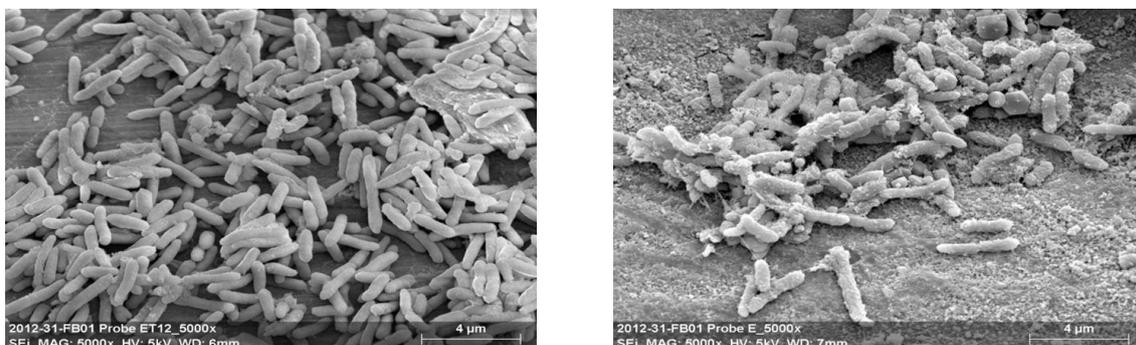


Abbildung 7: REM-Aufnahmen von *E. coli* vor (links) und nach (rechts) 2-stündigem Kontakt mit AMF-Polymer (FH Münster, unpubliziert)

AP 5: UNTERSUCHUNGEN ZUM POTENTIAL KREUZKONTAMINATIONEN ZU VERRINGERN

Für die Untersuchung in AP 5 werden durch die FH Münster neue Materialien hergestellt, bei denen das AMF-Polymer in klassische Polymere wie LLDPE oder PP eingearbeitet werden. Dies bietet die Möglichkeit Probenkörper zur Simulation von Schneidebrettern etc. zu formen. Diese Werkstoffentwicklung dauert an, sodass die Überprüfung dieser neuen Materialien auf ihre antimikrobielle Aktivität im Vordergrund steht. Auf Referenzmaterial werden zurzeit jedoch schon Methoden zu den geplanten Kreuzkontaminationsuntersuchungen durchgeführt, sodass die Untersuchungen auf SAM-Polymeren direkt im Anschluss an die Materialbereitstellung erfolgen können.

Zunächst sollen Fleischstücke auf standardisiert kontaminierten Zerlegeflächen bearbeitet werden. Bei diesen Zerlegeflächen handelt es sich zum einen um ein Material mit eingearbeitetem SAM-Polymer und eine entsprechende Referenz. Die Fleischproben werden im Anschluss auf ihren Keimgehalt untersucht.

Da die Biofilmbildung in der Lebensmittelindustrie ein großer Risikofaktor für Kreuzkontaminationen ist, wurden Untersuchungen zur Reduzierung von Biofilmen durch SAM-Polymeren in den Arbeitsplan aufgenommen. Hierzu werden auf SAM-Material und entsprechenden Referenzen unter standardisierten Bedingungen Biofilme angezüchtet. Durch den Vergleich der angebundenen Biomasse durch klassische Mikrobiologie und mikroskopische Untersuchungen können Rückschlüsse über einen Einfluss von SAM-Polymeren auf die Biofilmbildung geschlossen werden. Die standardisierte Anzucht der Biofilme aus *Ps. aeruginosa* auf LLDPE wurde bereits entwickelt und zeigt reproduzierbare Ergebnisse mit $6 \log_{10}$ KBE/cm² nach 7 Tagen.

AP 6: MIGRATION

In AP 6 wurde ein qualitatives Verfahren entwickelt, welches den Migrationsmechanismus aus dem SAM-Polymer überprüft. Dieses Verfahren wird begleitend zur Optimierung der Polymere angewendet. Im Berichtszeitraum konnten hierdurch und durch die begleitende Analytik an der FH Münster Schwachstellen der Polymere identifiziert und bearbeitet werden, sodass ein verbessertes Aufreinigungsverfahren etabliert wurde. Des Weiteren wurden Hemmhoftests durchgeführt.

