

Gefriertrocknung von Rotschmierebakterien

von W. Bockelmann, K.P. Willems, M.L. Ollo-Edimo, K.J. Heller

Institut für Mikrobiologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel,
Standort Kiel, Postfach 6069, 24124 Kiel

1. Einleitung

Die meisten Trocknungsprozesse erlauben weder die Anwesenheit von Luftsauerstoff, durch den unerwünschte Oxidationsprozesse erfolgen, noch hohe Temperaturen, die den Ablauf chemischer Prozesse um ein Vielfaches beschleunigen, sie verändern die Zellstruktur durch Schrumpfung und Zerstörung (1). Die Gefriertrocknung ist ein modernes und schonendes Verfahren zur Haltbarmachung und Langzeitlagerung von Lebensmitteln, -bestandteilen und Mikroorganismen (2, 3). Dieses technisch recht aufwändige Verfahren hat gegenüber sonstigen Methoden zur Haltbarmachung viele Vorteile: die Struktur, äußere Form und natürliche Farbe der Gefriertrocknungsgüter bleiben fast vollständig erhalten, die Verluste an Geruchs- und Geschmacksstoffen sowie an Vitaminen und Aminosäuren sind sehr gering, der Nährwert und die Verträglichkeit bleiben weitgehend erhalten und es findet eine deutliche Gewichtsreduzierung für einen einfachen Transport und Versand und die Möglichkeit der ungekühlten Lagerung statt. Die Rekonstruktion, d.h. die Wiederaufnahme von Wasser erfolgt rasch und unter Wiederherstellung des Charakters der Ausgangsprodukte. Für Hersteller von Reifungs- und Starterkulturen (Bakterien, Hefen, Schimmelpilze) sind gefriergetrocknete Konzentrate inzwischen die bevorzugte Vermarktungsform.

Das Institut für Mikrobiologie arbeitet seit Jahren an der Entwicklung definierter Oberflächen Reifungskulturen für Rotschmierekäse. Dabei wurden für die Versuchskäseproduktion geschmierter Schnitt-, Weich- und Sauermilchkäse eine Vielzahl von Rotschmierespezies und -stämmen benötigt. Da die Haltbarkeit von Flüssigkonzentraten nur wenige Wochen betrug, mussten Kulturen häufig nachgezüchtet werden. Im Rahmen von 2 Diplomarbeiten wurde ein Gefriertrocknungsverfahren entwickelt, mit dem sich lyophilisierte Kulturen über mehrere Monate lagern lassen. In der vorliegenden Arbeit wird die Optimierung der Trocknungsparameter zur Erzielung hoher Überlebensraten sowie die Aktivität lyophilisierter Kulturen im Vergleich zu Flüssigkonzentraten bei der Reifung von Rotschmierekäsen beschrieben.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Wachstumsmedien

Alle verwendeten Chemikalien stammten von der Firma VWR International (Darmstadt). Wurden Chemikalien anderer Hersteller genutzt, werden diese gesondert genannt. Die verwendeten Rotschmierebakterien wurden in modifiziertem Plate Count Flüssigmedium (mPC) nach Hoppe-Seyler et al. (2000, (4)) angezüchtet. Das Medium

entspricht dem „Plate Count“ Medium (VWR-International, Darmstadt) angereichert mit Magermilchpulver, Hirn-Herz Bouillon, Caseinhydrolysat, Natriumchlorid und Vitaminen.

2.2 Mikroorganismen

Die verwendeten Rotschmierebakterien *Brevibacterium linens* Br5, *Microbacterium gubbeenense* CA12 und *Corynebacterium casei* CA3 stammten aus der Stammsammlung des Instituts und wurden ursprünglich von der Oberfläche eines Tilsiter Käses isoliert (5). Für die Gefriertrocknung wurden die Bakterien in mPC Medium in Schüttelkolben angezüchtet (25°C) und befanden sich zum Zeitpunkt der Ernte in der frühen stationären Phase. Nach Zentrifugation wurden die Zellpellets in flachen Schichten bei -80°C eingefroren. Für die Gefriertrocknung wurden Aliquots entnommen, mit Laktoselösung (5 % w/v in a. dest) 1-2 mal resuspendiert und erneut zentrifugiert.

2.3 Bestimmung von Keimzahl, Überlebensrate und Restfeuchte

Zur Keimzahlbestimmung wurden die Bakterien auf mPC Agar (Medium mit 1,4 % Agar-Agar) ausplattiert. Aus dem Gesamtvolumen der Ausgangssuspension wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt; Zur Bestimmung der Überlebensraten wurden die getrockneten Proben mit dem sublimierten Volumen an Ringerlösung resuspendiert und die Keimzahlen mit denen der flüssigen Ausgangsproben verglichen. Dafür wurden, wenn nicht anders beschrieben, Mittelwerte von je 3 getrockneten Proben ermittelt. Für die Restfeuchtebestimmung (Rf) wurde das Gewicht der lyophilisierten Proben ermittelt (E) und diese für weitere 2 h bei 80°C getrocknet (A); Berechnung: $Rf [\%] = (E-A) \cdot E^{-1} \cdot 100$. Auch hier wurden Mittelwerte von je 3 getrockneten Proben verwendet. Das Ein- und Auswiegen der RRG erfolgte mit einer Analysenwaage (Genauigkeit $\pm 0,1$ mg).

2.4 Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknungsversuche wurden in der Anlage Beta 2-16 der Firma Christ Gefriertrocknungsanlagen (Osterode, Deutschland) durchgeführt. Es handelte sich um ein Einkammersystem, in dem die Proben auf temperierbaren Stellflächen im Eiskondensatorraum getrocknet werden. Die Stellflächen hatten einen Durchmesser von 20 cm, der Eiskondensator (Temperatur -85°C) war ringförmig angeordnet. Die Messwerterfassung und Steuerung erfolgte mit der Software LPC-16 für DOS. Zur Prozessdokumentation wurden folgende Daten aufgenommen: Produkttemperatur und -widerstand (LyoTemp, LyoRx), Vakuum, Stellflächentemperatur, Eiskondensatortemperatur.

Die Trocknung erfolgte in 5 ml Roll-Rand-Gläschen (RRG) gefüllt mit 1,5 ml Bakterien-suspension um eine Schichtdicke von 10 mm nicht zu überschreiten. Für die Bestimmung der Keimzahl und der Restfeuchte wurden in ausreichender Menge Proben getrocknet um Dreifachbestimmungen zu ermöglichen. Die Bakterien wurden stets auf der mittleren Stellfläche gefriergetrocknet. Die Rollrandgläser wurden keimarm in die chemisch desinfizierte Gefriertrocknungsanlage verbracht. Die verwendeten Gummistopfen wurden unter Freihaltung der Be- und Entlüftungsschlitze locker auf die Rollrandgläser aufgesetzt. Vor der Trocknung wurden die Proben mit ca. $1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ im Eiskondensatorraum auf den Stellflächen eingefroren. Die verschiedenen Trocknungsprogramme sind in Tabelle 1 dargestellt. Im Anschluss an die Gefriertrocknung wurde die Vakuumkammer über einen Membranfilter (0,2 μm Porenweite) mit Argon begast und die Proben wurden mit Gummistopfen und Aluminium Presskappe verschlossen.

Tab. 1: Programme zur Gefriertrocknung von Rotschmierebakterien suspendiert in 5 % Laktose in aqua dest. Das im Text erwähnte 23 h Programm 3 entsprach dem 21 h Programm 2, das in Abschnitt 8 um 2 h verlängert wurde. Durch das angelegte Vakuum ergab sich eine Produkttemperatur von -25°C (0.63 mbar) bzw. -16°C (1.51 mbar) während der Sublimation; ST= Start, GF= Gefrieren, VB=Vorbereiten (Gefrieren mit Vakuumpumpe im Leerlauf), HT= Haupttrocknung.

Abschnitt	Phase	Programm 1			Programm 2		
		Stellfläche [°C]	Vakuum [mbar]	Zeit [h:min]	Stellfläche [°C]	Vakuum [mbar]	Zeit [h:min]
1	ST	20	Off	0:00	+20	off	0:00
2	GF	-20	Off	0:30	-40	off	1:00
3	VB	-20	Off	0:30	-25	off	0:15
4	HT	-16	1,51	0:30	-25	0,630	0:05
5	HT	-5	1,51	4:30	-15	0,630	0:10
6	HT	10	1,51	6:00	-15	0,630	16:45
7	HT	15	1,51	3:30	+20	0,630	0:45
8	HT	15	1,51	4:30	+20	0,630	2:00
Gesamtdauer				20 h			21 h

2.5 Oberflächenreifung von Rotschmierekäsen

Zur Bestimmung der Aktivität der getrockneten Kulturen im Vergleich zu Flüssigkonzentraten wurden im Labormaßstab Rotschmierekäse gereift. Gouda-ähnlicher Schnittkäse (frischer Grünkäse) aus einer Käserei im Umland (Blockware, 45 % Fett in der Trockenmasse) wurde in Würfel mit ca. 10x10x10cm Kantenlänge geschnitten. Die Käse wurden über Nacht in einem Salzbad gesalzen (15°C, >18 % NaCl), das mit der Hefe *Debaryomyces hansenii* und *Staphylococcus equorum* angeimpft worden war. Die Käse wurden nach der Salzbadbehandlung mit *B. linens*, *C. casei* und *M. gubbeenense* mit je 10^8 KbE*ml⁻¹ pro Spezies geschmiert (5) und in einem 60 l Glaskasten mit Deckel bei ca. 97 % relativer Feuchte und 15°C gereift (6). Der Oberflächen pH Wert wurde mit einer flachen Oberflächen pH Elektrode an mindestens 3 Punkten bestimmt und es wurde ein Mittelwert gebildet. Für die Bestimmung der Oberflächen Keimzahl wurde mit 2 Wattetupfern (feucht und trocken) 1cm² Schmiere abgerieben und auf modifiziertem Milchagar ausplattiert. Die Keimzahl entsprach einem Mittelwert aus 4 auszählbaren Agarplatten (4).

3. Ergebnisse

3.1 Bestimmung eutektischer Punkte

Der eutektische Punkt einer Lösung (EP) ist vermutlich der wichtigste Parameter bei einer Gefriertrocknung, da die zu trocknenden Stoffe zu keiner Zeit in flüssige Form überführt werden dürfen. Zur näherungsweisen Ermittlung des EP von kristallin frierenden Systemen stand für die verwendete Anlage ein Kombifühler (LyoControl) für die

gleichzeitige Messung von Produkttemperatur und elektrischem Widerstand zur Verfügung. Nach Herstellerangaben bestimmt der Schnittpunkt der Kurven der Produkttemperatur und des Produktwiderstand mit guter Näherung den EP (Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode, Deutschland). Die in Abbildung 1 gezeigten Kurvenverläufe scheinen die Angaben zu bestätigen. Der auf diese Weise bestimmte EP verschiedener mikrobiologischer Wachstumsmedien und anderer Lösungen ist in Tabelle 2 zusammengestellt.

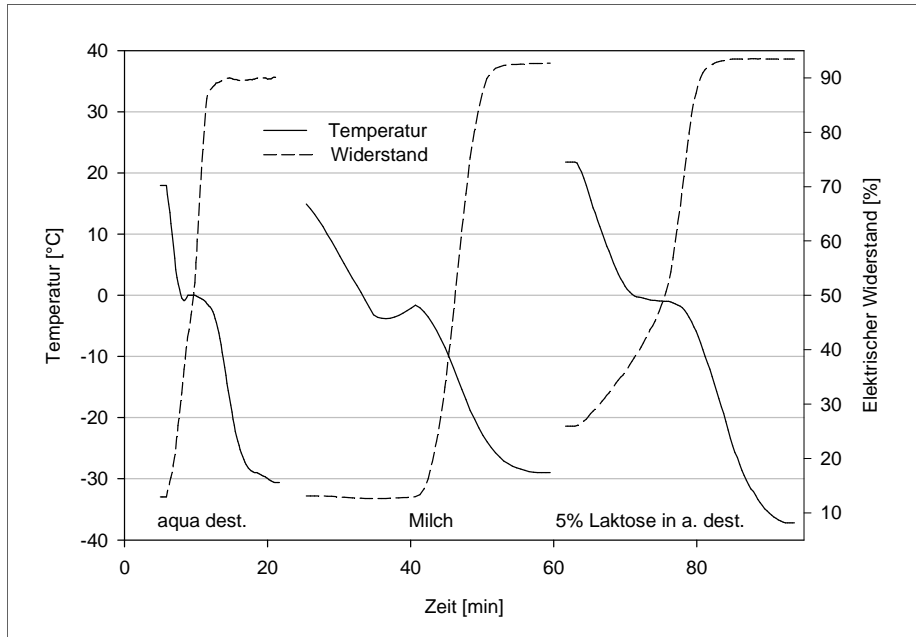


Abb. 1: Messung der Produkttemperatur und des Produktwiderstandes beim Einfrieren mittels "LyoControl". Die graphische Auswertung wurde anhand der Rohdaten mit SigmaPlot 2000 vorgenommen. Dabei musste die Skalierung der Temperatur zwischen +100 und -100 °C liegen, die Skalierung des Widerstandes musste mit der LPC16/DOS Software zwischen +100 und -100 (willkürliche Einheiten)

Der sehr niedrige EP verschiedener Wachstumsmedien erforderte mehrere Waschschriffe bei der Zellernte, um den EP auf für die Gefriertrocknung günstige Werte (höher als -10°C) einzustellen (Tab. 3). Insgesamt erwies sich ein Verhältnis von Zellmasse zu Resuspendierungsmittel (5% Laktose) von 1:200 (w/v) für das eingesetzte modifizierte Plate Count Medium als ausreichend. Es ergab sich ein EP von ca. -2 bis -5°C, was einen großen Einstellbereich für das Vakuum und die Stellflächentemperatur ermöglichte.