Detaillierte Migrationsbestimmungen nach VO (EU) Nr. 10/2011 sind für das nächste Jahr geplant und werden aufgrund der notwendigen Analytik zusammen mit der FH Münster durchgeführt.

AP 7: LANGZEITSTABILITÄT

Um einen Beitrag zur Verbesserung der Hygiene in lebensmittelverarbeitenden Betrieben zu leisten, muss ein Material über Jahre seine Werkstoffeigenschaften beibehalten. Daher stellt die Langzeitstabilität insbesondere im Hinblick auf die Verwendung von SAM-Polymeren in Arbeitsflächen ein zu beachtendes Kriterium dar. Die antimikrobielle Aktivität vieler bisher eingesetzter Arbeitsflächen beruht auf dem Prinzip der Freisetzung von bioziden Stoffen. Diese Werkstoffe zeigen dadurch eine begrenzte antimikrobielle Aktivität, da sie kontinuierlich den Wirkstoff an die Umwelt abgeben. Diese Freisetzung kann zudem zu einer Anreicherung der Biozide in der Umwelt führen, was weitreichende Folgen haben kann, wie es derzeit bei Silber diskutiert wird. SAM-Polymere wirken hingegen intrinsisch und daher

theoretisch unbegrenzt. Jedoch könnten Materialveränderungen durch Umwelteinflüsse oder Abnutzungen zu einer veränderten Wirksamkeit führen. Daher wurde das AP 7 zusätzlich zu den bei der Antragsstellung geplanten Arbeitsschwerpunkten in das Promotionsvorhaben aufgenommen.

Erste Untersuchungen der Langzeitstabilität der antimikrobiellen Wirksamkeit erfolgten mit alten Proben, die im Rahmen des SmartSurf Projektes hergestellt wurden. Der Vergleich der Reduktionsraten zeigt, dass die AMF-Copolymere nach 2-3 Jahren Lagerung weiterhin eine gute antimikrobielle Aktivität aufweisen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden 3 Polymersysteme (Homo-AMF, AMF/n.a.-Copolymer und ein Copolymer aus AMF und einem säurefunktionalisiertem Comonomer) ausgesucht, deren Langzeitstabilität im Rahmen der Promotion systematisch untersucht wird. Die Probenchargen wurden im Mai 2013 von der FH Münster zur Verfügung gestellt. Diese wurden jeweils in 3 Gruppen aufgeteilt, welche dann unter verschiedenen Bedingungen eingelagert wurden, um den Einfluss von Lagerungsbedingungen auf die Langzeitstabilität zu untersuchen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht über die Lagerungsbedingungen und Untersuchungszeitpunkte der Proben zur Untersuchung der Langzeitstabilität

Lagerungsort	Temperatur* [°C]			Luftfeuchtigkeit* [%rF]			Anzahl Proben pro Polymer	Mai 13	Nov. 13	Mai 14	Nov. 14	Mai 15
	Min.	Ø	Max.	Min.	Ø	Max.						
Kühlhaus	4,6	5,7	9,4	45,0	55,8	72,3	96	x	x	x	x	x
Raumtemperatur	19,9	22,2	27,7	26,6,0	43,5	61,3	96	x	x	x	x	x
Froster	-22,1	-21,0	-12,4	47,5	60,2	99,9	36	x		x		x

*basierend auf den bisher erfassten Daten mittels Datenlogger

Bei der ersten Untersuchung zeigten alle Chargen eine sehr gute antimikrobielle Aktivität gegenüber *S. aureus* und *E. coli*. Zu definierten Zeitpunkten (Tabelle 2) wurden bzw. werden die eingelagerten Proben erneut im Standardversuche (35°C, 2 h Kontakt) untersucht. Nach bis zu einem Jahr Lagerung bei entsprechenden Bedingungen wurden keine signifikanten Änderungen in der antimikrobiellen Aktivität der drei Proben festgestellt. Aufgrund der ersten Ergebnisse zeigen die SAM-Polymere ein großes Potential für einen langfristigen Einsatz als antimikrobielle Lebensmittelkontaktoberfläche.