Tab. 2: Eutektischer Punkt verschiedener Flüssigkeiten; die angegebenen Nährlösungen wurden von der Firma VWR International (Darmstadt) bezogen, und nach den vorgegebenen Standardrezepten angesetzt. Die Zusammensetzung von modifiziertem Plate Count Medium, eingesetzt für das Wachstum von Rotschmierebakterien, wurde von Bockelmann et al. (1997, (5)) beschrieben.

Probe	Eutektischer Punkt [°C]
Leitungswasser	-1,0
destilliertes Wasser	0,0
H-Milch (3,5%)	-11,7
10% rekonstituierte Magermilch	-11,0
Laktose 5%ig	-1,0
Laktose 10%ig	-2,0
modifiziertes Plate Count Medium	-45,0
HGL Bouillon	-12,0
BA Bouillon	-29,0
Traubenzuckerbouillon	-29,0
Malzextraktbouillon	-6,5
YGC Bouillon	-15,0
MRS Bouillon	-20,0
M-17 Bouillon	-15,5
Grundmedium Streptokokken	-15,0

Tab. 3: Eutektischer Punkt einer *B. linens* Präparation suspendiert in 5% Laktose in aqua dest nach 1-3 maliger Zentrifugation und Resuspendierung. Der eutektische Punkt der Bakterien im modifizierten Plate Count Medium (Tab. 2) lag bei -45°C. Das angegebene Mischungsverhältnis bezieht sich Gramm Feuchtgewicht nach Zentrifugation zur Menge der Laktoselösung.

Resuspendieren in 5 % Laktose	1:20 (w/v)	1:200 (w/v)
1 x	-11 °C	-3 °C
2 x	-4,5 °C	-2 °C
3 x	-3 °C	-1 °C

3.2 Gefriertrocknung von *B. linens*

Die Optimierung der Gefriertrocknung für Rotschmierebakterien wurde am Beispiel von *B. linens* durchgeführt. Später wurde das Trocknungsverfahren auf Eignung für *C. casei* und *M. gubbeenense* geprüft. Mit der Vorgabe, die Proben temperatur unterhalb des EPs und den Widerstand nahe 100% zu halten, wurde *B. linens* mit verschiedenen Trocknungsprogrammen lyophilisiert. Die Abkühlraten konnten von 0,67°C*min⁻¹ bis 1,33°C*min⁻¹ variiert werden. Als optimal für hohe Überlebensraten stellte sich eine Kühlrate von ca. 1°C*min⁻¹ heraus (Daten nicht gezeigt). Bei einem ermittelten EP von ca. -4.5°C wurde bei einem Vakuum von 1,51 mbar (= -16°C Produkttemperatur) die Stellflächentemperatur mit einer Rampe von -16°C auf +15°C zum Ende der Trocknung erhöht (Tab. 1, Abb. 2a). Dabei blieb die Proben temperatur unterhalb des ermittelten

EPs und der Probenwiderstand nahe 100%. Die Überlebensraten lagen bei zahlreichen Versuchen zwischen 60 % und 85 % am Tag nach der Trocknung (Tab. 4). Dabei fiel auf, dass die Probenposition im Einkammersystem einen Einfluss auf die Überlebensrate hatte. Proben mit großem Abstand vom Eiskondensator waren trockener und wiesen eine geringere Überlebensrate auf (Tab. 4). Dieses Phänomen zeigte sich bei allen von Programm 1 abgewandelten Trocknungsprogrammen, die Unterschiede in der Einfrier- geschwindigkeit und der Länge der Haupttrocknung aufwiesen (Gesamtdauer 16 h-23 h, weitere Daten nicht gezeigt).

Tab. 4: Restfeuchte und Überlebensraten gefriergetrockneter Rotschmierebakterien. Dabei wurde die Stellflächentemperatur bei Programm 1 schrittweise erhöht um eine schnelle Trocknung zu ermöglichen; bei Programm 2 wurde die Stellflächentemperatur über den größten Teil der Trocknung bei -15°C gehalten um schonendere Bedingungen einzustellen (siehe Abb. 2). Die Probentemperatur lag bei beiden Trocknungsprozessen unterhalb des ermittelten eutektischen Punktes. Das angelegte Vakuum lag bei Programm 1 bei 1.51 mbar (-16°C), bei Programm 2 bei 0.63 mbar (-25°C). Die Daten beziehen sich auf Einzelproben (Restfeuchte) bzw. vier ausgezählte Agarplatten einer Einzelprobe. Die Werte für Restfeuchte und Überlebensraten, z.B. bei *B. linens* zeigen die typische Schwankungsbreite der Messungen.

Abstand vom Eiskondensator	5 cm	7 cm	9 cm
	Restfeuchte (Überlebensrate) [%]		
Programm 1 (<i>B. linens</i>)	2,22 (84)	1,89 (73)	1,65 (60)
Programm 1 (<i>B. linens</i>)	2,05 (80)	1,90 (62)	1,83 (63)
Programm 2 (<i>B. linens</i>)	2,33 (70)	-	1,79 (79)
Programm 2 (<i>C. casei</i>)	2,44 (65)	-	1,95 (69)
Programm 2 (<i>M. gubbeenense</i>)	1,77 (78)	-	1,50 (83)

Das Trocknungsprogramm 1 wurde für weitere Versuche modifiziert: während der Haupttrocknung wurde die Stellflächentemperatur konstant auf -15°C belassen, das Vakuum wurde auf 0,63 mbar entsprechend -25°C Produkttemperatur gesetzt, um für eine schnelle Trocknung einen entsprechenden Temperaturgradienten zwischen Stellfläche und Probe einzustellen (Programm 2, Tab. 1, Abb. 2b). Den Unterschied in der Sublimationsrate beider Trocknungsprogramm zeigt Abbildung 3. Die Sublimation von ca. 95 % des Probenwassers wurde bei Programm 1 nach ca. 8 h, bei Programm 2 nach ca. 12 h erreicht. Obwohl Programm 2 durch die niedrigeren Temperaturen eine deutlich schonendere Haupttrocknungsphase aufwies, lagen die Überlebensraten im gleichen Bereich (65-83 %) wie bei Programm 1. Im Gegensatz zu Programm 1 waren beim Einsatz von Programm 2 die Überlebensraten bei trockeneren Proben, mit größerem Abstand zum Eiskondensator, höher (Tab. 4).

Bei allen Trocknungsversuchen wurde versucht Zellsuspensionen gleicher Konzentration einzusetzen. Im ermittelten Schwankungsbereich von $2-16 \times 10^{10}$ KbE*ml⁻¹ für die zu trocknenden Proben ergab sich kein messbarer Einfluss auf die Überlebensrate. Die Restfeuchte schien bei konzentrierteren Proben geringfügig höher zu liegen (Abb. 4)

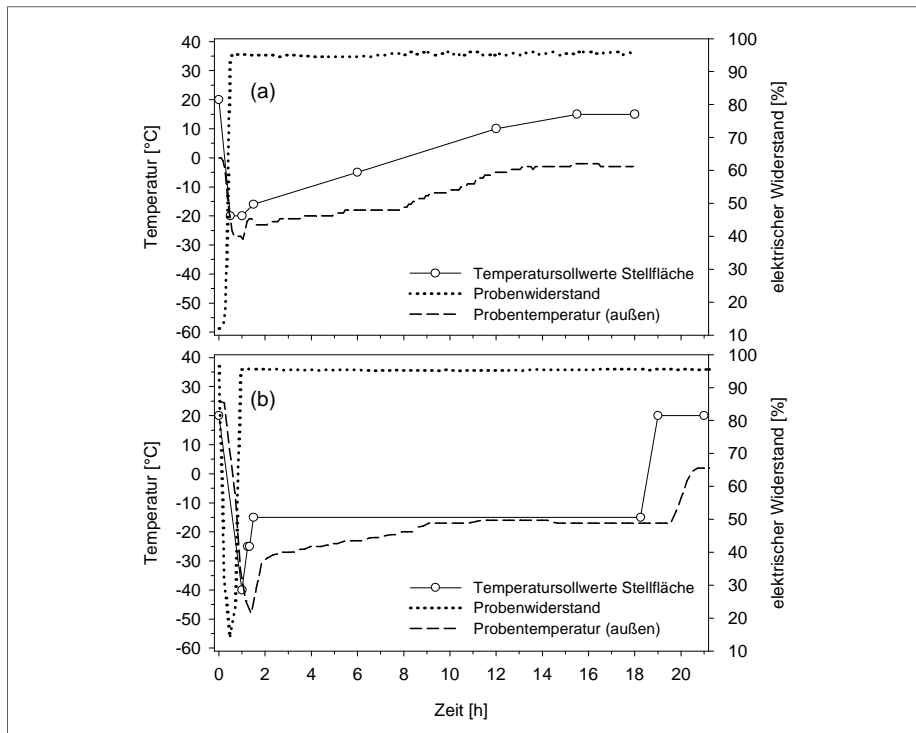


Abb. 2: Gefriertrocknung von *B. linens* suspendiert in 5% Laktose. Der EP lag bei ca. $-4,5^{\circ}\text{C}$. Um eine kurze Trocknungszeit zu ermöglichen, wurde die Stellflächentemperatur in (a) während der Trocknung angehoben (Vakuum 1.51 mbar). Dabei lag die Probentemperatur immer unterhalb des ermittelten EPs und der Probenwiderstand nahe 100 %. Im Verfahren (b) wurde die Stellflächentemperatur über 18 h deutlich unterhalb des ermittelten EPs gehalten (EP ca. $-4,5^{\circ}\text{C}$, Stellfläche = -15°C , Tabelle 1) und ein Vakuum von 0.63 mbar angelegt.

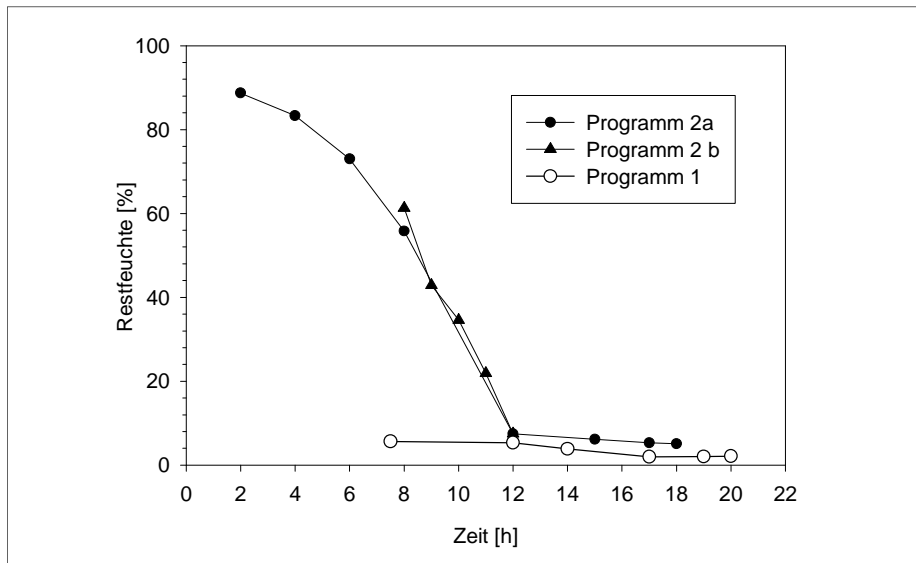


Abb. 3: Messung der Restfeuchte von *B. linens* Proben getrocknet mit den beschriebenen Trocknungsprogrammen 1 + 2 (Tab. 1) durchgeführt in 3 Gefriertrocknungen. Der Probenraum musste für die Probenahmen belüftet werden. Nach Entnahme eines Rollrandgläschens wurde das jeweilige Programm durch den Programmgeber der Beta 2-16 an entsprechender Stelle fortgesetzt. Die Probenahme wurde bei Programm 2 bei Trocknungen an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt (a + b).