2.4 Verwertbarkeit der Ergebnisse

Ziel des Forschungsprojektes war es die Anwendbarkeit von intrinsisch antimikrobiell wirksamen Polymeren zur Reduzierung von Kreuzkontaminationen in der Fleischindustrie zu prüfen. Die bisher gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die SAM-Polymere ein großes Potential aufweisen, Kreuzkontaminationen zu reduzieren. Innerhalb des Förderzeitraumes konnten eine Reihe von relevanten Untersuchungen durchgeführt werden. Durch diese wurde das bisherige Wissen zur Anwendbarkeit von SAM-Polymeren zur Reduzierung von Kreuzkontaminationen in der Fleischindustrie sowie die damit verbundenen Testverfahren erheblich erweitert. Einige gewonnene Erkenntnisse konnten bereits synergistisch für die im Safe-Pack Projekt behandelten antimikrobiellen Verpackungen genutzt werden. Durch die Ergebnisse konnten die Werkstoffeigenschaften weiter optimiert werden. Es sind jedoch noch

weitere Untersuchungen nötig, um die Anwendung in der Praxis abschließend zu prüfen. Zudem muss weiterhin eine Zulassung für den Einsatz in Lebensmittelkontakt erfolgen.

Durch den Einsatz von SAM-Polymeren in der Fleischindustrie kann die Qualität und Sicherheit von Fleisch und Fleischprodukten langfristig erheblich verbessert werden und gleichzeitig der Food Waste reduziert werden. Dadurch und durch eine Verlängerung der Haltbarkeit aufgrund geringerer Keimbelastungen trägt dies zu einer nachhaltigen Lebensmittelproduktion bei. Der Einsatz von SAM-Polymeren stellt für die Unternehmen somit einen erheblichen Wettbewerbsvorteil dar.

SAM-Polymere bieten jedoch nicht nur für die Fleischindustrie sondern auch für zahlreiche andere Branchen erhebliche Wettbewerbsvorteile, da sie die Hygiene signifikant verbessern können. Mögliche Einsatzgebiete wären u.a. Medizinprodukte, Sanitärzubehör oder die Lackindustrie.

2.5 Qualifikation

Durch die Einbettung meiner Promotion sowie meine geringfügige Anstellung in der interdisziplinären Arbeitsgruppe Cold Chain Management (Oecotrophologen, Lebensmitteltechnologe, Biologen, Physiker) erhielt ich tiefgreifende Einblicke in die verschiedenen Forschungsschwerpunkte der Arbeitsgruppe. So erweiterte sich mein Wissen im Bereich der aktiven und intelligenten Verpackungen und ich erhielt tiefe Einblicke in die Implementierung von Temperaturüberwachungssystemen in internationalen Supply Chains, die Erstellung von Modellen zur Prognose der Produktqualität und –sicherheit sowie in die Food Waste-Thematik. Bei letztgenanntem Thema war ich an der Erstellung einer Publikation mit dem Titel „Food Waste in der Fleisch verarbeitenden Kette“ beteiligt (s. Publikationen). Die Arbeitsgruppe veranstaltet zudem regelmäßig einen Internationalen Cold Chain Management Workshop. 2013 wirkte ich aktiv an der Organisation und Durchführung dieses Workshops mit und stellte zudem mein Promotionsprojekt in einem Vortrag vor (s. Publikationen). Zudem unterstützte ich die Arbeitsgruppe in der Lehre, sodass ich beispielsweise in der Betreuung von Praktika eingebunden war. Des Weiteren betreue ich Studenten bei Abschlussarbeiten. Im Rahmen meiner Promotion wurden bisher 2 Diplom- und 5 Masterarbeiten abgeschlossen, 2 weitere Master- sowie eine Bachelorarbeit werden in Kürze abgeschlossen. Die Ergebnisse dieser Abschlussarbeiten fließen in die Promotion ein.

Begleitend zu meinem Promotionsvorhaben belegte ich Kurse in der Theodor-Brinkmann-Graduiertenschule. In diesen erwarb ich u.a. Schlüsselqualifikation in den Bereichen Rhetorik und Computeranwendungen (MS Excel, MS Access, SPSS, VBA-Programmierung). Durch Seminare und Vorlesungsreihen erhielt ich weiterhin Einblicke in das Krisenmanagement oder auch in Modellierungsansätze verschiedener Fachrichtungen. Zudem nahm ich an dem Workshop „Antimikrobielle Oberflächen“ im Rahmen der 9. ThGOT und einer SAW Instruments Schulung teil.

Somit konnte ich während meiner Stipendiumslaufzeit meine Qualifikation in unterschiedlichen Bereichen erheblich erweitern und Schlüsselqualifikationen u.a. in den Bereichen „Wissenschaftliches Arbeiten und Schreiben“ und „Präsentationstechniken“ vertiefend erwerben.

3 ZUSAMMENFASSUNG

Prüfung der Anwendbarkeit von intrinsisch antimikrobiellen Oberflächen zur Reduzierung von Kreuzkontaminationen in der Fleischindustrie

Die hygienischen Bedingungen während der Produktion und Verarbeitung von Fleisch haben einen Einfluss auf dessen Qualität, Sicherheit und Haltbarkeit. Um mikrobiologische Belastungen auf Verarbeitungsflächen und Förderbänder zu reduzieren, werden Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen durchgeführt, welche jedoch die bakterielle Verunreinigung nur kurzfristig und nicht während der Produktion beseitigen bzw. verringern. Daher wird der Einsatz antimikrobiell wirkender Oberflächen diskutiert, um die Keimbelastung auch während der Produktion zu reduzieren. Bisher werden vorwiegend Oberflächen eingesetzt, in die ein Bakterizid (z.B. Silberpartikel) eingearbeitet wurde, welches dann an die Umwelt abgegeben wird. Einen neuen Ansatz stellen Sustainable Active Microbicidal (SAM) Polymere dar, welche die Mikroorganismen intrinsisch bei Kontakt abtöten.

Ein solches SAM-Polymer untersucht Carina Braun im Rahmen ihrer Forschungsarbeit an der Universität Bonn. Sie geht der Frage nach, ob die Anwendung der Polymere in der Fleischindustrie einen Beitrag zur Reduzierung von Kreuzkontaminationen leisten kann. Für die Untersuchungen wurde ein neues SAM-Polymer durch das IKFM der FH Münster zur Verfügung gestellt. Diese wurden nach einem standardisierten Testverfahren auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit überprüft. Dabei wurden die Keimgehalte auf SAM- und Referenzmaterial nach Kontakt mit Mikroorganismen unter definierten Bedingungen verglichen. Hierbei wurden produkt- und prozessspezifische Einflussfaktoren berücksichtigt.

Aus den Untersuchungen ging hervor, dass auf den SAM-Polymeren Kontaminationen verschiedener Mikroorganismen auch bei Kühltemperaturen auf ein Minimum reduziert wurden. Insbesondere bei ausgewählten pathogenen Keimen zeigt das Material eine sehr gute Wirksamkeit. Bei einigen Verderbsorganismen wurde jedoch eine verzögerte Wirksamkeit festgestellt (Abb. 1). Zudem zeigten Ergebnisse, dass die Umgebungstemperatur, der pH-Wert und Fleischinhaltsstoffe keinen entscheidenden Einfluss auf die antimikrobielle Wirksamkeit haben. Des Weiteren zeigten Langzeitstabilitätsuntersuchungen bisher keine Veränderung der Wirksamkeit im Laufe der Lagerung. Derzeit laufen weitere Untersuchungen zur Analyse des Wirkprinzips der SAM-Polymere.

Aufgrund der positiven Ergebnisse unter praxisrelevanten Bedingungen sieht Frau Braun gute Chancen, dass der Einsatz von SAM-Polymeren in der Fleischindustrie zu einer Reduktion der mikrobiellen Belastung von Lebensmittelkontaktflächen und dadurch zu einer verringerten Anzahl an Kreuzkontaminationen führt. Dies verbessert die Qualität und Sicherheit von Fleisch und Fleischerzeugnissen nachhaltig.