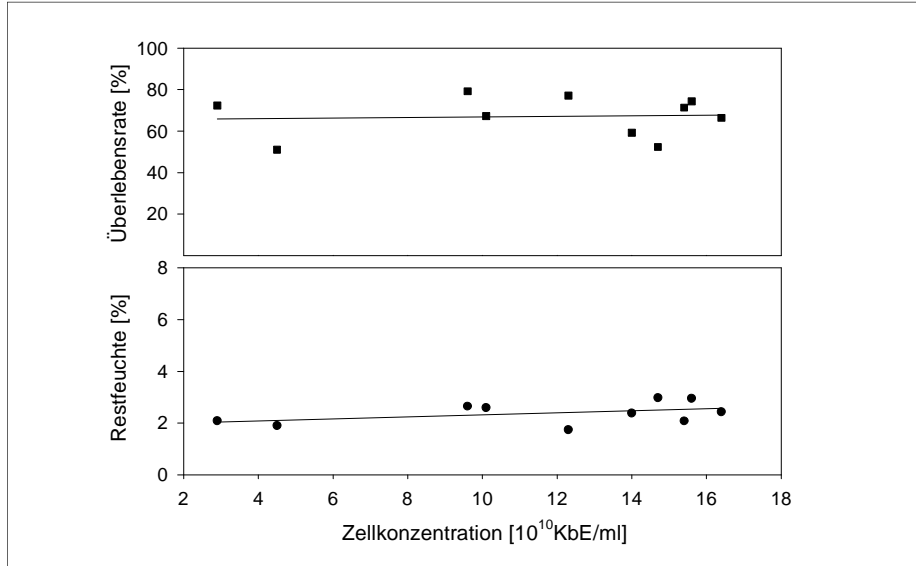


Abb. 4: Einfluss der Zellkonzentration (Bakterien suspendiert in 5 % Laktose) auf die Restfeuchte und Überlebensrate nach der Gefriertrocknung. Die Daten ergeben sich aus 5 verschiedenen Gefriertrocknungsversuchen, jeweils 4 Proben wurden dabei auf Restfeuchte und Überlebensraten analysiert.

3.3 Lagerung und Resuspendierung von trockenen Proben

Um den Einfluss der Restfeuchte auf die Lagerfähigkeit zu prüfen, wurde Programm 2 um 2 h in der letzten Phase verlängert (Programm 3, 23 h, Tab. 1). Die Restfeuchte war bei diesen Proben etwas niedriger und die Überlebensraten lagen bei ca. 40 % im Vergleich zu ca. 70 % bei Programm 2 (21 h) am ersten Tag nach der Trocknung (Mittelwert für die 3 getesteten Spezies). Bei einer Lagerung über 9 Wochen bei 4-5°C sank die Lebendkeimzahl bei Proben aus dem 23 h Programm geringfügiger als bei Proben, die mit dem 21 h Programm getrocknet worden waren. Nach 9 Wochen Lagerung wiesen die Keimzahlen aller Spezies keine deutlichen Unterschiede mehr auf. Der höhere Verlust an Lebendkeimzahl im 23 h Programm während der Gefriertrocknung wurde durch bessere Lagerstabilität ausgeglichen.

Auch Resuspendierungsmittel hatten einen Einfluss auf die Keimzahlen. Bei der Keimzahlbestimmung von lyophilisierten Proben (Tag 1 nach der Trocknung mit Programm 2, 21 h) ergaben sich Überlebensraten gegenüber den flüssigen Ausgangsproben von 69 % (s=14) für Ringelösung, 67 % (s=15) für modifiziertes Plate Count Medium, 38 % (s=10) für 0.05 %ige Ascorbinsäure in aqua dest. und 40 % (s=20) in aqua dest (s = Standardabweichung, n=3).

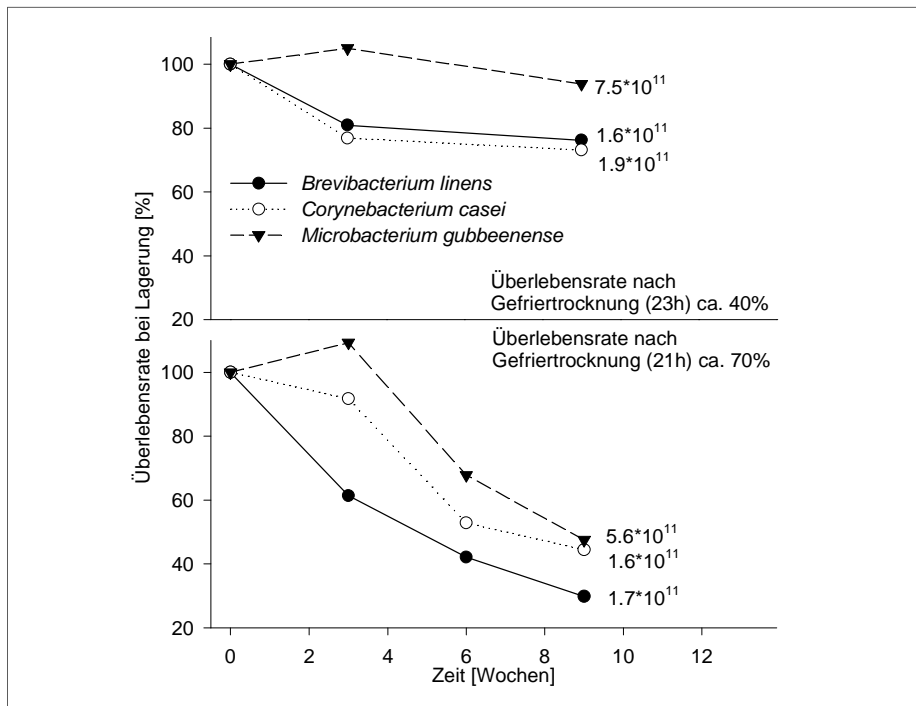


Abb. 5: Lagerung gefriergetrockneter Rotschmierebakterien bei 4-5°C. Die 3 Spezies wurden gemeinsam in 2 Chargen in einer größeren Anzahl an Rollrandgläsern getrocknet (21 h, 23 h). Um vergleichbare Restfeuchte und Keimzahlwerte zu erhalten, wurden die Proben ringförmig, mit gleichem Abstand zum Eiskondensator, auf den Stellflächen platziert. Der Ausgangswert von 100 % ist bezogen auf die erste Keimzahlbestimmung (Tag 1) nach der Gefriertrocknung. Jeder Messpunkt entspricht einer Dreifachbestimmung einer Einzelprobe (Rollrandgläsern). Die Gefriertrocknungsprogramme wurden in Tabelle 1 beschrieben. Die Keimzahlen beziehen sich auf ein Gramm Trockenmasse Lyophilisat.

3.4 Einsatz lyophilisierter Bakteriensuspensionen für die Reifung von Rotschmierekäsen

Neben der absoluten Keimzahl von Bakterienkulturen ist auch deren Aktivität entscheidend für ihre Eignung, z.B. für die Käsureifung. Bei der Entwicklung der Rotschmiere (Oberflächenmikroflora) ist der Oberflächen pH Wert ein gutes Maß für die Aktivität einer Kultur. So sollte bei Tilsiter-ähnlichen Käsen der Anfangs pH Wert der Oberfläche von ca. pH 5,3-5,5 innerhalb von 7 Tagen Reifung auf Werte von größer pH 7 ansteigen, mit einer Gesamtkeimzahl an Rotschmierebakterien von $>10^9$ KbE*cm⁻² (7). Bisher wurden im Institut für Mikrobiologie hauptsächlich konzentrierte Reifungskulturen, gelagert in flüssiger Form, erfolgreich für die Oberflächenreifung eingesetzt. Ein Ersatz der Spezies *B. linens*, *C. casei* und *M. gubbeenense* in der Reifungskultur durch gefriergetrocknete Kulturen führte zu vergleichbaren Ergebnissen mit einer schnellen Entsäuerung und guter Schmiereentwicklung (Abb. 6). Nach 7 Tagen Reifung lagen die Keimzahlen für beide Präparationen höher als 10^9 KbE*cm⁻².

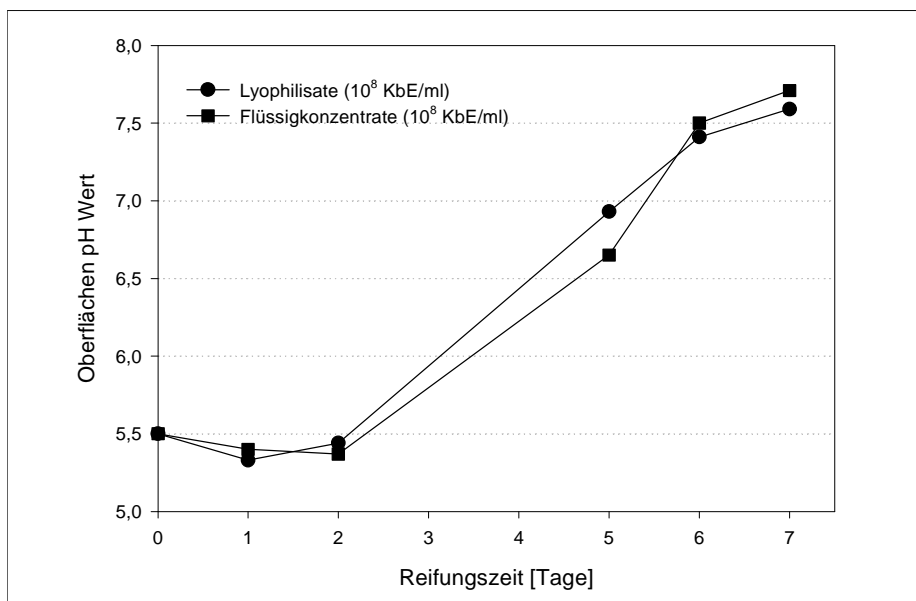


Abb. 6: Entsäuerung einer Tilsiter Oberfläche (2 kg Labormaßstab) durch Wachstum von Rotschmierebakterien. Zwei Versuchskäsechargen wurden in einem Salzbad in Gegenwart der Hefe *Debaryomyces hansenii* und *Staphylococcus equorum* gesalzen (über Nacht). Die zum Schmieren verwendete Rotschmierekultur enthielt *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium casei* und *Microbacterium gubbeenense* in den angegebenen Konzentrationen. Die Kulturen wurden aus flüssig, bzw. gefriergetrocknet gelagerten Präparationen hergestellt.

4. Diskussion

Da Gefriertrocknung von Mikroorganismen (Starter- und Reifungskulturen) meist kommerziell betrieben wird, ist kaum Literatur zur Optimierung von Trocknungsparametern veröffentlicht. Die vorliegenden Arbeiten beschreiben geeignete Trocknungsverfahren für die Haltbarmachung von Bakterien, die zur Reifung von Rotschmierekäsen

eingesetzt werden. Für die Entwicklung von Rotschmierebakterien im Institut für Mikrobiologie ist seit Jahren eine große Zahl an Spezies und Stämmen in aktiver Form vorzuhalten. Die Haltbarkeit der Flüssigkonzentrate liegt bei wenigen Wochen, so dass die Kulturen für Versuchskäseproduktionen häufig nachproduziert werden mussten. Die Anforderungen an die Haltbarkeit gefriergetrockneter Kulturen orientierte sich an Angaben von Kulturenherstellern, die z.B. bei einer Lagerung von 6 Wochen bei 5°C oder 24 Monate bei -20°C eine Keimzahl von 5×10^{10} KbE* g^{-1} garantieren. Eine weitere Forderung war, dass die Aktivität der gefriergetrockneten Kulturen in der Käsereifung Flüssigkonzentraten vergleichbar sein musste. Da für die Käsereifungsversuche im Labormaßstab nur geringe Mengen erforderlich waren, wurde die Gefriertrocknung von 1,5 ml Mengen in Rollrandgläsern durchgeführt.

4.1 Kryoprotektoren

Laktose wurde in den Versuchen als Kryoprotektor gewählt, da mit diesem Zucker im Institut Schimmelpilzsporen bereits erfolgreich gefriergetrocknet werden konnten. Nach Untersuchungen von Izutsu et al. (2004, (8)) haben Disaccharide im Vergleich zu Mono- und Oligosacchariden eine bessere Schutzwirkung bei der Trocknung von Proteinen. Da Laktose in kristalliner Form gefriert, war es möglich, den eutektischen Punkt (EP) über eine kombinierte Temperatur und Widerstandsmessung der Proben zu bestimmen (LyoControl der Firma Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode). Am Gefrierpunkt kristalliner Systeme steigt der Probenwiderstand stark an. Bei entsprechender Skalierung kann, gemäß Christ Gefriertrocknungsanlagen, im Schnittpunkt der Proben-temperatur- und Widerstandskurve der EP graphisch ermittelt werden (Skalierung: LPC-16DOS -100 bis +100, LPC-16NT 0 bis 100). Die für Wasser und verschiedene Wachstumsmedien ermittelten eutektischen Punkte bestätigten diesen Zusammenhang. Ungeeignet ist diese Methode bei Kryoprotektoren wie Saccharose, die in wässriger Lösung amorph gefriert und beim Einfrieren keinen klaren Anstieg des Probenwiderstandes bewirkt. Hier sind andere Systeme zur Ermittlung der sogenannten Glasübergangstemperatur einzusetzen, wie Kryomikroskopie oder „Differential Scanning Calorimetry“ (Informationsblätter, Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode).