Aufgrund der positiven Ergebnisse unter praxisrelevanten Bedingungen sieht Frau Braun gute Chancen, dass der Einsatz von SAM-Polymeren in der Fleischindustrie zu einer Reduktion der mikrobiellen Belastung von Lebensmittelkontaktflächen und dadurch zu einer verringerten Anzahl an Kreuzkontaminationen führt. Dies verbessert die Qualität und Sicherheit von Fleisch und Fleischerzeugnissen nachhaltig.

„Dieses Promotionsprojekt wurde durch die Heinrich-Stockmeyer Stiftung gefördert/
This PhD project was promoted by the Heinrich-Stockmeyer Foundation“.

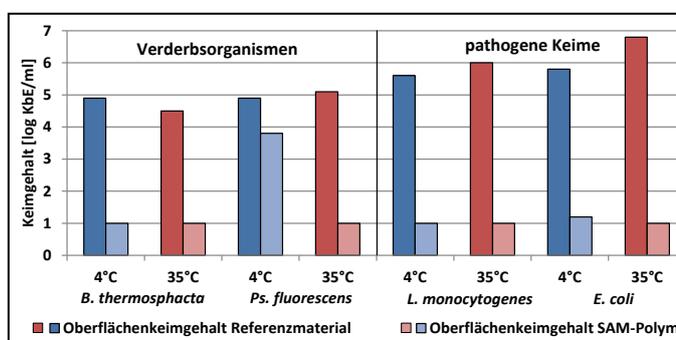


Abb. 1: Vergleich der Oberflächenkeimgehalte auf Referenz- und SAM-Materialien nach 2 h Kontakt

4 LITERATURVERZEICHNIS

Buranasompob, A. (2005): Kinetics of the inactivation of microorganisms by water insoluble polymers with antimicrobial activity. Dissertation, Technische Universität Berlin, Berlin.

Chaititemwong, N.; Hazeleger, W. und Beumer, R. (2008): The effect of silver as antimicrobial additive in conveyor belt on survival of *Listeria monocytogenes*. In: Programme and Abstract Book, Food Micro 2008 - The 21st International ICFMH Symposium "Evolving microbial food quality and safety", 1st - 4th of September 2008, Aberdeen, Scotland, 82.

Endo, Y.; Tani, T. und Kodama, M. (1987): Antimicrobial Activity of tertiary amine covalently bonded to a polystyrene fiber. In: Applied and Environmental Microbiology **53** (9), 2050-2055.

Ilg, Y.; Kreyenschmidt, M.; Lorenz, R.; Zerbe, J. und Kreyenschmidt, J. (2011): Assessment of sustainable antimicrobial polymers with regard to their applicability in the food chain. Proceedings of the 11th International Congress on Food Engineering and Food – Food Process Engineering in a Changing World, Athens, Greece. May 22-26, 2011, 99-100.

International Organization Standard 22196 (2007): Plastics – Measurement of antimicrobial activity on plastics surfaces. ISO Central Secretariat, Switzerland.

Japanischer Industrie Standard Z 2801:2000 (2000): Antimicrobial products- Test for antimicrobial activity and efficacy.

Kampmann, Y.; Bruckner, S.; Kohn, S.; Kloft, K.; Kreyenschmidt, J. (2008): Investigation of microbiological contamination in domestic refrigerators and an analysis of appropriate methods for reduction of contamination in private households. Proceeding of "The International Conference of Refrigeration" IIF. 15.10.2008. - 17.10.2008, Poznan, Poland. 309–318.

Lenoir, S.; Pagnouille, C.; Galleni, M.; Compère, P.; Jérôme, R. und Detrembleur, C. (2006): Polyolefin Matrixes with Permanent Antibacterial Activity: Preparation, Antibacterial Activity, and Action Mode of the Active Species. In: Biomacromolecules **7** (8), 2291–2296.

Thölmann, D.; Kossmann, B. und Sosna, F. (2003): Polymers with antimicrobial properties. In: European coatings journal **1-2**, 16–33.