4.2 Eutektischer Punkt und Gefriertrocknung

Voraussetzung für eine erfolgreiche Gefriertrocknung ist die Kenntnis des eutektischen Punktes, da die Proben während der Sublimation des Wasser unterhalb dieser Temperatur bleiben müssen. Als Richtwert, gegeben von der Firma Christ, ist die Proben-temperatur ca. 10°C unterhalb des EP zu halten. Das eingesetzte modifizierte Plate Count Medium besaß einen EP von -45°C, nach zweimaligem Waschen der Zellen mit 5 % Laktose ergab sich ein EP von ca. -4,5°C. Deshalb wurde in Programm 1 ein Vakuumsollwert von 1,51 mbar eingestellt, entsprechend -16°C Proben-temperatur während der Sublimation. Schonendere Trocknungsbedingungen wies Programm 2 auf, mit einem Vakuumsollwert von 0,63 mbar (entsprechend -25°C), was zusammen mit einer geänderten Temperaturführung an der Stellfläche zu einer deutlich geringeren Sublimationsrate führte (Abb. 3). Ursache dafür ist nicht nur die niedrigere Stellflächen-temperatur, sondern auch das höhere Vakuum: da 1 g Eis bei 1 mbar 1 m³ Dampf bildet und bei 0,1 mbar schon 10 m³ Dampf, verlängern niedrige Vakuumwerte die Gefrier-trocknung erheblich (9).

4.3 Überlebensraten

Um gute Vergleichbarkeit zwischen einzelnen Trocknungsexperimenten zu erzielen, wurden Aliquots von bei -85°C eingefrorenen Bakterienpellets eingesetzt. Durch das zweimalige Einfrieren waren die Zellen vermutlich vorgeschädigt. Trotz der unterschiedlichen Sublimationsrate (Abb. 3) waren die Überlebensraten bei beiden Trocknungsprogrammen ähnlich (ca. 60-85 %). Die erzielten Restfeuchten und Überlebensraten war abhängig von der Probenposition im verwendeten Einkammersystem. Dabei zeigten trockenere Proben, mit großem Abstand vom -80°C kalten Eiskondensator, mit Programm 1 niedrigere Überlebensraten als feuchtere Proben (Tab. 4). Bei Programm 2 mit niedrigerer Sublimationsrate kehrte sich dieser Effekt um. Die Ursache ist unklar, vermutlich ist aber der Effekt kleiner in Anlagen mit einem -50°C kalten Eiskondensator und damit einem geringeren Temperaturgefälle gegenüber der Stellfläche der Proben.

In einer Vielzahl von Gefriertrocknungen wurden verschiedene Parameter hinsichtlich der Überlebensrate getestet, z.B. Einfriergeschwindigkeit, Probenposition, Abschirmung von Proben gegen den Eiskondensator, Abschirmung der Stellflächen gegenüber dem Eiskondensator, Probenkonzentration, Temperatur- und Vakuum Sollwerte, Restfeuchte (Daten nicht gezeigt). Da die Überlebensraten in fast allen Versuchen zwischen 60 % und 85 % schwankten, wurde Programm 2 für weitere Versuche eingesetzt. Durch die einfache Temperaturführung ist es auch geeignet für Gefriertrocknungsanlagen ohne Programmgeber. Weiterhin ergaben sich trotz der niedrigen Sublimationsrate Trocknungszeiten von unter 24 h, was Versuche im Tagesabstand ermöglichte. Um für einen Trocknungsbatch vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurden die Proben in 1-2 Reihen ringförmig auf den Stellflächen angeordnet.

4.4 Lagerung und Aktivität trockener Proben

Das in der letzten Phase um 2 h verlängerte Programm 2 (Programm 3, Tab. 1) führte in weiteren Versuchen zu niedrigeren Überlebensraten von 40 % gegenüber 70 % bei Programm 2 und schien zu Beginn schlechter geeignet zu sein. Nach 9 Wochen Lagerung stabilisierten sich jedoch die Keimzahlen der Proben aus beiden Trocknungsprogrammen auf ein fast gleiches Niveau. Dies bedeutet, dass in den Suspensionen vorgeschädigte Bakterien durch das schonendere Programm 2 die Gefriertrocknung besser überlebten, aber letztlich doch nicht lagerstabil waren. Dieses Ergebnis bestätigte sich für alle 3 eingesetzten Spezies und bedeutet für eine Optimierung von Trocknungsbedingungen, dass die Überlebensraten direkt nach der Gefriertrocknung nur wenig Aussagekraft bezüglich der Lagerfähigkeit von Bakterienkulturen haben. Bei der Aktivität gefriergetrockneter Reifungskulturen waren im Vergleich zu flüssigen Konzentraten, die bei 4°C gelagert wurden, keine Unterschiede festzustellen: Sie waren für den Einsatz als Reifungskulturen geeignet (Abb. 6).

Die in dieser Arbeit dargestellten Überlebensraten ergaben sich durch Einsatz vorgefrorener Bakterien. Höhere Werte dürften sich vermutlich beim Einsatz frisch geernteter Zellen ergeben.

5. Schlussfolgerungen

Für die Optimierung von Trocknungsparametern ist die Messung von Überlebensraten unmittelbar nach der Gefriertrocknung nicht ausreichend. Weitere Analysen nach mehreren Wochen Lagerung sollten folgen. Die verbreitet für die Gefriertrocknung eingesetzten 'low-cost' Einkammersysteme sind trotz der Unterschiede in Restfeuchte

und Überlebensrate innerhalb eines Batches geeignet für die reproduzierbare Trocknung von Bakterienkulturen. Die unmittelbar nach der Trocknung gemessenen Unterschiede gleichen sich nach wenigen Wochen Lagerung aus. Für eine Vergleichbarkeit verschiedener Proben in einem Batch sollten die Proben in ähnlichem Abstand zum Eiskondensator angeordnet werden. Alternativ vermeidet der Einsatz von Thermoblöcken aus Aluminium mit Bohrungen für die Probengefäße weitgehend den Einfluss des Eiskondensators

Ein einfaches Programm mit konstanter Stellflächentemperatur im größten Teil der Haupttrocknung ist auch auf Anlagen ohne Temperatur-Programmegeber realisierbar, erlaubt Trocknungszeiten von unter 24 h, was tägliche Trocknungen ermöglicht. Der Einsatz von Laktoselösungen erlaubt die Bestimmung des eutektischen Punktes über Widerstandsmessungen. Dies ist allerdings nicht unbedingt notwendig, da nach zweimaligem Waschen mit Laktoselösung der eutektische Punkt sogar beim Einsatz von modifiziertem Plate Count Medium (EP ca. -45°C) in einem geeigneten Temperaturbereich liegt. Dieses Verfahren dürfte damit zumindest für solche mikrobiologischen Wachstumsmedien geeignet sein, deren eutektische Punkte höher liegen als der des modifizierten Plate Count Mediums.

Danksagung

Wir danken den Herren Dr. Hudel, Grebe und Franz von der Firma Christ Gefriertrocknungsanlagen für technische Unterstützung und hilfreiche Diskussionen während der Diplomarbeiten.

6. Literatur

- (1) Kamps, H.: Industrielles Gefriertrocknen: Aus dem Know-how eines Gefriertrocknungswerkes. *Ernährungswirtschaft* **7** 379-381 (1977)
- (2) Beke, G.: The effect of the Sublimation temperature on the rate of the freeze-drying process and upon the volumetric change in meat muscle tissue. *Proceedings of the International Congress of Refrigeration*, **3** 969-980 (1967)
- (3) Krusen, F.: Tiefgefrieren, Gefriertrocknen, Bestrahlen. *Ernährungsumschau*, **16** (1969)
- (4) Hoppe-Seyler T., Jaeger B., Bockelmann W., Heller K. J.: Quantification and identification of microorganisms from the surface of smear cheeses. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **52** (4) 294-305 (2000)
- (5) Bockelmann W., Krusch U., Engel G., Klijn N., Smit G., Heller K. J.: The microflora of Tilsit cheese Part 1. *Nahrung* **41** 208-212 (1997)
- (6) Bockelmann, W., Hoppe-Seyler, T., Jaeger, B., & Heller, K. J.: Small scale cheese ripening of bacterial smear cheeses. *Milchwissenschaft* **55** (11) 621-624 (2000)
- (7) Bockelmann, W.: The production of smear cheeses, in: Maximising quality, Eds. Smit, G. & Dodds, F., Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, GB, chapter **21**, 470-491 (2003)
- (8) Izutsu, K., Aoyagi, N., Kojima, S.: Protection of protein secondary structure by saccarides of different molecular weights during freeze-drying. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **52** (2) (2004)
- (9) Hudel, K.: Gefriertrocknung und Vakuumkonzentration. Christ-Workshop Gefriertrocknung mit System, 06.-07.03.2002, Tagungsband, 1-5 (2002)

6. Zusammenfassung

Bockelmann, W., Willems, K.P., Ollo-Edimo, M.L., Heller, K.J.: **Gefriertrocknung von Rotschmierebakterien**. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **56** (3) 179-193 (2004)

26 Mikrobiologie (Rotschmiere-Starterkulturen, Gefriertrocknung, *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium casei*, *Microbacterium gubbeenense*)

Für die Gefriertrocknung von Rotschmierebakterien in 5 % Laktose wurden verschiedene Parameter getestet. Der eutektische Punkt der Zellsuspensionen, mit Widerstandsmessungen ermittelt, lag nach 2 maligem Waschen bei $-4,5^{\circ}\text{C}$. Zwei Trocknungsverfahren mit hoher und niedriger Sublimationsrate wurden eingesetzt (Vakuum 1,51 mbar bzw. 0,63 mbar). Die Proben temperatur lag während der Haupttrocknung mindestens 10°C unterhalb des eutektischen Punktes. Es ergaben sich Restfeuchten von 1,5-2,2 % bezogen auf die Trockenmasse nach der Gefriertrocknung und Überlebensraten zwischen 60-85 %. Die Unterschiede in den erzielten Restfeuchten und Überlebensraten unmittelbar nach der Trocknung waren nicht nur abhängig von dem Trocknungsprogramm, sondern auch von der Probenposition im verwendeten Einkammersystem. Die Unterschiede erwiesen sich als wenig relevant für die Lagerfähigkeit, da nach mehrwöchiger Lagerung bei 4°C sich die Unterschiede weitgehend ausglich. Die Aktivität der gefriergetrockneten Rotschmierebakterien *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium casei* und *Microbacterium gubbeenense* während der Käse reifung war der Aktivität kühl gelagerter, eingesetzter Flüssigkonzentrate vergleichbar.

Summary

Bockelmann, W., Willems, K.P., Ollo-Edimo, M.L., Heller, K.J.: **Lyophilization of "Red-smear" bacteria**. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **56** (3) 179-193 (2004)

26 Microbiology (red-smear-starterculture, lyophilization, *brevibacterium linens*, *corynebacterium casei*, *microbacterium gubbeenense*)

Several parameters for the lyophilization of "Red-Smear" bacteria in 5 % lactose were optimised. The eutectic point of bacterial suspensions was -4.5°C after 2 wash steps as determined by measuring temperature and electrical resistance of samples. Two drying protocols including high and low rates of sublimation were used (vacuum: 1.51 mbar and 0.63 mbar, respectively). The temperature of samples during the drying process was at least 10°C lower than the measured eutectic point. The residual humidity per dry weight of lyophilized bacteria was around 1,5-2,2 %, survival rates were between 60% and 85 %. The differences in humidity and survival were not only dependent on the drying protocol, but also on the position of samples in the freeze dryer (1-chamber system). These differences, observed immediately after freeze drying, were not relevant for storage stability since the differences between batches and samples were reduced during storage at 4°C within weeks. The activity of the freeze dried smear bacteria *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium casei* and *Microbacterium gubbeenense* during ripening of Tilsit-type cheeses was comparable to cultures stored in liquid, concentrated form.

Résumé

Bockelmann, W., Willems, P., Rademaker, J., Noordman, W., Heller, K.J.: **Lyophilisation de bactéries provoquant la formation de morge rouge sur la croûte** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **56** (3) 179-193 (2004)

26 Microbiologie (Levains provoquant la morge rouge sur la croûte, lyophilisation, *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium casei*, *Microbacterium gubbeenense*)

Plusieurs paramètres ont été optimisés pour lyophiliser les bactéries provoquant la morge rouge sur la croûte dans 5% de lactose. Après deux lavages, le point eutectique des suspensions cellulaires, déterminé par des mesures de la résistance, était atteint à -4,5°C. Deux méthodes de séchage avec un taux de sublimation élevé et bas ont été utilisées (sous vide 1,51 mbar, voire 0,63 mbar). Pendant le séchage principal, la température des échantillons était au moins 10°C en-dessous du point eutectique. Il en résultait une humidité résiduelle de 1,5-2,2 % par rapport à la matière sèche après la lyophilisation, ainsi que des taux de survie entre 60-85 %. Les différences constatées pour l'humidité résiduelle et les taux de survie directement après le séchage ne dépendaient pas seulement du programme de séchage, mais aussi de la position des échantillons dans le système utilisé à chambre unique. Les différentes valeurs obtenues n'avaient que peu d'influence sur la capacité de stockage, comme après un stockage de plusieurs semaines à 4°C, les différences étaient minimales. L'activité des bactéries lyophilisées *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium casei* et *Microbacterium gubbeenense* provoquant la morge rouge sur la croûte pendant la maturation était comparable à celle des cultures conservées sous forme concentrée dans du liquide.